MARIA DEL PILAR RODRIGUEZ SANCHEZ

**Estudo histomorfológico e histomorfométrico da reparação óssea na isquemia
alveolar provocada em ratos tratada por óleo ozonizado**

São Paulo

2011

MARIA DEL PILAR RODRIGUEZ SANCHEZ

**Estudo histomorfológico e histomorfométrico da reparação óssea na isquemia
alveolar provocada em ratos tratada por óleo ozonizado**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais

Orientador: Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni

São Paulo

2011

Rodriguez SMP. Estudo histomorfológico e histomorfométrico da reparação óssea na isquemia alveolar provocada em ratos tratada por óleo ozonizado Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a Deus Pai, Filho e Espírito Santo, quem abre as portas para alcançar meus sonhos, quem ilumina meus pensamentos e abençoa as minhas mãos para cumprir os objetivos traçados.

A meus pais Elba e Antonio, modelo de força e coragem, que estimula meu caminho na busca das minhas aspirações.

AGRADECIMENTOS

A minha Orientadora Maria Cristina Zindel Deboni, a quem eu admiro muito, agradeço pela paciência e dedicação na orientação deste trabalho, obrigada por acreditar em mim. Sua orientação científica me proporcionaram um grande enriquecimento profissional e pessoal. Obrigada pelo apoio oportuno.

A meus pais Elba e Antonio, exemplo de luta, disciplina, igualmente meus irmãos Beatriz, Elba e Paul, pela força e apoio que me oferecem cada dia para alcançar meus sonhos. Agradeço a Deus por ser abençoada com uma família maravilhosa.

Agradeço aos professores, da Disciplina de Cirurgia da FOU SP, em especial a Profa. Dra. Maria da Graça Naclério Homem, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação. Seu compromisso com a ciência eu levarei como lição.

Às professoras: Dra. Luciana Corrêa, sempre atenciosa e disposta. Obrigada pelos ensinamentos e apoio quando solicitado. À Dra. Andrea Traina, pelas valiosa colaboração neste trabalho. Ao prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior, por ter dedicado parte do seu tempo para realização das fotos.

Às técnicas de laboratório e clínica: Cida e Natália, e aos secretários Rose, Ângela, Belira e Edson; por facilitar o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos técnicos do laboratório de patologia bucal Adriana, Elisa, Giovanni, Bia pela orientação na realização da parte laboratorial deste trabalho.

As minhas novas amigas: Ana, Heliana, Jenny, Liz, Mario, Roberto e Sonia pela ajuda incondicional quando a seqüência de dificuldades na execução deste trabalho apareceu. Obrigada pela amizade.

Aos meus colegas de turma: Alexandre, Gabriel, Leandro, Mariana, Ophir, Rodrigo e Samantha pelo coleguismo.

À Fundação de Amparo á pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado, processo 2009/03413-9

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.

Luiz Fernando Veríssimo

RESUMO

Rodriguez SMP. Estudo histomorfológico e histomorfométrico da reparação óssea na isquemia alveolar provocada em ratos tratada por óleo ozonizado [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

A alveolite é uma complicação pós-operatória de natureza inflamatória que ocorre alguns dias após a exodontia que interfere negativamente com o processo de reparação do alvéolo. As opções de tratamento geralmente são dirigidas a cuidados paliativos e não existe consenso quanto a sua etiopatogenia. Na presente pesquisa foram avaliadas e comparadas às características histológicas e histomorfométricas da reparação alveolar de ratos, induzidos ou não ao processo de alveolite, tratados por óleo de girassol ozonizado ou Alveoliten®. Sob anestesia geral, pela aplicação via intramuscular de 0,8mg/kg cloridrato de cetamina (Dopalen® - Vetbrands) e 0,3mg/kg cloridrato de xilazina (Rompum® - Bayer SA), foram realizadas exodontias do incisivo superior direito em 84 animais. Em 72 ratas foi induzida condição de isquemia alveolar pela aplicação de adrenalina (1:100.000) por cinco minutos. Os animais foram divididos em grupos: I: alveolite, tratada por óleo de girassol (n=20); II: alveolite, tratada por óleo de girassol ozonizado (87,3 mEq/Kg de peróxido e 0,4 acidez) (n=20); III: alveolite, tratada por Alveoliten® (n=20); grupo IV alveolite sem tratamento (n=12) e V: exodontia sem alveolite (n=12). Os animais foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO₂) nos períodos de 2, 7, 14 e 21 dias pós-tratamento. A maxila direita foi separada da esquerda, acompanhando-se a sutura intermaxilar, posteriormente a hemi-maxila foi cortada coronalmente com tesoura de ponta reta, posterior à face distal dos molares, o que permitiu a obtenção de uma peça cirúrgica com o alvéolo dental direito. Os espécimes foram processados para avaliação histomorfológica e histomorfométrica. Os dados da avaliação histomorfométrica foram submetidos à análise estatística não paramétrica pelo Teste de Kruskal-Wallis e Conover para determinar diferenças entre pares de tratamento. Os resultados histomorfológicos mostraram presença de infiltrado inflamatório que se prolongou após quatorze dias e uma maior neoformação óssea nos alvéolos tratados por Alveoliten® depois do sétimo dia de tratamento. Houve

diferenças significativas quanto a neoformação óssea após sete ($p=0.0010$), quatorze ($p=0.0320$) e vinte e um ($p=0.0222$). O óleo ozonizado provocou um processo inflamatório intenso nos primeiros períodos de estudo, mas, promoveu um processo osteogênico. A reparação óssea nos casos de alveolite, sob os parâmetros utilizados, foi melhor com o uso do Alveoliten®.

Palavras-chave: Reparação óssea. Alveolite. Alvéolo seco. Ozônio. Óleo ozonizado.

ABSTRACT

Rodriguez SMP. Histomorphologic and Histomorphometric study of bone healing in ischemic socket condition induced in rats treated with ozonized oil [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

Dry socket is an inflammatory postoperative complication, following teeth extraction. Treatment generally includes palliative care and its etiology is controversial. The present study, proposes to evaluate histological and histomorphometrical aspects of alveolar healing in rats submitted to dry socket condition and treatment by ozonized sunflower oil and Alveoliten®. Under general anesthesia by intramuscular application of 0,8mg/kg ketamine hydrochloride (Dopalen® - Vetbrands) and 0,3mg/kg xylazine chloridrate (Rompum® - Bayer SA), 84 female Wistar rats were submitted to upper right incisor.. 72 of those animals were submitted to dry socket ischemic condition by adrenalin (1:100.000) intra alveolar insertion for five minutes. Groups were divided as follow: group I: dry socket treated with sunflower oil (n=20); group II: dry socket treated with ozonated oil (peroxide 87,3 mEq/Kg and 0,4 of acidity) (n=20); group III: dry socket treated by Alveoliten® (n=20); group IV dry socket without treatment (n=12); and group V: dental extraction without dry socket induction (n=12). Rats were euthanized in a carbon dioxide (CO₂) chamber . after 2, 7, 14 e 21 subsequent treatment. Right maxilla was split following the intermaxillary suture, later it was coronal sliced distally to molar teeth. Specimens were processed for histological and histomorphometrical analyses. Histomorphometric data were statistically analyzed by Kruskal-Wallis and Conover non parametric tests to establish differences between treatments. Histological findings showed inflammatory infiltrate even 14 days after treatment. It was seen also expressive new bone formation when Alveoliten® was employed. There were significant differences between treatments after seven (p=0.0010), fourteen (p=0.0320) twenty one days (p=0.0222). Ozonated sunflower oil was able to induce intense inflammatory infiltrate during the first period of observation but it promoted bone growth on the following periods . Under controlled conditions of this study; alveolar bone healing was superior when Alveoliten® was applied.

Keywords: Bone healing. Dry socket. Ozone. Ozonated oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Exodontia do Incisivo superior direito.....	39
Figura 4.2 - Incisivo superior direito.....	39
Figura 4.3 - Introdução intra-alveolar do cone de papel com adrenalina 1(100.000).....	41
Figura 4.4 - Preenchimento do alvéolo com óleo ozonizado.....	41
Figura 4.5 - Diagrama esquemático para elaboração de óleo ozonizado.....	42
Figura 4.6 - Área total do alvéolo.....	44
Figura 4.7- Área neoformação óssea.....	45
Figura 5.1- Fotomicrografias dos alvéolos dos grupos no segundo dias pos-tratamento (HE- aumento 200x e 400x).....	48
Figura 5.2 - Fotomicrografias dos alvéolos dos grupos no sétimo dias pos-tratamento (HE- aumento 200x e 400x).....	50

Figura 5.3 - Fotomicrografias dos alvéolos dos grupos após quatorze dias pos-tratamento (HE- aumento 200x e 400x).....	52
Figura 5.4 - Fotomicrografias dos alvéolos dos grupos após vinte e um dias pos-tratamento (HE- aumento 200x e 400x).....	54
Figura 5.5 - Fotomicrografias dos alvéolos dos grupos após vinte e um dias pos-tratamento (Tricomio de Mason e 400x).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1- Distribuição dos animais na amostra final do estudo por período (dias) em cada grupo.....	46
Tabela 5.2 - Valores de medianas (máximos e mínimos) dos dados da histomorfologia em período (dias e Grupos).....	56
Tabela 5.3- Estatística descritiva da análise Histomorfométrica.....	57
Tabela 5.4 Resultados do teste de Kruskal-Wallis.....	58
Tabela 5.5 Área media ($\pm$ desvio padrão) de trabéculas ósseas(μm^2) no espaço alveolar nos diferentes períodos experimentais.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
CO ₂	Dióxido de carbono
CQ	Controle de qualidade (Copy Quality)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GI	Grupo tratado com óleo de girassol
GII	Grupo tratado com óleo ozonizado
GIII	Grupo tratado com Alveoliten®:
GIV	Grupo com alvéolos induzidos para a alveolite, mas sem medicação
GV	Grupo com alvéolos sem medicação e sem indução de alveolite
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina Eosina
IL-1	Interleucina-1
ITAL	Instituto de tecnologia de alimentos
LIDO	Laboratório de Informática
Ltd	Limitada
mm	milímetros
n	número de animais
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
PUFAS	Gorduras ácidas poliinsaturadas
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RS	Rio Grande do Sul
TGF-β	Fator de crescimento de transformação-β
TNT	Tecido não tecido
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

ml	Mililitros ($1\text{L} \times 10^{-3}$)
ppm	Partes por Milhão (mg / L)
pH	Potencial Hidrogeniônica
μg	Micrograma ($1\text{g} \times 10^{-6}$)
Kg	Kilograma
L	Litro
m	Metro
mE	Miliequivalente
min	Minuto
mg	Miligramma
mm	Milímetro
%	Por cento
°C	Graus Celsius
x	Veze

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Reparação do tecido ósseo alveolar	18
2.2 Alveolite	20
2.2.1 Aspectos Clínicos da Alveolite	21
2.2.2 Aspectos Histológicos	22
2.2.3 Etiopatogenia	23
2.2.4 Incidência	25
2.2.5 Fatores Predisponentes	25
2.2.6 Classificação clínica	27
2.2.7 Medidas de prevenção do quadro de alveolite	28
2.2.8 Tratamento da alveolite	30
2.3 Ozonio	31
2.3.1 Uso terapêutico do óleo Ozonizado.	34
3 PROPOSIÇÃO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Material	38
4.2 Métodos	38
4.2.1 Exodontia do Incisivo superior direito	38
4.2.2 Indução da Alveolite e medicações	40
4.2.3 Metodologia para elaboração do óleo ozonizado	42
4.2.4 Coleta das amostras de tecido ósseo alveolar	43
4.2.5 Análises Histomorfológica	43
4.2.6 Análise Histomorfométrica	44
4.2.7 Análises Estatísticas	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Descrição da Histomorfologia	46
5.1.1 Período de dois (2) Dias Pós-tratamento	46
5.1.2 Período de sete (7) Dias Pós-tratamento	49
5.1.3 Período de quatorze (14) Dias Pós-tratamento	51

5.1.4 Período Vinte e Um Dias (21) Dias Pós-tratamento	53
5.2 Análises Histomorfométrica.....	57
5.3 Análises estatísticas.....	58
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXOS.....	74

1 INTRODUÇÃO

O processo de reparo é a resposta natural dos tecidos frente a um traumatismo que gera uma cascata de eventos vasculares, celulares e moleculares integradas entre si. A reparação começa com a fase inflamatória seguida da fase proliferativa e finalmente a remodeladora, que visa à reestruturação funcional dos tecidos.

A regeneração óssea alveolar após uma exodontia apresenta mecanismos de hemostasia e fibrinólise. O processo de reparo se inicia com a formação e organização do coágulo sanguíneo, condição fundamental que guiará a reparação do alvéolo dentário.

Existem alguns fatores locais e sistêmicos que podem interferir negativamente no processo de reparo alveolar. Esses impedimentos da reparação normal conduzem a uma condição clínica que pode se estabelecer tardiamente e que se caracteriza por um processo inflamatório crônico e auto-sustentado que impede o progresso da reparação para as fases seguintes.

Clinicamente, chamado por alveolite, esse processo de retardo na reparação se apresenta normalmente entre o segundo e terceiro dia pos-exodontia e é caracterizado por dor intensa e ausência parcial ou total do coágulo sanguíneo intra-alveolar.

Diversas condutas terapêuticas estão indicadas na literatura para o tratamento da alveolite. São descritos desde tratamentos locais por irrigações com anti-séptico, preenchimento do alvéolo com medicamentos e prescrição e administração de analgésicos e antibióticos sistêmicos.

O que se sabe é que a verdadeira condição patológica da alveolite não é tão comum e sua etiopatogenia ainda não está totalmente esclarecida, permanecendo ainda um campo aberto para estudo.

Dentre os protocolos terapêuticos reportados na literatura são bastante comuns aqueles que preconizam a utilização de tampões medicamentosos no alvéolo. Recentemente alguns estudos apontaram para utilização de óleo ozonizado tópico como medicamento para o tratamento de feridas e lesões bucais dentre elas a alveolite.

O interesse crescente da utilização do ozônio na odontologia e na medicina e suas diferentes formas de aplicação deve-se a alguns relatos de tratamentos bem sucedidos. Alguns estudos clínicos e poucos experimentais têm procurado evidenciar que a ozonioterapia apresenta bases biológicas efetivas com resultados benéficos. Estudos experimentais padronizados que possam comprovar a real efetividade desta substância como medicamento tópico para alveolite ainda não existem.

Os modelos de experimentação animal permitem o estudo detalhado das etapas da reparação em tecido ósseo alveolar e o entendimento do processo de regeneração ou reparo ósseo bem como o papel de diversos fatores interferências ou de novas alternativas terapêuticas.

Neste contexto, propusemo-nos a avaliar, histológica e histomorfometricamente as etapas do reparo ósseo alveolar após a exodontia do incisivo superior e a subsequente indução de alveolite, em ratos, comparando os efeitos do óleo de girassol ozonizado e de uma medicação de uso convencional (Alveoliten®).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Reparação do tecido ósseo alveolar

Em condições normais a reparação óssea alveolar, como qualquer processo de reparo de feridas, é um processo complexo que envolve uma seqüência de eventos altamente interdependentes que se sobrepõem no tempo (Nusair; Younis, 2007; Chuang et al, 2008). De forma geral o processo de reparo de uma ferida pode ser dividido em quatro fases: hemostasia, a inflamação, a proliferação e a remodelação. (Marie et al., 2008). O tempo do processo de reparação é variável e dependente dentre outros fatores da quantidade de esfoliação tecidual, da presença de fatores interferências externa e, de características individuais.

Estudos clássicos descreviam que o alvéolo era preenchido por sangue extravasado dos vasos do ligamento periodontal e do forame apical, logo após o trauma da exodontia durante as primeiras vinte e quatro horas (Amler, 1969). Ressalta-se que a formação do coágulo é fundamental para as fases subseqüentes da reparação tecidual (Yugoshi et al., 2002).

A cascata de reações inflamatórias que é ativada imediatamente após a exodontia inicia a reparação alveolar. Este processo é dependente das plaquetas encarregadas durante o reparo de dirigir os mediadores químicos como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de transformação- β (TGF- β) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF) (Irinakis, 2006; Gürbüz et al., 2008, 2010).

A proliferação celular, iniciada com os eventos vasculares e celulares da inflamação nas primeiras horas pós exodontia, caracteriza-se pela diminuição do oxigênio e pH, condições necessárias para a atividade de células como os polimorfonucleares neutrófilos e macrófagos. Estes últimos são encarregados da produção de diversos fatores de crescimento como o do endotélio vascular (VEGF), o transformação- β - (TGF- β) e, o fibroblástico (FGF). Mediadores como estes estimulam a atividade celular, provocando aumento do número de mitoses assim como a invasão do coágulo sanguíneo pelos fibroblastos, e a quimiotaxia

durante todo o processo de reparação (Lynch et al., 1999; Cardaropoli et al., 2005; Trombelli et al. 2008).

No segundo dia após a exodontia o interior do alvéolo exibe um coágulo mais organizado e fibroso. Remanescentes do ligamento periodontal permanecem aderidos às paredes alveolares (Kanyama et al., 2003). Aproximadamente sete dias pós a exodontia o coágulo sanguíneo vai sendo remodelado e posteriormente é substituído gradativamente, por tecido de granulação apresentando proliferação de células mesenquimais osteoprogenitoras. (Amler, 1969; Irinakis, 2006; Trombelli et al., 2008).

Após uma semana o processo de reparo do osso alveolar inicia sua remodelação, angiogênese e modificação do tecido de granulação orientada pelos fibroblastos. Estas células oriundas do ligamento periodontal (Brandão et al., 2002) e da medula óssea se diferenciam, proliferam e sintetizam fibras colágenas do tipo III. Por volta de duas semanas a porção marginal do alvéolo está coberta com tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos e células inflamatórias (Irinakis, 2006).

Da quarta a sexta semana a mucosa alveolar encontra-se queratinizada e a maior parte do alvéolo vai sendo preenchida por tecido ósseo imaturo. Na substituição de tecido conjuntivo por osso alveolar trabeculado há deposição de matriz orgânica com formação de um tecido osteoide. Depois de seis semanas a porção marginal do alvéolo apresenta ilhas de trabeculado ósseo imaturo (Amler, 1969).

Finalmente ocorrem o processo de mineralização da matriz e formação de trabéculas ósseas maduras correspondentes a fase de diferenciação e mineralização óssea. Embora a deposição de osso continue por vários meses, o volume ósseo neoformado não atinge o nível original da crista óssea alveolar na altura dos dentes vizinhos (Irinakis, 2006).

A sequência de eventos no processo reparativo dos alvéolos de ratos tem sido descrita na literatura como comparável morfológicamente aos eventos da reparação em humanos. Tem-se demonstrado que este processo acontece de forma semelhante exceto pela precocidade dos eventos com que acontece em ratos. Assim este modelo animal do processo de reparo ósseo alveolar pós exodontia pode ser considerado um modelo válido (Kanyama et al., 2003, Elsubeihia; Heersche 2004, Calixto et al., 2007).

A maior proporção da neoformação óssea e a máxima mineralização se apresenta na terceira semana (Calixto et al., 2007). Sendo que alvéolo dos incisivos superiores em ratos repara em até as seis semanas

Em ratos o processo de reparação alveolar em molares pode ser dividido em três fases segundo Bodner et al. (1993) e Elsubeihia e Heersche (2004). Na primeira fase, do primeiro ao quinto dia, ocorre a organização do coágulo e a cobertura parcial do alvéolo por tecido epitelial. A fase de formação óssea acontece por volta do quinto ao vigésimo dia e, a fase remodelação óssea do vigésimo ao sexagésimo dia pós-operatório.

Aproximadamente quatro dias após a exodoncia de molares em ratos, os alvéolos estão preenchidos pelo tecido de granulação, ocorrendo o início de neoformação óssea partindo da região apical do alvéolo e na cortical alveolar. Foi observado que há neoformação óssea também na periferia do osso alveolar e presença de osteoclastos na região interradicular dos alvéolos. Após oito dias o alvéolo apresenta-se coberto por epitélio e cerca de dois terços preenchidos por trabéculas de osso neoformado. Após quatorze dias o alvéolo estava com sua neoformação óssea quase que completa com certo grau de maturação (Izuka et al., 1992; Trombelli et al., 2008; Marzola, 2008).

A neoformação óssea continua até trinta dias, onde dificilmente haverá diferencia entre as paredes do alvéolo e osso neoformado dentro do alvéolo. A fase de remodelação no processo de reparo alveolar implica na perda em altura do rebordo alveolar em humanos tanto quanto em ratos, sendo que o período de maior redução na altura dos rebordos alveolares acontece entre os cinquenta e seis dias até cento e doze dias pos-exodontia (Elsubeihia; Heersche, 2004).

2.2 Alveolite

O termo alveolite apresenta terminologia variada na literatura. Esta complicação pós operatória é conhecida também por alvéolo seco (Crawford, 1986) osteíte alveolar, alveolite fibrinolítica, alveolite seca dolorosa, osteomelites localizada, cicatrização alveolar atrasada, alvéolo séptico, alvéolo necrótico, e alveolalgia (Kolokythas et al.; 2010). Os termos alvéolo seco e osteítes alveolar são

os mais comumente utilizados na literatura de língua inglesa (Kolokythas et al., 2010).

2.2.1 Aspectos Clínicos da Alveolite

Vários conceitos descrevem o quadro clínico de uma alveolite, que possivelmente podem ser discrepantes nos critérios de diagnóstico, mas coincidem com a presença de dor localizada e com o alvéolo vazio sem a presença de coágulo organizado ou tecido de granulação clinicamente visível (Blum, 2002; Kolokythas et al., 2010).

A alveolite caracteriza uma complicação relacionada ao processo de reparação do alvéolo ocorrendo depois da avulsão dental após a formação do coágulo e, antes da organização do tecido de granulação (Houston et al., 2002; Rodriguez, 2008).

Compreendem um quadro de natureza inflamatória que envolve as porções ósseas mais superficiais do alvéolo dentário (Gregori; Campos, 2004).

Recentemente a alveolite é representada como dor pós-operatório no local da exodontia e nas regiões circunvizinhas. Esta sintomatologia pode aumentar em gravidade em qualquer momento entre o primeiro e o terceiro dia pós-operatório. O quadro clínico é acompanhado por desintegração parcial ou total do coágulo sanguíneo podendo levar ou não a presença de halitose (Blum, 2002; Marzola; 2008; Kolokythas et al., 2010).

A ausência do coágulo permite a exposição óssea, e permanência de remanescentes necróticos que podem provocar halitose e dor aguda. A dor experimentada acomete as funções bucais diárias, podendo provocar perda de sono, além de debilitar o paciente. Alguns indivíduos podem apresentar queixa de dor irradiada, continua e intensa ipsilateralmente ao ouvido e à região temporal, assim como linfadenopatia regional, febre, inflamação da gengiva marginal (Vezeau, 2000; Blum, 2002; Kolokythas et al., 2010).

2.2.2 Aspectos Histológicos

Histologicamente caracteriza-se pela presença de remanescentes de coágulo sanguíneo, abundante infiltrado inflamatório formado por leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, linfócitos e histiocitos que podem se estender até o alvéolo vizinho. Reabsorção óssea (Cury et al., 1983; Melo Júnior et al., 2002; Felix 2006; Cardoso 2009) mas nem sempre é freqüente (Birn, 1973). Áreas de necrose cortical óssea foram observadas (Cury et al., 1983). No sexto dia o epitélio mostra solução de continuidade, exibindo elevado número de neutrófilos polimorfonucleares, e as paredes ósseas, exibem reabsorção (Cury et al., 1983; Carvalho et al., 1990; Melo Júnior et al., 2002; Felix, 2006). No interior do alvéolo há presença de fibrose (Melo Júnior et al, 2002) e neoformação de tecido conjuntiva (Carvalho et al., 1990; Felix, 2006; Cardoso, 2009) com presença de fibroblastos e capilares sanguíneos e, em alguns casos nos terços médio e apical, há presença de trabéculas ósseas neoformadas (Carvalho et al., 1991). A mucosa gengival apresta solução de continuidade, com células de degeneração (Cury et al., 1983). Após quinze dias o epitélio oclui o alvéolo, e no seu interior no terço médio e apical, encontra se ocupado por tecido conjuntivo neoformado e trabeculado ósseo difuso pelo terço médio, mas no estudo de Cury et al. (1983) ainda há presença de reabsorção da parede óssea alveolar no terço médio, substituída parcialmente por tecido ósseo neoformado, e no estudo de Melo Júnior et al. (2002) a neoformação óssea se mistura com a presença de infiltrado mononuclear. No período de vinte e um dias ocorre a maturação do trabeculado ósseo alveolar (Carvalho et al., 1990, 1991). Após vinte e oito dias o epitélio encontra se regenerado na maioria dos casos, e o tecido conjuntivo intertrabecular é mais rico em fibras colágenas junto ao terço médio, havendo algumas trabéculas ósseas neoformadas (Carvalho et al. 1990,1991, Felix, 2006; Cardoso, 2009).

2.2.3 Etiopatogenia

A patogênese da alveolite ainda não é bem entendida, entretanto há varias teorias, tentando explicá-la. Acredita-se que seja uma complicação multifatorial relacionada a presença de infecção bacteriana pré-operatória, trauma cirúrgico excessivo e desequilíbrio na atuação de mediadores bioquímicos da inflamação (Houston et al., 2002; Martín et al., 2003; Rodriguez, 2008; Noroozi; Philbert, 2009; Nogales et al, 2008).

A ocorrência de um aumento na atividade da atividade fibrinolítica local, restrita ao alvéolo, foi descrita, com origem principalmente no osso alveolar na fase inflamatória inicial do processo de reparo. Ressaltava-se ainda a possibilidade do tecido gengival e da mucosa adjacente exercer algum papel nessa fibrinólise (Birn, 1970).

A presença de fragmentos dentários, ósseos e contaminação bacteriana no interior do alvéolo, associados ao trauma cirúrgico estimulam as primeiras células de defesa, os monócitos e macrófagos a produzirem cininas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e interleucina 1 (IL-1), que regulam as proteases séricas especializadas na degradação de fibrina, como o ativador do plasminogeno tipo urocinina (uPA), e o inibidor da ativação de plasminogênio 1(PAI-1). Na alveolite há aumento da atividade fibrinolítica diretamente relacionada com o aumento da atividade do ativador tecidual de plasminogeno (tPA) (Serrati et al., 2006).

A atividade fibrinolítica provoca a liberação de grandes quantidades de ativadores teciduais dentro do alvéolo (Nitzan, 1983) como consequência ao trauma cirúrgico ou infecção presente (Birn, 1973; Serrati et al., 2006). Estes ativadores liberam enzimas importantes na geração de dor, como bradicinina e cininas (Birn, 1972) o que explicaria a presença deste sintoma após a desintegração do coagulo sem a presença de outros sinais clínicos da inflamação como rubor, calor e secreção purulenta.

O aumento da atividade fibrinolítica segundo Birn (1970), Nitzan (1983) e Serrati et al. (2006) pode ser a explicação da desintegração total ou parcial do coagulo, após o segundo dia pós-extração.

A liquefação do coagulo determinada pela atividade fibrinolítica (Birn 1970, 1971 e Cardaropoli et al., 2005) é causada pelas cininas teciduais liberadas na

inflamação por ativação direta ou indireta do plasminogeno no sangue. Na liberação de ativadores teciduais diretamente após o trauma nas células do osso alveolar, o plasminogeno, que encontra-se na rede de fibrina assim que é formado é transformado em plasmina, provocando a lise do coágulo pela desintegração de fibrina, isto acontece na presença de pro - ativadores e ativadores teciduais u plasmáticos (Birn 1971, Serrati et al., 2006).

Estes ativadores têm sido classificados como diretos os fisiológicos e os indiretos não fisiológicos e, posteriormente subclassificados de acordo a sua origem como intrínsecos, aqueles originados de componentes do plasma, como o Fator XII e uroquinase, que são mediados por leucócitos. Os ativadores extrínsecos, originados fora do plasma ou sangue; como o plasminogeno tecidual (Birn, 1971). Os ativadores indiretos abrangem substâncias como as estreptoquinases e estafiloquinases que são produtos bacterianos que se ligam ao plasminogeno formando um complexo ativador que se agrupam a outras moléculas de plasminogeno e à plasmina (Blum, 2002).

A alveolite verdadeira onde há uma perda prematura parcial ou total do coágulo deve ser distinguida de algumas condições que evitam a formação inicial do coágulo como: hipovascularidade do osso alveolar como em alterações vasculares ou hematológicas, osteonecrose induzida por radioterapia, osteopetrose, doença de Paget e displasia cemento-óssea (Vezeau, 2000).

A bactéria anaeróbia *Treponema denticola*, apresenta atividade fibrinolítica e, liquefação do coágulo sem provocar sintomas clínicos característicos de infecção, como rubor, inflamação, formação de pus e, já foi isolada em casos de alveolite (Nitzan, 1983). O *Treponema denticola*, é um colonizador tardio da cavidade bucal, relacionado com a doença periodontal, apresentando maior propriedade de liquefação comparada com outras bactérias da cavidade bucal, o que explica a rara prevalência em crianças.

Em uma meta-análise de ensaios clínicos randomizados controlados quanto a efetividade da profilaxia antibiótica nas cirurgias de terceiros molares, observaram que a utilização de profilaxia antibiótica sistêmica é capaz de reduzir 2.2 vezes o risco de alveolite, proveniente de possível contaminação bacteriana associada à fibrinolise do coágulo como fator etiológico (Ren; Malmstrom, 2007).

2.2.4 Incidência

A incidência da alveolite aumenta proporcionalmente com a idade, sendo mais freqüente na quinta década de vida, entre os 40 a 45 anos de idade. Apresenta-se em 1 a 4% dos pós-operatórios de exodontias de rotina e varia de 5 a 30% nas cirurgias de terceiros molares inferiores retidos (Noroozi; Philbert, 2009). Estes índices de incidência podem levar a dúvida, já que a atividade fibrinolítica do osso alveolar é igual na região anterior e posterior, mas pode estar relacionado com a liberação dos ativadores nas duas regiões (Birn, 1970).

As exodontias pela via não alveolar apresentam uma incidência dez vezes maior, (Blum, 2002) e, também há maior freqüência em pacientes submetidos à exodontia simples do que exodontias múltiplas (Nusair; Younis 2007).

2.2.5 Fatores Predisponentes

Acredita-se que o desenvolvimento da alveolite tenha caráter multifatorial, e que alguns fatores predisponentes mais comuns possam estar relacionados a esta complicação.

O gênero feminino tem maior predisposição ao desenvolvimento da alveolite (Blum, 2002; Oginni, 2008; Noroozi; Philbert, 2009; Kolokythas et al., 2010), e a probabilidade podem estar aumentada em três vezes nas mulheres que utilizam anticoncepcionais orais em relação àquelas que não tomam (Garcia et al., 2003). Tem sido proposto que os estrogênios contidos nos anticoncepcionais orais podem aumentar a atividade fibrinolítica no plasma (Oginni, 2008), afetando a estabilidade do coagulo após a exodontia. Acredita se que a ativação indireta do sistema fibrinolítico (aumentam os fatores, VII, X e plasminogeno e diminuição do ativador inibidor de plasminogeno I. aumentado desta forma a liquefação do coagulo (Norris; Bonnar, 1997; Uchikova; Pehlinavov, 2008).

A atividade fibrinolítica é menor por volta do vigésimo terceiro ou vigésimo oitavo dia do ciclo menstrual, por que os primeiros vinte e um dias faz parte do ciclo ativo de estrogênio e os sete dias seguintes são livres de estrogênio. Para Noroozi

e Philbert (2009) as mulheres que são submetidas a cirurgias naquele período do ciclo menstrual têm uma menor possibilidade de apresentar alveolite e assim, o autor, recomenda evitar as exodontias no primeiro e no vigésimo dia do ciclo menstrual onde os níveis de estrogênios estão mais altos.

Quanto à idade, vários estudos sustentam que a alveolite raramente acontece na infância, mas mostram uma incidência aumentada com a idade. Alguns autores recomendam realizar as exodontias de terceiros molares impactados antes dos vinte e quatro anos para evitar complicações como a alveolite. Acreditam que com a idade há alterações na densidade óssea alveolar que poderiam potencializar o trauma cirúrgico e o risco de alveolite (Blum, 2002; Baqain et al, 2008; Noroozi; Philbert, 2009; Kolokythas et al., 2010).

O trauma e a dificuldade cirúrgica apresentam um papel significativo no desenvolvimento da alveolite (Blum, 2002; Noroozi; Philbert, 2009; Kolokythas et al., 2010). O trauma excessivo provoca um atraso no processo de reparo (Birn, 1973) e, este fato está relacionado às compressões no osso alveolar durante os procedimentos da avulsão dentária que poderiam impedir a proliferação vascular para os tecidos em reparo além de uma possível trombose dos vasos subjacentes, o que pode provocar a redução da perfusão sanguínea (Blum, 2002). O trauma cirúrgico provoca dano nas células do osso alveolar provocando inflamação no osso medular e a subsequente liberação de ativadores teciduais no alvéolo, precipitando à atividade fibrinolítica (Birn, 1973).

Hábitos como o tabagismo, também, podem influenciar um maior risco de alveolite. A nicotina contida nos cigarros é absorvida pela mucosa oral, produzindo liberação de catecolaminas endógenas, e provocando vasoconstrição e diminuição na perfusão sanguínea tecidual, (Balaji, 2008) diminuindo significativamente o preenchimento imediato do alvéolo pos-exodontia em tabagistas intensos (vinte cigarros por dia) quando comparados aos não fumantes (Meechan et al., 1988). A susceptibilidade de desenvolver uma alveolite aumenta quando o hábito de fumar não é suprimido no dia da exodontia (Balaji, 2008).

Infecções locais preexistentes como pericoronarite e doença periodontal avançada também podem aumentar a incidência de alvéolo seco (Kolokythas et al., 2010). Como descrito anteriormente uma grande atividade fibrinolítica foi observada em culturas de *Treponema denticola* obtidos de regiões bucais com presença de doença periodontal (Nitzan et al., 1983).

Procedimentos de irrigação excessiva e curetagem do alvéolo, podem interferir na formação do coágulo, provocando um risco maior de desenvolvimento de alveolite (Birn, 1973). A literatura mais atual, entretanto, recomenda a irrigação trans-operatória antes da formação do coágulo como medida de anti-sepsia do alvéolo, além da diminuição da colonização bacteriana (Blum, 2002; Deboni, 2009).

A literatura é controversa com relação aos efeitos anestésicos na incidência da alveolite (Turner, 1982; Birn, 1973; Meechan et al., 1988; Kolokythas et al., 2010). É conhecido o desenvolvimento de alveolite, inclusive em pacientes submetidos à exodontias sob anestesia geral, sem a utilização de anestésico local. A isquemia transitória provocada pela infiltração de anestésicos com vasoconstrictor poderia perdurar de duas a três horas e ser seguida por hiperemia reativa, o que poderia tornar irrelevante sua participação na desintegração do coágulo (Birn, 1973). A aplicação repetida de injeções intraligamentais aumenta a probabilidade de desenvolver à alveolite em até 10.9% quando comparado a infiltrações locais ou bloqueios regionais (Meechan et al., 1988).

2.2.6 Classificação clínica

Podem existir dois tipos de alveolite: Alveolite por corpo estranho ou úmida e seca (Gregori; Campos, 2004). A primeira caracterizada pela presença de um corpo estranho como fragmento de dente ou ainda osso ou material exógeno que possa ficar dentro do alvéolo e, provocar um processo inflamatório crônico, retardando assim o processo de reparo e, não representa grande sintomatologia dolorosa para o indivíduo acometido. Clinicamente o alvéolo se apresenta preenchido por um tecido morulado bastante sangrante, muitas vezes com área de secreção inflamatória central. Na alveolite seca, por sua vez, a sintomatologia dolorosa é bastante grave, o hálito do indivíduo é fétido e, o alvéolo apresenta-se desnudo não exibindo a presença do coágulo em seu interior. Muitas vezes, na alveolite seca as bordas superficiais do tecido ósseo alveolar e gengiva marginal apresentam-se com aspecto necrótico.

Esta complicação foi ainda classificada em três tipos: alveolite superficial marginal, a supurativa, e a seca (Hermesch et al., 1998). Na marginal a mucosa peri-alveolar encontra-se inflamada e parcialmente coberta por tecido granulomatoso, sendo doloroso durante a mastigação. Na supurativa, o coágulo é infetado e coberto por uma membrana cinza-esverdeada podendo conter fragmentos dentais ou ósseos. A intensidade da dor é de moderada a intensa, e o paciente pode apresentar febre. No alvéolo seco, as paredes do alvéolo estão expostas com perda total ou parcial do coágulo, o tecido exposto pode mostrar uma coloração escura e odor fétido, dor contínua, intensa e freqüentemente irradiada, podendo exibir também, hipertermia local e linfadenopatia regional.

2.2.7 Medidas de prevenção do quadro de alveolite

Numerosos métodos e técnicas têm sido propostas para a prevenção da alveolite, no entanto este assunto continua controverso e sem resultado comprovado.

Métodos farmacológicos utilizados na prevenção da alveolite incluem o uso de preparados antibióticos inseridos no alvéolo após a exodontia ou a utilização de anti-sépticos na forma de colutorios (Noroozi; Philbert; 2009). Alguns autores como Blum (2002), Noroozi e Philbert (2009) recomendam a administração de antibióticos, por via sistêmica ou local, para a prevenção da alveolite, incluindo as penicilinas, clindamicina, eritromicina e o metronidazol. De todos os antibióticos sistêmicos, o metronidazol mostrou-se mais efetivo nos estudos randomizados duplo cego. Estes antibióticos, para o autor, além de apresentar poucos efeitos colaterais, possui ainda um espectro reduzido, atingindo primeiro os microorganismos anaeróbios, reduzindo a chance de resistência bacteriana (Blum, 2002).

O uso profilático do antibiótico tem sido reportado como aquele mais efetivo para redução da incidência que seu uso terapêutico (Ren; Malmstrom, 2007; Kolokythas et al., 2010). No entanto ele não é necessário a menos que existam sintomas de prostração e linfadenopatia, imunodepressão ou em pacientes com história múltipla de alveolite (Noroozi; Philbert, 2009).

Os antibióticos são eficazes na prevenção da alveolite, mas eles apresentam um alto custo além da possibilidade de gerar resistências (Blum, 2002).

Vários estudos têm sido realizados para verificar a efetividade dos medicamentos tópicos na prevenção da alveolite, seja o antibiótico isoladamente ou combinado a outras substâncias ou fármacos (Blum, 2002; Kolokythas et al., 2010; Bosco et al., 2008). Os métodos de aplicação são variados, desde a utilização de medicamentos na forma em pó como em suspensão aquosa, ou esponjas de fibrina impregnadas com tetraciclina, clindamicina, ou ainda a lincomicina, apresentando bons resultados (Noroozi; Philbert, 2009).

A utilização de soluções anti-sépticas também tem sido indicada na prevenção. A clorhexidina tem confirmado ser um bom agente profilático para a alveolite. A aplicação pré, transoperatórios e pós-operatórios tem sido estudada, mostrando bons resultados (Kolokythas et al., 2010). A aplicação tópica do gel de clorhexidina 0.2% no alvéolo de terceiros molares retidos diminui consideravelmente a incidência de alvéolo seco, quando comparado a colutorios de clorhexidina 0.12% em circunstâncias similares (Hermesch et al., 1998; Hita et al., 2008). A aplicação tópica do gel durante a semana pos-exodontia, também evidenciou uma diminuição significativa da alveolite após a exodontia de terceiros molares mandibulares (Mínguez et al., 2009). Os colutorios com clorhexidina 0.12% no dia da cirurgia e vários dias após tem representado alguns benefícios profiláticos (Caso et al., 2005).

O uso de plasma rico em plaquetas também tem sido aplicado como tratamento preventivo da alveolite, observando uma diminuição significativa do risco de apresentar essa complicação, inclusive em pacientes suscetíveis a esse risco quando comparado com pacientes que não foram tratadas com plasma rico em plaquetas (Rutkowski et al., 2007; Alissa et al., 2010).

As melhores medidas preventivas para a redução da incidência de alveolite são, a garantia de uma boa higiene bucal, do controle de infecções pré-operatórias e, da execução de procedimentos sem trauma excessivo. Isso tudo, além da programação das exodontias entre o vigésimo terceiro e vigésimo oitavo dia do ciclo menstrual nas mulheres, além de todos os cuidados de uma perfeita esterilização e descontaminação (Oginni, 2008).

2.2.8 Tratamento da alveolite

Nos casos de alveolite as opções de tratamento geralmente são dirigidas a cuidados paliativos, pois não existe consenso quanto a sua etiopatogenia. Muitos autores concordam que o tratamento deve ser direcionado ao alívio da sintomatologia dolorosa até que o reparo do alvéolo tenha seu curso normalizado (Blum, 2002; Kolokythas et al., 2010; Noroozi; Philbert 2010). Na maioria dos casos medidas locais e a administração de analgésicos sistêmicos ou antibióticos são necessárias (Dias et al., 2008; Kolokythas et al. 2010).

Nos casos de alveolite por corpo estranho sugere-se, realizar anestesia local, remover o corpo estranho por curetagem e suturar a ferida novamente. Quanto à alveolite seca, o alvéolo deve ser submetido a irrigações com solução antisséptica e um apósito tampão intra-alveolar contendo medicamentos com atividade anti-séptica, analgésica e de estímulo à granulação (Gregori; Campos, 2004). É proposto também, irrigações com solução de soro fisiológico e curetagem para induzir a formação de outro coágulo (Turner, 1982). Outro autor ressalta que esta conduta não é recomendável por aumentar a dor (Blum, 2002). O preenchimento do alvéolo com óxido de Zinco e eugenol, também é renomeado (Shoji et al., 2008; Noroozi; Philbert 2009; Burgoyne et al., 2010) além da antibioticoterapia sistêmica, analgésicos e anestésicos para controle da dor (Burgoyne et al., 2010).

A utilização de irrigações e aspiração do alvéolo com solução salina estéril após anestesia local é sugerida, com o intuito de remover seqüestros, tecido necrótico e bactérias. Aconselhavam ainda a prescrição de analgésico por via oral. Recomendavam também a orientação ao paciente para continuar as irrigações, com clorhexidina 0.12% em casa ou no consultório até não apresentar mais tecido não viável clinicamente (Turner, 1982; Blum. 2002). Ainda, o alvéolo deve ser irrigado com solução antisséptica e, o apósito medicamentoso de preenchimento seja trocado a cada dois ou três dias, até a remissão da dor (Noroozi; Philbert, 2009).

O medicamento para preenchimento do alvéolo deve ser antibacteriano, e ter propriedade anestésica tópica (Turner, 1982). O preenchimento do alvéolo pode atrasar o processo de reparo ou aumentar o risco de infecção.

Estudos experimentais em ratos, com alveolite induzida, pesquisaram o processo de reparo ósseo com Alveosan, uma pasta contendo ácido acetilsalicílico,

bálsamo do Peru, Eugenol, e resina ou lanolina como veículo (Cury et al., 1983; Carvalho et al., 1991; Felix, 2006), Alveoliten composto por 2% de óxido de zinco, 8% de iodofórmio, 10% de paramonoclorofenol, 20% de resina branca e 60% de excipiente (Carvalho et al., 1990) e por pasta a base de metronidazol (Cardoso, 2009) mostraram serem compatíveis com o processo de reparo alveolar e, não interferir na neoformação conjuntiva e óssea.

A composição do Alveoliten mostra se agressiva a quadros infecciosos quando comparado ao Alveosan pela presença de paramonoclorofenol. Bactericida e do iodofórmio como anti-séptico. (Carvalho et al., 1990)

São conhecidos tratamentos oriundos da medicina natural como aplicação de extratos de plantas como o *Schinus terebinthifolius*, em ratos apresentando atividade antimicrobiana além de favorecer o reparo alveolar, observaram focos de reabsorção nas paredes do alvéolo e ao mesmo tempo início de neoformação óssea já no sexto dia.

O uso de apiterapia, acupuntura, aplicação de laser de bioestimulação e ozonioterapia (Martin et al., 2003), também apresentaram bons resultados, assim como o uso de óleo de girassol ozonizado (Oleozon®) quando comparado a aplicação de Alvolgil® acompanhada de prescrição de antibiótico sistêmico (Cruz et al., 1997).

2.3 Ozonio

O ozônio é uma molécula formada por três átomos de oxigênio (O_3) e instável, de forma gasosa em condições normais de pressão e temperatura. É produzido por descarga elétrica ou por radiação ultravioleta. Os geradores de ozônio de uso médico utilizam o princípio de descarga elétrica tipo corona e oxigênio medicinal com gás insumo. O gás ao passar na descarga elétrica formada entre dois eletrodos separados por um dielétrico e um espaço dedicado ao fluxo gás, da origem a formação de ozônio. A concentração de ozônio em oxigênio depende do fluxo do gás e das condições elétricas da descarga elétrica.

O ozônio foi relatado em 1840, pelo químico alemão Christian Friedrich Shobein. A partir do século vinte vem-se ampliando as aplicações uso na ozonioterapia (Bocci, 2006)

O ozônio é um oxidante potente, quando aplicado nos tecidos ele reage imediatamente com várias moléculas presentes nos fluidos biológicos: proteínas, hidratos de carbono e preferencialmente gorduras de ácidos insaturados (PUFAS) (Bocci, 2004).

A reação inicial que o ozônio sofre quando em contato com os fluidos corporais permite a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) as quais atingem varias reações bioquímicas do sangue ex vivo. Na segunda reação ha uma peroxidação lipídica, isto implica a geração de peróxido de hidrogênio, sendo estes os responsáveis o pelos efeitos biológicos e terapêuticos tardios (Bocci, 2006; Deboni, 2009).

Os primeiros trabalhos desenvolvidos sobre a ozonioterapia se debruçaram sobre infecções superficiais como úlceras, abscessos e fístulas, onde os efeitos antimicrobianos e oxidantes do ozônio têm sido estudados (Siqueira et al., 2000).

O ozônio tem sido efetivo em patologias relacionadas à necrose avascular já que ativa a circulação sanguínea, aumentando os glóbulos vermelhos e a concentração de hemoglobina, (Bocci, 2004) melhora os processos de diapedese e fagocitose, estimula o sistema fagocitário mononucleotico. Particularmente em vasos sanguíneos de pequeno calibre, como os que se encontram na circulação da maxila e mandíbula. Estes vasos mostram preenchimento rápido dos elementos hemáticos assim como ativação marcada da circulação, isto faz que o leito vascular muito rico (Agrillo et al., 2007).

Os processos de oxigenação tecidual, assim como o metabolismo de cálcio, fósforo e ferro, e antibacteriano são estimulados pela ozonioterapia, e também tem apresentado propriedades analgésicas, bem toleradas pelos pacientes (Bocci et al., 2009).

Tem sido indicado aumento dos benefícios cirúrgicos e farmacológicos dos pacientes que apresentam osteonecrose dos maxilares, quando administrado ozonioterapia em ciclos de pré e pos-operatoriamente, consiste em oito sessões de três minutos cada uma somado a antibioticoterapia e terapia antifúngica, em casos de pacientes com mieloma multiple o osteonecrose dos maxilares induzido por bisfosfonatos. (Agrillo et al., 2006, 2007a, 2007b; Petrucci et al., 2007) Nestes casos

a ozonioterapia estimula reações biológicas, que favorecem o metabolismo do oxigênio, e as propriedades antibacterianas, ajudando na reparação da fisiologia normal do osso, induz a reparação dos tecidos assim pela limpeza das lesões osteonecroticas. Isto permite a cicatrização da mucosa (Bocci, 2004).

O ozônio pode ser utilizado sob a forma de gás, água, e em veículo aquoso ou diluído em óleo, sendo empregados óleos de origem vegetal como oliva e girassol (Bocci, 2004; Bocci et al., 2009).

Irrigações diárias com água ozonizada podem atuar no processo de reparação, de forma dependente da concentração utilizada (Traina, 2008).

As irrigações com água ozonizada, na concentração de quatro (4) ppm nos alvéolos pos-exodontia em humanos, diminuiu a colonização de microrganismos anaeróbios no interior de alvéolos e não apresentaram efeito tóxico no processo de reparação tecidual das feridas alveolares (Deboni, 2009).

O óleo ozonizado é um composto obtido da mistura de óleo com o gás ozônio, também pode ser ozonizado o azeite de oliva. Ao ozonizar o óleo ou azeite, se formam uma série de subprodutos, entre eles os peróxidos (Menendez et al., 2002) que dão a característica germicida, tornando-se útil no tratamento de feridas infectadas, fistulas e outros processos sépticos locais. (Bocci, 2004; Grootveld et al., 2004; Bocci et al., 2009). Além disso, esses peróxidos desempenham várias funções no organismo que incluem: estimulação a vários sistemas enzimáticos de oxido-redução, por influência possivelmente sobre o transporte de oxigênio aos tecidos e na cadeia respiratória mitocondrial; bloqueio dos receptores virais e morte de células infectadas por vírus; assim como um efeito sinérgico na capacidade fagocitária (Skalska et al., 2008. Bocci et al., 2009).

Estudos em humanos demonstraram que ha diminuição de microorganismos, especialmente anaeróbios no sangue, em pacientes que foram submetidos a exodontias após irrigações com peróxido de hidrogênio (Yamalik et al., 1992).

As mudanças das propriedades químicas de cinco óleos vegetais com diferentes composições dos ácidos graxos foram estudadas. Foram analisados o óleo de oliva, girassol, semente de canola, milho, e semente de uva, sendo que o nível de iodo foi inicialmente mais alto no óleo de girassol, sendo isto relacionado com o alto conteúdo de ácidos graxos não saturados, especialmente poliinsaturados. A análise do índice de peróxido, que esta relacionada com a reação do ozônio na

dupla ligação de carbono-carbono nos ácidos graxos insaturados, aumenta durante o processo de oxidação e é maior no óleo de oliva e no de óleo de girassol (Kataoka, 2009) .

Os compostos oxigenados presentes no óleo ozonizado são os responsáveis pela grande atividade biológica deste assim como pelas atividades antimicrobianas e antifúngicas (Cruz et al., 1997; Sechi et al., 2001; Menendez et al., 2002; Rodrigues et al., 2004; Valacchi et al., 2005; Skalska et al., 2008).

2.3.1 Uso terapêutico do óleo Ozonizado.

Os óleos vegetais ozonizados tem sido reportados de exercerem efeitos benéficos em estudos experimentais na reparação de ferimentos (Rodrigues et al., 2004) assim como no tratamento de úlceras induzidas por etanol em ratos (Zamora et al., 2007) e no tratamento de úlceras por pressão em ratos (Sakazaki et al., 2007),

No tratamento com óleo ozonizado em úlceras geradas por pressão em ratos, observou-se aumento do tecido de granulação, provavelmente pela inibição de supuração e hemorragia por ativação plaquetária, estimulando a liberação de fatores de crescimento. (Sakazaki et al., 2007).

Em seres humanos o óleo ozonizado já foi testado em clínica médica para o tratamento de escaras e fístulas com dificuldades no tratamento ou ferimentos após cirurgias (Matsumoto et al., 2000), de úlceras, psoríase (Skalska et al., 2009), pé de atleta (Menéndez et al., 2002), osteonecrose dos maxilares induzido por bifosfonatos (Ripamonti et al., 2011).

Os óleos ozonizados têm a propriedade de estimular determinados sistemas enzimáticos antioxidantes, devido as que ativam reações oxigênio dependentes do metabolismo e do ciclo de Krebs e, também tem influência direta sobre a cadeia respiratória mitocondrial, o que provoca a formação de grandes quantidades de prótons que são necessários para restaurar a capacidade de amortecer os sistemas de defesa antioxidantes contra as espécies reativas de oxigênio, por isto modula a resposta imune e do metabolismo tissular (Mayor et al., 2010).

O óleo ozonizado controla a cascata de eventos nas fases de reparação desencadeando e modulando a fase inflamatória possui efeitos pro-inflamatórios e

antiinflamatórios, mas aplicações repetidas de óleo ozonizado na pele de ratos parecem produzir perda do pelo no local ou indução de reações de hipersensibilidade por contato, estes achados identificam uma nova função biológica do óleo ozonizado e indicam uma reação adversa nos casos de aplicações repetitivas (Kataoka et al., 2009; Kim et al., 2009).

O óleo de oliva ozonizado combina atividade antibacteriana e propriedades cicatriciais devido à liberação vagorosa de oxigênio nos tecidos hipóxicos estimulando a proliferação de fibroblastos, sendo efetivo para o tratamento de úlceras causado por isquemia (Bocci et al., 2009). A aplicação local do ozônio em tecido inflamado aumenta a quantidade de leucócitos locais e a liberação de fatores de crescimento pelos eritrócitos e plaquetas para a reconstrução tecidual pela construção da matriz extracelular, induzindo a síntese de proteínas (Bocci, 2004).

Na área odontológica ótimos resultados foram obtidos no tratamento da alveolite com o uso de óleo ozonizado (Guerra et al., 1997) mas também existem publicações com resultados promissórios para reparação periradicular (Vieira et al., 2007) como medicação intracanal (Siqueira et al., 2000; Vieira et al., 2007) estomatite protética, em comparação ao nistatina, sendo percebida uma melhora significativa e em menor tempo, em 91% dos pacientes (López et al., 2003) e pericoronarite (Mayor et al., 2010).

O óleo de oliva ozonizado quando aplicado em todos os tipos de ferimentos cutâneos crônicos, processos infecciosos, libera ozônio vagorosamente em comparação aos cremes utilizados produzindo um efeito desinfetante e estimulador dos processos reparativos (Valacchi et al., 2005).

As aplicações diretas do óleo ozonizado, conjugada a antibióticos profiláticos, para tratamento de lesões de osteonecrose dos maxilares, decorrente do uso de bisfosfonatos mostrou, ótimos resultados. Observaram que em setenta por cento dos pacientes necessitaram de menos de dez aplicações. Cada paciente foi tratado com duas aplicações por semana durante cinco semanas por 10 minutos. Salientam ainda que o óleo ozonizado possa ser um tratamento promissor, efetivo e simples para o tratamento da osteonecrose decorrentes de bisfosfonatos Ripamonti et al., 2011).

Estudos revelaram resultados satisfatórios quando o óleo ozonizado foi submetido a testes de toxicidade, tais como resultado negativo para o teste de dose letal como o LD50 (oral e intraperitoneal), irritação oftálmica e dérmica e foto

toxicidade, além dos ensaios de teratogenicidade e mutagenicidade (Grootveld et al., 2004).

O efeito terapêutico do óleo de oliva ozonizado em retalhos de espessura total realizados na pele de "*Guinea pigs*", foi avaliado, sendo reportado que ocorre uma aceleração da reparação do ferimento cutâneo. Descreveram também que ocorre uma promoção da síntese de colágeno e aumento na proliferação de fibroblastos no local do trauma. Os resultados imunoistoquímicos mostraram que ocorre um aumento na expressão dos fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação β (TGF- β), e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) no sétimo dia quando comparados com o grupo controle (Kim et al., 2009).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar comparativamente as características histológicas e histomorfométricas da reparação de alvéolos dentais de ratos, induzidos ou não ao processo de isquemia, tratados por óleo de girassol ozonizado ou Alveoliten®.

4 MATERIAL E METODO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, subcomissão de pesquisa experimental animal sob número 06/2009 e seguiu as regulamentações do Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA) (Anexo A).

4.1 Material

Foram selecionados oitenta e quatro ratos fêmeas “*Wistar albinus*” adultos pesando 200mg a 250mg aproximadamente. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno, forradas por maravalha estéril, (cinco animais por caixa) em condições de iluminação controlada por ciclos de 12 horas de luz por dia e temperatura variando entre 21 e 25°C. Os ratos foram alimentados com ração sólida (Ralston Purina of Brazil-São Paulo/SP- Brasil) e água *ad libitum*, com exceção das primeiras 24 horas pós-operatórias, quando a alimentação foi triturada.

4.2 Métodos

4.2.1 Exodontia do Incisivo superior direito

Todos os animais foram submetidos à exodontia do incisivo central superior direito. Para a realização dos procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados e sedados pela aplicação do anestésico via intramuscular na dose de 0.8mg/kg (cloridrato de cetamina, Dopalen® - Vetbrands) e do relaxante muscular via intramuscular na dose de 0,3mg/kg (cloridrato de xilazina, Rompum® - Bayer SA). Após a confirmação de ausência de reflexo, foi realizada anti-sepsia intraoral e extraoral com digluconato de clorhexidina a 0.12% (PerioGard, Colgate-Palmolive®,

Brasil). Os animais foram posicionados em uma bancada forrada por campo cirúrgico de tecido não tecido (TNT) estéril em decúbito dorsal com a cabeça cuidadosamente mantida e posicionada na direção do operador. Por sobre o animal foi colocado um campo estéril fenestrado do mesmo tecido expondo apenas a região da maxila e dos incisivos. A seguir foi realizada sindesmotomia e a exodontia do incisivo superior direito (Figura 4.1 e 4.2) de cada animal foi praticada empregando-se pinça de dissecação e espátulas em aço inox, estéreis, adaptadas para este fim seguindo modelos de Okamoto e Russo em 1973.

Figura 4.1 - Exodontia do Incisivo superior direito

Figura 4.2 - Incisivo superior direito

4.2.2 Indução da Alveolite e medicações

Em setenta e dois animais foi induzida isquemia alveolar pela introdução de um cone de papel absorvente de tamanho compatível ao do alvéolo (Figura 4.3), embebido em Adrenalina (1:100.000) por 5 minutos, procurando estabelecer uma condição clínica similar a da alveolite. Após os cinco minutos da aplicação do vasoconstrictor o alvéolo era irrigado com 0.1 ml de soro fisiológico estéril. Finalmente as bordas da mucosa gengival foram suturadas por fio de seda 4-0 (Ethicon – Johnson & Johnson, São José dos Campos/SP Brasil). Após quarenta e oito horas da indução do processo de isquemia e alveolite estes animais foram divididos em quatro grupos de acordo com os procedimentos pós operatórios de tratamento ou não dos alvéolos:

Grupo I – alvéolos preenchido por óleo de girassol (Mazola®) não ozonizado (Controle negativo) (n=20).

Grupo II - alvéolos preenchidos por óleo de girassol ozonizado com 87,3 mEq/Kg de peróxido e 0,4 acidez (Grupo Experimental, Figura 4.4) (n=20).

Grupo III - alvéolos preenchidos por pasta medicamentosa de uso convencional - Alveoliten®, Inodon Laboratórios, Porto Alegre, RS – Brasil (Controle positivo) (n=20).

Grupo IV – alvéolos não foram preenchidos por medicamento, mas a condição clínica da alveolite foi mantida para controle sem tratamento. (n=12).

Para o tratamento os animais foram sedados pelos mesmos fármacos utilizados para a anestesia geral, em doses padronizadas para tal efeito, posteriormente os animais foram avaliados clinicamente e realizados curativos conforme os grupos alocados em uma única aplicação. Para a inserção da medicação oleosa utilizou uma seringa plástica descartável de 20 ml com agulha 40x12mm adaptada. Para a aplicação do Alveoliten® empregou-se um cone de papel saturado com o medicamento. Tomou-se cuidado para que todo o alvéolo estivesse preenchido pelos medicamentos até a região apical.

Um quinto grupo (Grupo V) foi composto por doze animais que sofreram a exodontia do incisivo direito da mesma forma que os anteriores, mas não foram submetidos à indução de alveolite e nem tão pouco foram medicados.

Figura 4.3 - Introdução intra-alveolar do cone de papel com adrenalina 1(100.000)

Figura 4.4- Preenchimento do alvéolo com óleo Ozonizado

4.2.3 Metodologia para elaboração do óleo ozonizado

Para a produção de ozônio foi utilizado um gerador de ozônio marca Ozone & Life modelo O&L3.0, onde foi empregado oxigênio como gás insumo. O fluxo do oxigênio foi controlado por um regulador de fluxo.

Para a ozonização do óleo foi utilizado um lavador de gás com capacidade de 1,5 litros, onde foi colocado o óleo de girassol comercial em volume de 1 litro. Neste frasco foi injetado em forma continua durante seis horas um fluxo de 2,0 L/min de oxigênio/ozônio com concentração de 30 mg/L.

Foram realizados análises do óleo de girassol antes e após a ozonização dos seguintes parâmetros. Índice de acidez, Índice de lodo e índice de peróxido. (Laudos químicos – ITAL CQ 5833/2007 e CQ 6120/2009) (Anexo B,C).

Na figura 4.5 está ilustrado o diagrama experimental para elaboração do óleo ozonizado.

Figura 4.5 - Diagrama esquemático para elaboração de óleo ozonizado

4.2.4 Coleta das amostras de tecido ósseo alveolar

Os animais do estudo foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO₂) após o segundo, sétimo, décimo quarto dia e vigésimo primeiro dia após o tratamento medicamentoso dos alvéolos. Os animais do quinto grupo também seguiram o mesmo período para eutanásia para efeito de comparação.

A maxila direita foi separada da esquerda, realizando-se uma incisão ao nível do plano sagital mediano, acompanhando-se a sutura intermaxilar, e outro corte coronal com tesoura de ponta reta, posterior à face distal dos molares, o que permitiu a obtenção de uma peça cirúrgica com o alvéolo dental direito. Os espécimes obtidos foram fixados em formol 10% por no mínimo 24 horas e descalcificadas em solução de Etileno-Diamino-Tetracético (EDTA) em pH 8.3 por 30 dias. Posteriormente foi realizado um corte de 3mm na região cervical e 3mm na região apical, seguido do processamento para inclusão em parafina. Foram obtidos cortes coronais semi-seriados após a contagem de dez voltas da manopla do micrometro entre cada lâmina obtida do corte de cada animal. Foram obtidos no mínimo 10 cortes de 5µm de espessura de cada espécime. Os cortes foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE) e por Tricrômio de Masson seguindo a método padronizado pelo Laboratório de Patologia Bucal da FOU SP.

4.2.5 Análises Histomorfológica

Utilizando-se microscópio de luz convencional (Olimpus® CH2 – Olympus Optical Co. Ltd. – Japan), sob foco fixo e clareza de campo, com aumento inicial de 250X e final de 400X foram avaliados pelo menos seis cortes histológicos de cada espécime. Dois observadores de forma cega, sem que fosse possível identificar o grupo experimental ou os controles avaliaram os cortes de forma subjetiva por meio de uma escala arbitrária: (0) ausente (1) pouco (2) moderado (3) intenso e (4) muito intenso considerando na morfologia tecidual: a quantidade de infiltrado inflamatório, a proliferação de tecido de granulação e de fibroblastos e a síntese de matriz extracelular comparativamente entre grupos e períodos.

4.2.6 Análise Histomorfométrica

As imagens dos cortes semi-seriados de 5 μ m dos espécimes foram capturadas por câmera tipo CCD (Sony®) acoplada a microscópio Jeol® e placa de digitalização de imagens (Captivator®) e transferidas para software de morfometria digital (ImageLab2000®), utilizando computador Pentium® IV, 512MHz, monitor HP Pavillion®, 800X600 dpi. Imagens foram capturadas em aumento de 40X, na área do alvéolo, foram digitalizadas e analisadas, morfometricamente, de forma cega, determinando a área total do alvéolo (Figura 4.6) e a área de neoformação óssea em μ m² (Figura 4.7). Foram analisados seis cortes para cada espécime, obtendo-se uma média ao final. Esse método segue protocolo estabelecido no Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia (LIDO) da FOUSP.

Figura 4.6 - Área total do alvéolo

Figura 4.7 - Áreas neoformação óssea

4.2.7 Análises Estatísticas

Após a obtenção dos resultados histomorfológicos e histomorfométricos os dados foram tratados estatisticamente de forma descritiva baseados na obtenção de mediana, valores mínimos e máximos para os dados histomorfológicos e media e desvio padrão, para os dados histomorfométricos de cada grupo e período. Posteriormente os dados da histomorfologia e da histomorfometria, relacionados a neoformação óssea foram submetidos a análise de variância não paramétrica, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis, assim como as diferenças entre pares de tratamento com o testes de Mann-Whitney para a histomorfologia e de Conover para os dados da histomorfometria, Utilizando o programa estatístico Infostat (versión estudiantil), com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os grupos e subgrupos experimentais e controle. Sendo que para todas as análises, valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

Oitenta e quatro animais foram operados e fizeram parte da amostra inicial do estudo, visando possíveis perdas de animais ou de peças cirúrgicas. Na análise final foram utilizados dois cortes histológicos de cada peça cirúrgica. Foram excluídas as peças nas quais durante a avaliação histológica fossem observadas a presença de fragmento de dente no interior do alvéolo ou evidências de fratura do osso alveolar. A distribuição dos animais na amostra final do estudo (n=58) está ilustrada na tabela 1., especificada pelos grupos e períodos de sacrifício em dias.

Tabela 5.1 - Distribuição dos animais na amostra final do estudo por período (dias) em cada grupo

Grupos	2	7	14	21
GI	4	4	4	3
GII	4	5	4	3
GIII	4	3	3	4
GIV	2	-	1	3
GV	1	1	2	3

5.1 Descrição da Histomorfologia

5.1.1 Período de dois Dias

Grupo I (óleo de girassol): Os cortes apresentaram infiltrado inflamatório neutrofílico intenso e difuso. Áreas focais de edema e necrose estavam presentes. Notaram-se remanescentes de coágulo sendo reabsorvidos por macrófagos com substituição parcial por tecido de granulação. Em alguns espécimes observou-se

atividade osteoclástica assim como espaço sugestivo de material exógeno dentro do alvéolo.

Grupo II (óleo ozonizado): O aspecto histológico era semelhante ao do Grupo I, tanto no tocante a intensidade e qualidade da inflamação, quanto na atividade de reabsorção óssea. Material exógeno compatível com o óleo foi também observado nesse grupo.

Grupo III (Alveoliten®): A avaliação histológica evidenciou infiltrado inflamatório e tecido de granulação menos intenso do que nos grupos anteriores. Áreas de edema e necrose em alguns cortes estavam presentes. Em metade da amostra observou-se presença de material exógeno de coração eosinofílico, com formato poligonal, no interior do alvéolo.

Grupo IV (Alvéolos induzidos para a alveolite, mas sem medicação) Notou-se infiltrado inflamatório intenso e difuso, composto predominante por neutrófilos. Edema e necrose eram evidentes. Tecido de granulação maduro estava presente na periferia do alvéolo, ao redor do infiltrado inflamatório, exibindo vascularização intensa. Não se observou neoformação óssea neste grupo.

Grupo V (Alvéolos sem medicação e sem indução de alveolite) Observou-se tecido de granulação exuberante, reabsorção parcial de coágulo e, em áreas periféricas localizadas, já se notava neoformação óssea com deposição de osso imaturo.

Os resultados acima estão descritos na Tabela 5.2 e estão ilustrados pelas Figuras 5.1.

Figuras 5.1 - Fotomicrografias dos alvéolos dos grupos no segundo dias pos-tratamento HE- aumento 200x (A,B,C,D,E) e 400x (F).
 GI(A); GII(B) GIII(C); GIV(D) GV(E,F)
 AH= Áreas de Hemorragia; Ed= Edema ; EME=Espaço sugestivo de material exógeno; II =Infiltrado Inflamatório; NO= Neoformação óssea

5.1.2 Período de sete Dias

Grupo I (Óleo de girassol) observou-se área focal de infiltrado inflamatório neutrofílico, grande quantidade de tecido de granulação e feixes mais espessos de colágeno. Na periferia do alvéolo, notaram-se trabéculas ósseas imaturas exibindo início de coalescência.

Grupo II (óleo ozonizado) presença de infiltrado neutrofílico, ocupando grande extensão do alvéolo, tecido de granulação ao redor da área inflamada, na metade nas amostras. Observou-se grande quantidade de osteoclastos na parede do alvéolo. Um corte já apresentou formação de trabéculas ósseas imaturas.

Grupo III (Alveoliten®): Tecido de granulação ocupava toda a extensão do alvéolo. Observaram-se trabéculas ósseas neoformadas no sentido da periferia para o centro do alvéolo. Em poucas amostras havia ainda a presença de infiltrado inflamatório neutrofílico com material necrótico de permeio.

Grupo IV (Alvéolos induzidos para a alveolite, mas sem medicação): Os cortes evidenciaram área infiltrada inflamatória muito intensa e edema. Algumas áreas focais de tecido de granulação estavam presentes na periferia do alvéolo.

Grupo V (Alvéolos sem medicação e sem indução de alveolite): Os cortes não permitiram a avaliação histológica neste período.

Os resultados acima estão descritos na Tabela 5.2 e estão ilustrados pela Figura 5.2

Figura 5.2- Fotomicrografias dos alvéolos dos grupos no sétimo dia pos-tratamento
 HE 200x (A,C,E); 400x(B,D,F)
 GI(A,B); GII(C,D); GIII(E,F)
 II= Infiltrado Inflamatório; TC= Tecido conjuntivo; ON=Osso neoformado
 EV=Espaços vasculares

5.1.3 Período de quatorze dias

Grupo I (Óleo de Girassol) os cortes apresentam tecido granulação exuberante em meio a trabéculas ósseas imaturas, estas mais delgadas comparativamente aos outros grupos. Em alguns cortes observou-se ainda infiltrado inflamatório neutrofílico no interior do alvéolo, tecido de granulação ao redor da área inflamada e áreas focais de necrose.

Grupo II (Óleo ozonizado) A maioria dos alvéolos revelam, tecido granulação exuberante em meio a trabéculas ósseas imaturas. Em algumas secções, observou-se ainda infiltrado inflamatório neutrofílico com áreas de necrose.

Grupo III (Alveoliten®) Os cortes exibiram extensa formação de trabéculas coalescentes em toda a extensão do alvéolo e matriz extracelular composto por tecido conjuntivo frouxo com intensa vascularização. Num corte observou se tecido de granulação contendo espaços vazios sugestivos de ocupação anterior por material exógeno, este não visível nos preparados histológicos.

Grupo IV: (Alvéolos induzidos para a alveolite, mas sem medicação): Matriz extracelular com tecido conjuntivo denso por entre trabéculas ósseas neoformadas esteve presente estendendo-se da periferia para a região central do alvéolo. Em áreas focais, notou-se tecido de granulação com matriz extracelular mais frouxa.

Grupo V: (Alvéolos sem medicação e sem indução de alveolite) Observou-se grande quantidade de trabéculas ósseas neoformadas em toda a extensão do alvéolo, as quais eram mais espessas comparativamente às presentes no grupo III (Alveoliten).

Os resultados acima estão descritos na Tabela 5.2 e estão ilustrados pela Figura 5.3.

Figura 5.3- Fotomicrografias dos alvéolos dos grupos após quatorze dias pos-tratamento
 HE 200x (A,C,E); 400x(B,D,F)
 GI(A,B); GII(C,D); GII(E,F)
 EME= Espaço de material exógeno EV=Espaços vasculares; ON= Osso neoformado

5.1.4 Período Vinte e Um Dias

Grupo I (Óleo de Girassol) Ainda nesse período notou-se a presença de área focal de infiltrado inflamatório neutrofílico em meio a tecido de granulação maduro, este agora exibindo matriz extracelular mais fibrosa. A aposição óssea também estava presente, caracterizada pela presença de trabéculas ósseas extendendo-se em direção ao centro do alvéolo.

Grupo II: (Óleo ozonizado) Na maioria dos espécimes, observou-se área focal de infiltrado inflamatório focal bem central no alvéolo, indicativa da persistência de sinais de alveolite. Há também grande quantidade de elementos do tecido de granulação, este com matriz extracelular mais fibrosa tal qual o grupo anterior. A intensidade de deposição de trabéculas ósseas neoformadas foi bastante semelhante a do grupo anterior.

Grupo III (Alveoliten®): Pequena área focal de infiltrado inflamatório foi ainda observada em alguns cortes. Na maioria destes houve ausência desse infiltrado. Os espécimes exibiram de moderada a intensa vascularização e neoformação óssea muito intensa.

Grupo IV (Alvéolos induzidos para a alveolite, mas sem medicação): Por toda extensão do alvéolo notou-se formação de trabéculas coalescentes, com início de remodelação. A medula óssea era constituída de tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado e celularizado.

Grupo V (Alvéolos sem medicação e sem indução de alveolite): O aspecto histológico foi bastante semelhante ao observado no grupo anterior.

Os resultados acima estão descritos na Tabela 5.2 e estão ilustrados pela Figura 5.4 e 5.5

Figura 5.4- Fotomicrografia dos alvéolos dos grupos após vinte e um dias pós-tratamento.
 HE 200x (A,C,E,G,I); 400x(B,D,F,H,J)
 EV= Espaços vasculares; II= infiltrado inflamaoório; ON=osso neoformado

GII

GIII

Figura 5.5 - Fotomicrografias dos alvéolos dos grupos após vinte e um dias pos-tratamento (Tricômio de Masson 400x)

Tabela 5.2 Mediana [mínimo- máximo] valores de intensidade observados através do análise semiquantitativo dos elementos da reparação tecidual.

Período	Grupos	Infiltrado inflamatório	Tecido de Granulação	Edema	Necrose	Fibroblasts	Angiogenesis
2 days*	GI	3 [2-4]	2.5 [2-3]	1.5 [1-3]	1 [0-3]	2.5 [2-3] ^b	1 [0-1] ^b
	GII	3 [2-4]	2 [1-3]	2 [0-3]	1.5 [0-3]	2 [2-3] ^b	2.5 [1-3] ^b
	GIII	0 [0-3]	3 [2-3]	1 [1-1]	0 [0-2]	4 [3-4]	4 [2-4]
7 days*	GI	2 [1-2]	3 [3-4]	1 [0-1]	0 [0-1]	4 [3-4]	3 [3-3]
	GII	4 [1-4]	3 [2-4]	1 [1-2]	1 [2-1]	3 [4-3]	2 [1-3]
	GIII	0 [0-3]	3 [2-3]	1 [1-1]	0 [0-2]	4 [3-4]	4 [2-4]
14 days*	GI	1.5 [1-3] ^b	4 [3-4]	1 [1-2] ^b	0 [0-2]	4 [3-4]	2.5 [2-3]
	GII	1 [1-4] ^b	4 [2-4]	1 [1-1] ^b	0 [0-2]	4 [2-4]	4 [2-4]
	GIII	0 [0-0]	2 [1-3]	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-1]]	4 [4-4]
21 days	GIII	1 [0-3]	2 [1- 3]	0 [0-1]	0 [0-0]	4 [4-4]	3 [3-4]
	GIV	2 [2-2]	3 [3-3] ^a	1 [1-1]	0 [0-0]	4 [4-4]	3 [3-3]
	GV	0 [0-1]	0.5 [0-3]	0 [0-1]	0 [0-1]	3.5 [3-4]	4 [3-4]
	GIV	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]	3 [0-3]	2 [0-3]
	GV	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]	3 [3-3]	3 [3-3]

Grupo I – óleo de girassol Grupo II – óleo de girassol; Grupo III – Alveoliten®; Grupo IV – controle sem tratamento ; Grupo V –controle do reparo alveolar. 0 – ausente; 1 –pouco; 2 –moderado; 3 –intenso; 4 – muito intenso

* Estes periodos não foram incluídas no análise semiquantitativo (ver Material e Métodos).

By Mann-Whitney test:

Pelo método de Mann Whitney:

a = Estatisticamente significativa com relação ao grupos IV e V (p=0.02).

b = Estatisticamente significativa com relação ao grupos V (p=0.02).

5.2 Análise Histomorfométrica

Os dados obtidos por meio da análise histomorfométrica (ANEXO E) permitiram quantificar a porcentagem de neoformação óssea em cada grupo e período estudado.

Foram utilizados no mínimo seis cortes de cada peça excluindo-se aquelas que durante a análise apresentassem fragmentos de dente no interior do alvéolo ou evidência de fratura do osso alveolar. Da amostra final formaram parte os grupos que apresentaram $n \geq 3$ peças. Foi possível evidenciar e quantificar a porcentagem de neoformação a partir de sétimo dia pós-operatório. Em um total de trinta e seis peças foram avaliados duzentos e quarenta e oito (248) cortes histológicos.

Inicialmente foi realizado estudo estatístico descritivo dos dados coletados expressos na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Estatística descritiva da análise Histomorfométrica

Período	Grupos	n	Media	Desvio Padrão
7	GI	25	19.983	6.50
	GII	25	2.56	0.50
	GIII	18	29.51	12.34
14*	GI	28	35.64	16.12
	GII	28	32.47	10.12
	GIII	27	59.22	12.02
21	GI	18	45.67	19.20
	GII	18	46.51	15.33
	GIII	25	68.57	12.25
	GIV	19	91.91	11.10
	GV	18	79.13	9.86

Grupo I – óleo de girassol Grupo II – óleo de girassol; Grupo III – Alveoliten®; Grupo IV – controle sem tratamento; Grupo V - controle do reparo alveolar.

* Nestes períodos não foram incluídos os grupos controle para a quantificação óssea. (ver Material e Métodos).

5.3 Análises Estatísticas

Teste de Kruskal- Wallis e Conover

O resultado do teste de Kruskal-Wallis dos dados histomorfométricos entre os grupos experimentais apontou após sete dias pós-tratamento, diferença estatisticamente significativa $p=0.0010$. Para determinar onde se encontram estas diferenças foi realizado o teste de Conover entre pares de tratamento, pode se deduzir que há maior atividade osteogênica quando utilizado Alveoliten®.

Após quatorze dias pós-operatórios observou se diferença estatisticamente significativa na neoformação óssea entre os tratamentos, ($p=0.0320$). Aplicando o teste de Conover conseguimos observar que houve melhor reparação quando utilizado Alveoliten®

Passados vinte dias apresentaram se diferença estatisticamente significativa ($p =0.0222$),. Aplicando o teste de Conover notamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os G I e II (óleos de girassol e ozonizado) quando comparados com os G IV e V. Embora o emprego de Alveoliten® não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa quando comparado com os diferentes tratamentos ou controles, apresentou menor grau de atraso no reparo ósseo alveolar.

Os resultados das análises estatísticas dos dados Histomorfométricos 5.4

Tabela 5.4 Resultados do teste de Kruskal-Wallis

Período	H	N	Graus de liberdade	p-nível
7	8.33	11	2	0.0010
14	6.27	12	2	0.0320
21	11.40	16	4	0.0222

Grupo I – óleo de girassol Grupo II – óleo de girassol; Grupo III – Alveoliten®;
Grupo IV – controle sem tratamento; Grupo V - controle do reparo alveolar. ($p \leq 0.05$)

Tabela 5.5.-. Área media ($\pm$ desvio padrão) de trabéculas ósseas(μm^2) no espaço alveolar nos diferentes períodos experimentais.

Período	Grupos	Media (μm^2) $\pm$ desvio padrão	valor de p (test d Kruskal Wallis)
7 days*	GI GII GIII	19.98 $\pm$ 6.50 2.56 $\pm$ 0.50 ^b 29.51 $\pm$ 12.34	0.0010
14 days*	GI GII GIII	35.64 $\pm$ 16.12 ^b 32.49 $\pm$ 10.12 ^b 59.22 $\pm$ 12.02	0.0320
21 days	GI GII GIII GIV GV	45.67 $\pm$ 19.20 ^{a,b} 46.51 $\pm$ 15.33 ^{a,b} 68.57 $\pm$ 12.25 79.13 $\pm$ 9.86 91.91 $\pm$ 11.10	0.0222

Grupo I – óleo de girassol Grupo II – óleo de girassol; Grupo III – Alveoliten®; Grupo IV – controle sem tratamento; Grupo V - controle do reparo alveolar.

* Nestes períodos não foram incluídos os grupos controle para a quantificação óssea. (ver Material e Métodos).

Estatisticamente significativa; $p < 0.05$.

Pelo test de Conover

a = Estatisticamente significativa com relação ao grupos I e II .

b = Estatisticamente significativa com relação ao grupos V

6 DISCUSSÃO

A alveolite é uma complicação relacionada ao processo de reparo do osso alveolar que ocorre alguns dias após a exodontia (Blum, 2002; Kolokythas et al., 2010; Houston et al., 2002; Rodriguez, 2008). É caracterizada por um quadro de natureza inflamatória que envolve as porções ósseas mais superficiais do alvéolo dentário (Gregori. Campos 2004). Apesar de sua incidência ser relativamente baixa a intensa sintomatologia provoca desconforto ao paciente e pode acometer as funções bucais diárias, assim como as atividades laborais do paciente.

As diferentes modalidades de tratamento propostas são direcionadas para o alívio dos sintomas (Blum, 2002; Kolokythas et al., 2010; Noroozi; Philbert, 2010), pois não existe consenso quanto a sua etiopatogenia. Acredita-se que o seu desenvolvimento tenha caráter multifatorial, e que pode estar relacionado a alguns fatores predisponentes como gênero, idade (Blum, 2002; Garcia et al., 2003; Oginni, 2008; Noroozi; Philbert, 2009), trauma e à dificuldade cirúrgica (Birn, 1973; Blum, 2002; Noroozi; Philbert, 2009; Kolokythas et al., 2010), tabagismo (Meechan et al., 1988; Balaji, 2008), infecções locais preexistentes entre outras (Ren; Malmstron, 2007).

O modelo experimental utilizado na presente pesquisa permitiu o estudo detalhado das etapas da reparação óssea nos alvéolos dos ratos após a indução da alveolite. Embora a literatura tenha mostrado muitos estudos empregando metodologias semelhantes (Okamoto; Russo, 1973; Cury et al., 1983; Carvalho et al., 1990, 1991; Melo Junior et al., 2002; Felix, 2006; Cardoso, 2009) as dificuldades da técnica inerentes a anatomia do dente-alvéolo, assim como o crescimento contínuo dos incisivos favoreceram as fraturas do dente durante a exodontia e provocaram o descarte de algumas cortes histológicos no momento da análise histomorfológica e histomorfométrica.

Considerando que a literatura ressalta as atividades antibacterianas e propriedades biológicas benéficas do ozônio como a liberação lenta de oxigênio nos tecidos com hipóxia, a proliferação de fibroblastos bem como o potencial antioxidante dessa molécula (Sechi et al., 2000; Grootveld et al., 2004; Rodrigues et al., 2004; Bocci, 2009; Mayor, 2010), sugere-se testar a possibilidade terapêutica em um veículo oleoso para tratamento de alveolite induzida em ratos.

No presente estudo o emprego de óleo de girassol ozonizado (87,3 mEq/Kg de peróxido e 0,4 acidez) para tratamento da alveolite não apresentou efeitos deletérios, mas a resposta osteogênica esperada foi aquém das expectativas de nossa hipótese. Houve uma forte resposta de oxidação – inflamação sendo observada até quatorze dias após o tratamento.

A metodologia empregada mostrou que houve um retardo no processo de reparo do osso alveolar quando algum tipo de tratamento nos alvéolos era aplicado na condição clínica da alveolite. Os animais controle, com alveolite sem tratamento e sem alveolite apresentaram melhor reparação, de forma estatisticamente significativa quando comparada com o óleo ozonizado após vinte e um dias.

A análise histomorfológica dos cortes apresentou após o segundo dia, do tratamento, presença de infiltrado inflamatório neutrofilico intensas e difusas áreas focais de edema e necrose. Essas características foram similares nos grupos I, II porem, mais acentuadas no grupo IV, seguida pelo grupo I, quadro que coincide com os achados do Birn (1973), Cury et al. (1983) e Melo Júnior et al. (2002), Felix (2006) e Cardoso (2009).

Restos de coágulo sendo reabsorvidos por macrófagos e substituídos por tecido de granulação também foram observados depois do segundo dia pós-tratamento. Espaços sugestivos de material exógeno dentro do alvéolo no terço médio foram encontrados neste estudo e são compatíveis com os achados histológicos de alguns pesquisadores (Cury et al., 1983; Carvalho et al., 1990, 1991; Felix, 2006) e em que observaram resquícios do material empregado. Em alguns espécimes observou-se atividade osteoclástica assim como já mostrava predominância de reabsorção óssea quando o alvéolo era tratado com *Schinus terebinthifolius* (Melo Junior et al., 2002).

Nossos resultados concordam parcialmente com os de Cury et al. (1983) que observaram intensa reabsorção óssea, adjacente ao material de preenchimento sem contudo mostrar atividade osteogênica no período de dois dias.

A aplicação de Adrenalina (1:100.000) nos grupos experimentais provocou isquemia nos alvéolos e atraso no processo de reparo. Isso fica evidenciado pelos resultados do grupo onde a alveolite não foi provocada, pois as características histológicas mostraram neoformação óssea com deposição de osso imaturo.

Depois de sete dias de tratamento nossos resultados podem ser comparados com outras pesquisas semelhantes (Carvalho, 1990, 1991; Felix, 2006; Cardoso

2009). Foram observados áreas persistentes de infiltrado inflamatório moderado a intenso nos grupo I e mais intenso no grupo II com proliferação de tecido de granulação, fibroblastos e vascularização. A neoformação óssea da periferia para o centro do alvéolo estava presente, entretanto, em menor intensidade no grupo II.

Foi importante perceber que após o sétimo dia houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p = 0.0010$) com relação à atividade osteogênica, considerando que a maior atividade foi quando se empregou o Alveoliten® seguido do óleo de girassol e finalmente pelo óleo ozonizado. Neste último grupo houve pouca ou quase nenhuma atividade osteogênica. Este fato pode ser explicado pela ação oxidante dos peróxidos no óleo e dos ozonoides que estimularam um maior infiltrado inflamatório.

Foi possível observar presença de infiltrado inflamatório após quatorze dias nos grupo I e II, tecido de granulação exuberante, trabéculas maduras com maior intensidade no grupo III, seguido do grupo II. A análise estatística confirmou o que foi visto histomorfologicamente. Observou-se diferença significativa entre os tratamentos ($p=0.0320$). Conseguimos observar que houve melhor reparação quando utilizado Alveoliten® seguido do óleo ozonizado. Não tendo sido encontrada diferença estatística entre estes dois grupos. Houve maior atraso neste período quando o óleo de girassol foi utilizado. Neoformação óssea acentuada na região apical nos alvéolos tratados com Alveoliten® ou Alveosan® (Carvalho et al., 1990, 1991). De igual forma houve neoformação óssea em todos os casos tratados por fitoterapia (Melo Junior et al., 2002).

No grupo III um dos cortes apresentou tecido de granulação contendo espaços vazios sugestivos da ocupação prévia por material exógeno, este não visível nos preparados histológicos. Isto se relaciona com o observado por Carvalho et al. (1991) que também verificou presença de material exógeno no mesmo período.

Após vinte e um dias em todos os grupos ocorreu formação óssea nos alvéolos. Os resultados estatísticos apontam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0.0222$) com relação à osteogênese. A formação óssea foi maior quando utilizado Alveoliten® seguido do óleo ozonizado comparativamente.

A inserção dos medicamentos nos alvéolos apresentou atraso na reparação óssea quando comparado aos grupos controle, pois em vinte e um dias já mostravam evidências de trabéculas ósseas coalescentes. Assim, a utilização de apósitos pode interferir com a cronologia do reparo.

O grupo que empregou ozônio em óleo não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado a outros tratamentos. Entretanto, quando comparado com os grupos controle existe diferença, denotando retardo no processo de reparo alveolar aos 21 dias de tratamento.

Apesar da literatura (Bocci et al., 2009) mostrar que moléculas de ozônio em tecido orgânico podem estimular a migração fibroblástica, essa pesquisa não conseguiu comprovar uma proliferação fibroblástica maior nos primeiros dias pós-operatórios, no grupo tratado com óleo de girassol ozonizado. Contudo o grupo tratado por óleo de girassol aparentemente teve um desempenho melhor na proliferação fibroblástica neste período. Quanto ao grupo do Alveoliten® foi interessante notar que a proliferação fibroblástica se igualou aos outros grupos a partir do segundo dia.

Com relação ao tecido de granulação, houve uma tendência de comportamento semelhante entre o grupo do óleo de girassol e daquele ozonizado. Entretanto, uma maior formação deste tecido foi observada no grupo tratado com óleo de girassol até quatorze dias. No grupo do óleo de girassol ozonizado este tecido permaneceu presente até 21 dias. Quanto ao Alveoliten® o aumento na formação de tecido de granulação decresceu após o sétimo dia.

Aumento do tecido de granulação foi observado em úlceras de pressão em ratos quando tratadas por óleo ozonizado (Sakazaki et al., 2007).

O papel importante do pesquisador na busca de novos medicamentos biocompatíveis e que não dificulte as fases da reparação alveolar validam o modelo utilizado como um teste pré-clínico. Um medicamento deve apresentar baixo custo, ser de fácil utilização e deve atingir suas qualidades terapêuticas.

Diante os resultados obtidos neste estudo experimental, para que o óleo ozonizado possa ser considerado uma nova alternativa de tratamento para alveolite, julgamos oportuna a continuação de modelos de pesquisa como este, que empreguem diferentes concentrações de peróxido em óleo ozonizado ou outros processo de produção. Investigações que estudem aplicações de medicações em vários tempos pós-operatórios poderiam também contribuir para um estudo pré-clínico com maior semelhança do que acontece na prática.

Fundamentando-se em recente estudo clínico fase I (Ripamonti et al., 2011) que empregou o óleo ozonizado para tratamento de osteonecrose por bisfosfonatos, a avaliação de outros critérios e parâmetros da reparação tecidual em nível celular e

molecular poderia colaborar com o desenvolvimento de medicações ou substâncias ósseoreativas utilizando o ozônio e suas formulações.

Em resumo, o óleo ozonizado foi capaz de provocar um processo inflamatório intenso nos primeiros períodos de estudo, mas com o decorrer dos períodos de observação, promoveu um processo osteogênico que pôde ser comparável estatisticamente com a medicação de uso clínico convencional. Entretanto a reparação óssea nos casos de alveolite, sob os parâmetros utilizados, foi melhor com o uso do Alveoliten®.

7 CONCLUSÕES

Dentro dos limites metodológicos deste estudo podemos concluir que:

- O óleo de girassol ozonizado foi capaz de provocar um processo inflamatório mais intenso, se estendendo até o último período estudado.
- A presença de tecido de granulação foi estatisticamente significativa, no último período estudado, nos alvéolos tratados com óleo ozonizado comparados com os grupos controle.
- O edema foi observado até quatorze dias nos alvéolos tratados com óleo de girassol e óleo ozonizado.
- A migração fibroblástica foi observada após vinte e um dias nos grupos tratados com óleo de girassol e óleo ozonizado.
- A neoformação óssea nos alvéolos tratados com óleo ozonizado foi mais evidente após quatorze dias.
- A formação de trabéculas ósseas foi mais intensa com o uso do Alveoliten® nos casos de alveolite induzida em ratos, sob os parâmetros utilizados

REFERÊNCIAS¹

Agrillo A, Petrucci MT, Tedaldi M, et al. New therapeutic protocol in the treatment of avascular necrosis of the jaw. *J Craniofac Surg*. 2006;17(6):1080-3.

Agrillo A, Sassano P, Rinna C, et al. Ozone therapy in extractive surgery on patients treated with bisphosphonates. *J Craniofac Surg*. 2007a;18(5):1068-70.

Agrillo A, Ungari C, Filiaci F, et al. Ozone therapy in the treatment of avascular bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *J Craniofac Surg*. 2007b;18(5):1071-5.

Alissa R, Esposito M, Homer K, et al. The influence of platelet rich plasma on the healing of extraction sockets: an explorative randomised clinical trial. *Eur J Oral Implantol*. 2010;3(2):121-34.

Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1969;27:309-18.

Balaji SM. Tobacco smoking and surgical healing of oral tissue: A review. *Indian J Dent Res*. 2008;19:344-8.

Baqain ZH, Karaky AA, Sawair F, et al. Frequency estimates and risk factors for postoperative morbidity after third molar removal: a prospective Cohort study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006;66:2276-83.

Birn H. Bacteria and fibrinolytic activity in "dry socket". *Acta Odontol Scand*. 1970;28:773-83.

Birn H. fibrinolytic activity of normal alveolar bone. *Acta Odontol Scand*. 1971;29: 41-53.

Birn H. Kinetics and pain in dry socket. *Int J Oral Surg*. 1972;1:34-42.

Birn H. Etiologia and pathogenesis in fibrinolytic alveolitis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1973;2:211-63.

Blum IR. Contemporary views on dry socket (alveolar osteitis): a clinical appraisal of standardization, aetiopathogenesis and management: a critical review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002;31:309-1.

Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm.* 2004;13(1):3-11.

Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res.* 2006;37:425-35.

Bocci V, Borrelli E, Travagli V, et al. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev.* 2009;29(4):646-82.

Bodner L, Kaffe I, Littner MM, et al. Extraction site healing in rats : A radiologic densitometric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993;75:367-72.

Bosco DJM, Oliveira SR, Bosco AF, et al. Influence of local tetracycline on the microbiota of alveolar osteitis in rats. *Braz Dent J.* 2008; 19 (2):119-23.

Brandão AC, Brentegani LG, Novaes JAB. Histomorphometric Analysis of rat alveolar wound healing with hidroxiapatite alone or associated to BMPs. *Braz Dent J.* 2002;13(3):147-54.

Burgoyne CC, Giglio JÁ, Reese SE, et al. The efficacy of a topical anesthetic gel in the relief of pain associated with localized alveolar osteitis. *J Oral Maxillofac. Surg.* 2010;68(1):144-8.

Calixto RFE, Teo JM, Brentegani LM, et al. Grafting of tooth extraction socket with inorganic bovine bone or bioactive glass particles: Comparative histometric study in rats. *Implant Dent.* 2007;16:260-9.

Cardaropoli G, Araujo M, Hayacibara R, et al. Healing of extraction sockets and surgically produced – augmented and non-augmented – defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005;32:435-40.

Cardoso LC. Análise morfológica e molecular da alveolite induzida em ratos com diferentes modalidades de tratamento [Dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

Carvalho SPP, Araujo SV, Poi WR. Influência do "Alveoliten" no processo de reparo em feridas de extração dental infectadas. Estudo histológico em ratos. RGO. 1990;38:301-4.

Carvalho SPP, Okamoto T, Barbosa ZD. Influência da limpeza cirúrgica e/ou aplicação de alveosan no processo de reparo em feridas de extração dental infectadas. Estudo histológico em ratos. Rev Odontol. UNESP. 1991;20:165-73.

Caso A. Hung LK, Beime OR. Prevention of alveolar osteitis with chlorhexidine: a meta-analytic review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol oral Endod. 2005;99(2):155-9.

Chuang SK, Perrott DH, Susarla SM, et al. Risk factors for inflammatory complications following third molar surgery in adults. J Oral Maxillofac Surg. 2008; 66(11):2213-8.

Crawford JY. Dry socket after extraction. Dental cosmos. 1896;38(11):929-31

Cruz GO, Menéndez CS, Martínez JM, et al.. Aplicación de la Ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. Rev Cubana Estomatol [periódico en la Internet]. 1997 Jun [citado 2009 Mar 10] ; 34(1): 21-24. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75071997000100004&lng=es&nrm=iso.

Cury A, Lima de Castro A, Okamoto T, et al. Influência do alveosan sobre o processo de reparo perturbado de feridas de extração dental estudo histológico em ratos. Rev Odontol UNESP. 1983;12(112):29-3S.

Deboni MCZ. Antissepsia de alvéolos pós-exodontia por meio de irrigações de ozônio diluído em água [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

Dias BJ, Oliveira SR, Bosco AF. et al. Influence of local tetracycline on the microbiota of alveolar osteitis in rats. Braz Dent J. 2008;19:119-23.

Elsubeihia ES, Heersche JNM. Quantitative assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats. Arch Oral Biol. 2004;49:401-12.

Felix V. Implante De Alveosan® E De Anaseptil® pó associado ao eugenol em alvéolos dentais após a exodontia. Estudo microscópico em ratos [Dissertação] Marília: Universidade de Marília, Faculdade de Odontologia; 2006.

Garcia AG, Grana PM, Sampedro FG, et al. Does oral contraceptive use affect the incidence of complications after extraction of a mandibular third molar? *Br Dent J.* 2003;194:453-5.

Gregori C, Campos AC. *Cirurgia buço-dento-alveolar.* 2a ed. São Paulo: Sarvier, 2004, cap 14; p. 140-58.

Grootveld M, Silwood C, Sim J. et al. Safety Aspects regarding the therapeutic applications of ozone and ozonated culinary oils in Medicine and Dentistry. In: Lynch E. *Ozone the revolution in dentistry.* United Kingdom: Quintessence Publishing Books; 2004.cap.1.3, p.31-8.

Guerra OC, Cepero SM, Jórdan MEM, et al. Aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. *Rev Cubana Estomatol.*1997;34(1):21-4.

Gürbüz B, Pıkdöken L, Urhan M, et al. Scintigraphic evaluation of early osteoblastic activity in extraction sockets treated with platelet-rich plasma *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66:2454-60.

Gürbüz B, Pıkdöken L, Tunalı M, et al. Scintigraphic evaluation of osteoblastic activity in extraction sockets treated with platelet-rich fibrin *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;68:980-9.

Hermesch CB, Hilton TJ, Biesbrock AR, et al. Perioperative use of 0.12% chlorhexidine gluconate for the prevention of alveolar osteitis: Efficacy and risk factor analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85 (4):381-7.

Hita IP, Torres-LDS, Flores RR, et al. Effectiveness of chlorhexidine gel versus chlorhexidine rinse in reducing alveolar osteitis in mandibular third molar surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:441-45.

Houston JP, McCollum J, Pietz D. et al. Alveolar osteitis: a review of its etiology, prevention, and treatment modalities. *Gen Dent.* 2002;50:(5):457-63.

Irinakis T. Rationale for socket preservation after extraction of a single-rooted tooth when planning for future implant placement. *Can Dent Assoc.* 2006 72(10):917-22.

Iizuka T, Miller SC, Marks SC. Alveolar bone remodeling after tooth extraction in normal and osteopetrotic rats. *J Oral Pathol Med* 1992;21:150-5.

Kataoka H, Semma M, Sakazakib H, et al Proinflammatory Event of ozonized olive oil in mice *Ozone Science & Engineer*. 2009;31:238-46.

Kim HS, Noh SP, Han YW, et al. Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing. *J Korean Med Sci*. 2009;24:368-74.

Kanyama M, Koboki T. Akiyama K, et al. Connective tissue growth factor expressed in ral alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Arch Oral Biol*. 2003;48:723-30.

Kolokythas A, Olech E. Miloro M. Alveolar osteitis: A comprehensive Rewiew of concepts and controversies. *Int. J Dent* 2010. Published online 2010 June 24. doi: 10.1155/2010/249073.

Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. Tissue engineering application in maxillofacial surgery and periondontics. Chicago: Quinstessence Books; 1999.

López EG, Martínéz AR, Ruiz AOB, et al. La ozonoterapia en el tratamiento de la estomatitis subprótesis. *Rev Cubana de Estomatol [online]* 2003;40(2).

Martín OR. Lima M.A. Zulueta M.I. Alveolitis. Revisión de la literatura y actualización. *Archivo Médico de Camagüey [online]* 2003;7(2).

Marie N. Menke, Nathan B. et al Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing *Gynecol Oncol*. 2008;111(2 Suppl): S87–S91.

Martínez SG, Al-Dalain AM, Menéndez S, RL et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *European J Pharmacol*. 2005;523:151-61

Marzola C. Fundamentos de cirugía buco maxilo facial. São Paulo: Ed. Gráfica Big Forms; 2008. 6 vol.

Matsumoto, AS. Sakurai, N. Shinriki, S. et al. Therapeutic effects of ozonized olive oil in the treatment of intractable fistula and wound after surgical operation. *J Japan Surg Assoc*. 2000;61(6):1383–89.

Mayor HF, Moure IMD, García VMR. Evolución clínica de las pericoronaritis tratadas con OLEOZON® en urgencias estomatológicas. *Rev Méd electrón[Seriada en línea]* 2010;32(2). Disponible en URL:

<http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202010/vol2%202010/tema3.htm>

Meechan JG, Macgregor ID, Rogers SN, et al. The effect of smoking on immediate post-extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *B. J Oral Maxillofac Surg.* 1988;26:402-9.

Melo Junior EJM, Raposo MJ, Lisboa Neto JA, et al. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: Microbiological and microscopic analysis. *Phytomedicine.* 2002;9:109-16.

Menendez S, Falcón L, Simón DR et al. Efficacy of ozonized sunflower oil in the treatment of tinea pedis. *Mycoses.* 2002;45:329-32.

Mínguez-SMP, Salort LC, Silvestre-DFJ. Chlorhexidine in the prevention of dry socket: Effectiveness of different dosage forms and regimens. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009.1;14(9):e445-9.

Nitzan DW. On the genesis of dry socket. *J Oral Maxillofac Surg.* 1983;41: 706:10

Nogales CG, Ferrari PA, Kantorovich EO, et al. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract.* 2008;9:75-84.

Noroozi AR, Philbert RF. Modern concepts in understanding and management of the "dry socket" syndrome: comprehensive review. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol Oral Radiol and Endod.* 2009;107:30-5

Norris LA, Bonnar J. Haemostatic changes and the oral contraceptive pill. *Bailliers Clin Obst Gynaecol.* 1997;11(3):545-64.

Nusair YM, Younis MH. Prevalence, clinical picture, and risk factors of dry socket in a Jordanian dental teaching Center. *J Contemp Dent Pract.* 2007;8:53-63.

Oginni FO. Dry socket: a prospective study of prevalent risk factors in a Nigerian population. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;11:2290-5.

Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol. Araçatuba.* 1973;2(2):153-64.

Petrucchi MT, Agrillo A, Mustazza MC, Foà R. Role of ozone therapy in the treatment of osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Haematol.* 2007;92:1289-90.

Ren YFA, Malmstrom, HSB. Effectiveness of antibiotic prophylaxis in third molar surgery: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(10):1909-21.

Ripamonti CI, Cislighi E, Mariani L, et al.. Efficacy and safety of medical ozone (O₃) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: Preliminary results of a phase I-II study. *Oral Oncol.* 2011;47(3):185-90.

Rodrigues LK, Cardoso CC, Caputo LR. Cicatrizing and antimicrobial properties of an ozonised oil from sunflower seeds. *Inflammopharmacol.* 2004;12(3):261-70.

Rodríguez SMP. Manejo de accidentes y complicaciones en cirugía dentoalveolar. Bogotá: Entereditores; 2008. cap.4 p. 92-3.

Rutkowski JL, Fennel JW, Kern JC, et al. Inhibition of alveolar osteitis in mandibular tooth extraction sites using platelet rich plasma. *J Oral Implantol.* 2007;33(3):116-21

Sakazaki F; Kataoka H; Okuno T; et al. Ozonated olive oil enhances the growth of granulation tissue in a mouse model of pressure ulcer. *Ozone Science Eng.* 2007;29:503-7

Skalska K, Ledakowicz S, Perkowskib J, et al. Germicidal Properties of Ozonated Sunflower Oil. *Ozone: Science & Eng.* 2008;31(3):232–237

Serrati S, Margheri F, Bruschi S, et al. Plasminogen activators and inhibitors type-1 in alveolar osteitis. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(6):500-3.

Sechi LA, Lezcano N, Nunez M, et al. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone) *J Appl Microbiol.* 2001;90:279-84.

Siqueira JF, Roças IN, Cardoso CC, et al. Efeitos antibacterianos de um novo medicamento o óleo ozonizado – comparados às pastas de hidróxido de cálcio. *Rev Bras Odontol.* 2000;57:252-6.

Shoji K, Basso N, Elsubeihi ES, et al. Short-term effect of ovariectomy on osteoprogenitors in the healing rat mandibular incisor extraction socket. *Osteoporos Int.* 2008;19:1193–201.

Traina AA. Efeitos biológicos da água ozonizada na reparação tecidual de feridas dérmicas em ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2008.

Trombelli L, Farina R, Marzola A, et al.. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *J Clin Periodontol*. 2008;35:630–9.

Turner P. A clinical study of dry socket. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1982; 11(4):226-31

Uchikova E, Pehlivanov BB. Effect of two low-dose gestodene containing monophasic oral contraceptives on hemostasis in bulgarian women. *Expert Opin Pharmacother*. 2008;9(11):1839-44.

Valacchi G, Fortino V, Bocci V. The dual action of ozone on the skin. *Br J Dermatol*. 2005;153:1096–100.

Vezeau PJ, Dental extraction wound management; medicating postextraction socket. *J Oral Maxillofacial Surg*.. 2000;58,(5):531-7.

Vieira AS, Lopes HP, Siqueira JF, et al. Periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. . *Braz. Dent. J.* [serial on the Internet]. 2007 [cited 2009 Mar 10];18(4):299-304. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402007000400005&lng=en. doi: 10.1590/S0103-64402007000400005.

Yamalik MK, Yucetas S, Abbasoglu J, Effects of various antiseptics on bacteremia following tooth extraction. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1992;34(1):28-33.

Yugoshi LI, Sala MA, Brentegani LG, et al. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Braz Dent J* 2002,13;2:92-6

Zamora RZB, Gonzalez AR, Guanche D, et al. Antioxidant mechanism is Involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. *Mediators Inflamm*. 2007; 65873. Published online 2007 jaunay 18 doi 10.1155;2007;65873.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 06/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa-Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa: "**Efeitos biológicos do óleo ozonizado na reparação tecidual de alvéolos com alveolite provocada em ratos**", de responsabilidade da Pesquisadora: **Maria Del Pilar Rodriguez**, sob orientação da Professora Doutora **Maria Cristina Zindel Deboni**.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01 (um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em "cd" ou "disquete" ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 12 de maio de 2009.

Prof. Dr. **CELSON LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUB-COMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP

ANEXO B - Análises do óleo de girassol antes e após a ozonização Laudos – ITAL CQ 5833/2007 e CQ 6120/2009

LAUDO DE ANÁLISE Nº: CQ 6120/2009

MATERIAL: Óleo de Girassol Ozonizado - Em Fase Experimental - Amostra Única - Não é Produto Comercial (LOTE: Único; FAB.: 04/08/2009; VAL.: 04/08/2010)

INTERESSADO: MARIA CRISTINA DEBONI

ENDEREÇO: Faculdade de Odontologia/USP - São Paulo - SP

DATA DA ENTRADA DA AMOSTRA: 10/08/2009

DATA DA EMISSÃO DO LAUDO: 31/08/2009

NATUREZA(S) DA(S) ANÁLISE(S): FÍSICO-QUÍMICA

RESPONSÁVEL(eis): A. M. R. O. Miguel, E. Vicente, R. A. Ferrari, S. R. Baggio

1. METODOLOGIAS

Índice de acidez

FIRESTONE, D. (Ed.). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 5th ed. rev. 2nd print. Champaign: AOCS. 2007. Current through Revision 1, 2008. Champaign: AOCS, met. Ca 5a-40. (MA-CQ.114)

Índice de iodo

FIRESTONE, D. (Ed.). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 5th ed. rev. 2nd print. Champaign: AOCS. 2007. Current through Revision 1, 2008. Champaign: AOCS, met. Cd 1d - 92. (MA-CQ.119)

Índice de peróxido

FIRESTONE, D. (Ed.). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 5th ed. rev. 2nd print. Champaign: AOCS. 2007. Current through Revision 1, 2008. Champaign: AOCS, met. Cd 8b - 90. (MA-CQ.168)

2. RESULTADOS

DETERMINAÇÕES	RESULTADOS
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,4(0,0) *
Índice de iodo (cgl/g)	115(1) *
Índice de peróxido (meq/kg)	87,3(1,5) *

*Média e estimativa de desvio padrão.

3. OBSERVAÇÕES

a) O Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos não foi responsável pela amostragem e coleta do material, cuja identificação foi fornecida pelo interessado. Os resultados aplicam-se exclusivamente à(s) amostra(s) analisada(s), sendo vedado o uso do nome do ITAL, sob pena de indenização, para qualificar produção sobre a qual o mesmo não exerceu controle. b) Este laudo/relatório só tem valor oficial quando impresso em papel com marca d'água, com assinaturas ou rubricas originais em todas as páginas. Sua reprodução só pode ser feita na íntegra, sendo requerida autorização formal deste laboratório para reprodução parcial. c) Quando aplicável, os comentários e conclusões não fazem parte do escopo de habilitação pela REBLAS.

Visto

ANEXO C - resultados da análise do óleo de girassol antes e após a ozonização

Determinações	Sem ozonização	Com ozonização
Índice de acidez (mg KOH/g)	76,3(0,3)*	0,4(0,0)*
Índice de Iodo (cgl/g)	64,0(1,0)*	115(1)*
Índice de peróxido meq/Kg)	0,5(0,0)	87,3(1,6)*

* Média e estimativa de desvio padrão.

ANEXO D- Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histológica

Lâmina	Inf. Inflam	Tec. Granulação	Edema	Necrose	fibroblastos	Vascularização	Osteogênese	Hemorragia	
6887	2	3	2	0	2	2	1	0	
7061	4	1	3	3	3	3	0	0	2 OOZ
7062	4	1	2	3	2	1	1	3	
7063	2	3	0	0	2	3	1	4	
6898	4	3	2	3	3	3	1	1	
6894	4	2	3	2	2	2	0	2	2 OG
6896	2	3	1	0	3	3	1	0	
7059	3	1	2	2	1	1	0	3	
6906	3	1	3	3	1	0	0	0	2Alveoliten
7060	4	1	1	2	1	1	1	2	
7058	2	1	1	2	0	0	0	0	
7031	1	3	1	1	4	3	1	3/coagulo	2C
7032	1	4	1	1	4	4	1	1	2C
7033	3	2	3	1	3	2	0	1	2C. Alv
6886	1	3	1	1	4	3	1	1	
7042	4	2	1	1	3	1	1	1	7 OOZ
7043	4	2	1	1	3	1	1	1	
7044	4	3	2	2	3	2	1	0	

6884	2	3	0	0	3	3	2	0	
7046	1	4	1	1	4	3	2	0	
7047	1	4	1	0	4	3	2	0	7 OG
7049	2	3	1	0	4	3	2	0	
7039	3	2	1	2	3	2	1	0	
7040	0	3	1	0	4	4	3	1	7 Al
7041	0	3	1	0	4	4	3	1	
7035	3	2	2	3	2	2	0	1	Alveolite
6879	4	2	1	2	2	2	2	0	
6883	1	4	1	0	4	4	3	0	
6885	1	4	1	0	4	4	3	0	14 dias OOZ
6896	1	4	1	0	4	4	3	0	
6888	1	4	1	0	4	3	3	0	
6889	1	4	1	0	4	3	3	0	14 dias OG
6890	2	4	1	0	4	2	2	0	
6891	3	3	2	2	3	2	1	0	
6892	0	2	0	0	4	4	4	0	
6900	0	3	0	0	4	4	3	0	14 Alveoliten
6901	0	1	0	0	4	4	4	0	
7081	0	0	0	0	4	3	4	0	14 controle

7082	0	2	0	0	4	3	3	0	14
7083	2	3	1	0	4	3	2	0	alveolite
7050	2	3	1	0	4	3	3	0	
7051	2	3	1	0	4	3	3	0	
7065	2	3	1	0	4	3	3	0	21 dias Ooz
7052	0	1	0	0	4	3	4	0	
7053	3	2	0	1	4	3	3	0	21 OG
7069	1	3	1	0	4	4	3	0	
7068	0	0	0	0	3	4	4	0	
7048	1	3	1	0	4	3	3	0	21 alveoliten
7067	0	0	0	0	3	4	4	0	
7064	0	1	0	0	4	4	3	0	
7090	0	0	0	0	3	3	3	0	21 controle
7084	0	0	0	0	3	2	4	0	
7089	0	0	0	0	0	0	4	0	
7091	0	0	0	0	3	3	4	0	21 alveolite
7092	0	0	0	0	3	3	4	0	
7093	0	0	0	0	3	3	4	0	

ANEXO E - Valores originais de todos os dados obtidos pela Avaliação Histomorfométrica

21 dias Oleo de Girassol

7052	145779.234	68054.9453	15183	83237.9453	57.0986297
2	190189	92915.2344	3307.5	96222.7344	50.5932175
3	19968.9688	13326.9		13326.9	66.7380481
4	181805.5	91506.2109		91506.2109	50.3319266
5	151686.094	83012.1172		83012.1172	54.7262541
6	178527.906	103692.617	17105.1172	120797.734	67.6632225
57.8585498					

7053	219202.609	46139.8477	65540.5		111680.348	50.9484572
2	219432.375	41385.1172	31045		72430.1172	33.0079448
3	226817.422	77987.5	40757.5		118745	52.3526804
4	243406.609	8967.1162	62552	7349.6162	78868.7324	32.4020505
5	236002.109	6943	62552	7349.6162	76844.6162	32.560987
6	240826.047	74328.5	66033.6484		140362.148	58.2836243
43.2592907						

Media 45.6786092

7069	204002	134602.734		134602.734	65.9810857
2	1999990.11	136554.734		136554.734	6.82777049
3	198795.346	61022.832	10872.5	71895.332	36.1655006
4	213467	62437.2969	3657.4475	66094.7444	30.9625115
5	201308.703	6337.1172	6207	12544.1172	6.2312841
6	184124.109	73548.5	54122.7344	127671.234	69.3397702
35.9179871					

21 dias Óleo Ozonizado

7050	198624.344	106391.211	106391.211	53.5640339
2	20753.0605	12748.8574	12748.8574	61.4312159
3	188136.953	61880.112	61880.112	32.890993
4	109140.781	106272	106272	97.3714856
5	18440.875	6968	6968	37.7856257
6	170932.609	63126.5	63126.5	36.9306361
47.1759204				

ANEXO E - Valores originais de todos os dados obtidos pela Avaliação Histomorfométrica

7051	218973.109	81914.9297	49501.3477	131416.277	60.0148017
2	213589.234	79296.4453	26112.5	105408.945	49.3512445
3	200156.109	80685.0859	25273.5	105958.586	52.9379724
4	213148	86520.2344	21925.7148	108445.949	50.8782392
5	203873	69176.5	22561.127	91737.627	44.9974381
6	200144	66199.7344	29762.6094	95962.3438	47.9466503
49.2223089					

Media **44.7273805**

7065	242381.219	41813.1172	38569	80382.1172	33.163509
2	25428.916	10999.5449		10999.5449	43.2560511
3	217114.766	77858.6172		77858.6172	35.8605814
4	259396		104381.828	104381.828	40.2403384
5	278099.662	12179.1162	93722	105901.116	38.080275
6	241431.766	87163.4297		87163.4297	36.1027181
37.7839122					

21 dias Alveoliten

7048	185291.25	28522.6172	84561	113083.617	61.0301982
2	21245.7207	9038.0439	3080.5222	12118.5661	57.040033
3	223472.5	145632.5		145632.5	65.1679737
4	205000	118143.125		118143.125	57.6307927
5	235013.734	151899.199		151899.199	64.6341797
6	223583.203	92286.7344	56816.8477	149103.582	66.6881859
	227292.609	154507.109		154507.109	67.9771814

55.0210681

7064	236674.719	137847.609	137847.609	58.2434871
2	232395	116848.695	116848.695	50.2802105
3	227010.953	149300.828	149300.828	65.7681165
4	211488.609	134076.609	134076.609	63.3966102
5	221395	111013.617	111013.617	50.1427843
6	237748	132963.469	132963.469	55.9262197
57.2929047				

Media **66.8435948**

ANEXO E - Valores originais de todos os dados obtidos pela Avaliação Histomorfométrica

7067	175416.453	118404.5	118404.5	67.4990846
2	194491.453	139067.109	139067.109	71.5029412
3	179260.5	155014.344	155014.344	86.4743453
4	196454.5	154096.969	154096.969	78.439012
5	204530.5	158123.078	158123.078	77.3102682
6	195221.234	84359.6797	104381.297	53.4682086

72.4489767**21 dias controle**

7084	231785.5	231785.5	231785.5	100
2	221423	221423	221423	100
3	213942	213942	213942	100
4	212529	212529	212529	100
5	201522	201522	201522	100
6	221723	221723	221723	100

100

7089	170011.734	170011.734	170011.734	100
2	162310.109	162310.109	162310.109	100
3	153227.453	153227.453	153227.453	100
4	156305	156305	156305	100
5	130373.945	130373.945	130373.945	100
6	159839.345	159839.345	159839.345	100

100**Media 92.6830751**

7090	170836.422	133965.641	133965.641	78.4174938
2	158016	125089.68	125089.68	79.1626669
3	149753	118961.43	118961.43	79.4384284
4	159455.453	134132.328	134132.328	84.1189972
5	142399.5	108002.734	108002.734	75.8448832
6	152995.5	109105.5	109105.5	71.3128818

78.0492252**21 dias Alveolite**

7091	146236.109	99648.4922	99648.4922	68.1421932
2	144151.617	65409.1172	42561 107970.117	74.9003858
3	156560.828	79603.1094	4787 84390.1094	53.9024419
4	166509.445	87367	38116 125483	75.3608902
5	198646.094	160515	160515	80.8045085
6	170051	154519.734	154519.734	90.8667014

73.9961868

ANEXO E - Valores originais de todos os dados obtidos pela Avaliação Histomorfométrica

7092	147459	127069.969	127069.969	86.1730846
2	13061.7383	9422.0898	9422.0898	72.1350373
3	189639.563	177574.609	177574.609	93.6379556
4	201061.5	172357	172357	85.7235224
5	181590.609	126980.617	126980.617	69.9268633
6	167817	122051.23	122051.23	72.7287641
80.0542046				

Media 79.133804

7093	126152.734	100742.5	9767.5	110510	87.6001622
2	15972.9775	14371.9219		14371.9219	89.9764737
3	218847.844	185511.234		185511.234	84.7672205
4	225237.5	169799.234		169799.234	75.3867515
5	219698.609	181081		181081	82.4224607
6	188181.344	150456.734		150456.734	79.9530556
83.3510207					

14 dias Oleo de Girassol

6888	194258.234	76607.1172	42005.1172	118612.234	61.059051	147965.5
2	30234.5723	9404.5293	7864.2402	17268.7695	57.1159708	205860.609
3	258399.109	127759		127759	49.4425079	259924.609
4	226525.734	132373.609		132373.609	58.4364552	204051.5
5	279936.5	168026.109		168026.109	60.0229371	196905.266
6	287198.125	193986.609		193986.609	67.544525	199679
7	250441.109	160393		160393	64.044198	181092.828
59.2918642						

7068	116942.3	77835	10.8144	77845.8144	66.5677128
2	163934.609	141994		141994	86.6162432
3	163995.109	139050.5		139050.5	84.7894187
4	157477.203	145497.5		145497.5	92.3927382
5	172299.969	143448		143448	83.2548032
6	178565.109	146508.5		146508.5	82.0476635
28.5951935					

Media 26.8851884

ANEXO E - Valores originais de todos os dados obtidos pela Avaliação Histomorfométrica

6890	166890	21884.5	19064	40948.5	24.5362215
2	235692.359	82395.6172		82395.6172	34.9589683
3	222539.234	83165.9375	9419	92584.9375	41.6038717
4	231450.5	28325.2324		28325.2324	12.2381383
5	238271.422	43432	37313.6172	80745.6172	33.888083
6	248251.234	12927.6807	35827.9492	12602.5	61358.1299
24.5630608					

6891	218193.609	25108	23113.7344	48221.7344	22.1004339
2	28724.7031	3083.7712	1996.4771	5080.2483	17.6859906
3	210558.609	29052.6172	8761.0459	37813.6631	17.9587352
4	247671.016	120687.5		120687.5	48.7289559
5	212691	21594.3496	20507.8301	42102.1797	19.7949982
6	227236.109	73682.6192		73682.6192	32.4255768
27.4973108					

14 dias Oleo Ozonizado

6879	174399.719	35557.7148	3657.5	39215.2148	22.4858246
2	201630	48788	3675	52463	26.0194416
3	122605.328	31064.5		31064.5	25.3369902
4	203743.344	9724	28801.6172	38525.6172	18.9088961
5	171381.344	41015.5	5620.6162	46636.1162	27.2118978
6	215750.969	51899.5	4086.1165	55985.6165	25.9491843
7	197189.5	88610		88610	44.9364697
8	21779.4961	7346.9878	6149.5054	13496.4932	61.9688038
31.6021885					

6883	186133.188	70136.1172	70136.1172	37.6806082
2	196766.234	62837.7344	62837.7344	31.9352223
3	179829	67649	67649	37.6185154
4	197945.5	67437.5	4862.6621	72300.1621
5	192201.5	61996	61996	32.2557316
6	175606.609	53729.7148	53729.7148	30.5966358
31.6021885				

Media 35.1975314

ANEXO E - Valores originais de todos os dados obtidos pela Avaliação Histomorfométrica

6885	171278.938	1,439.01	66767.6172		68206.6288	39.8219593
2	206641.734	46696.8477	42990.832	12321.7598	102009.44	49.3653616
3	215669.641	74046.2109			74046.2109	34.3331638
4	188407.609	61147.1719			61147.1719	32.4547252
5	199428	48560	34000.1172		82560.1172	41.3984582
6	218318	54020	35336.5		89356.5	40.9295157
7	217931.125	4784.5	45733.1172	3485.5	54003.1172	24.7799011
37.5832978						

6896	173266.828	56059.6172		56059.6172	32.3545008
2	14877.6328	3462.8391		3462.8391	23.2754709
3	195537	1392	62848.1172	64240.1172	32.8531773
4	216201.922	68691.2344		68691.2344	31.7717964
5	163808	25982	8026	34008	20.7608908
6	230451.609	32064.7324		32064.7324	13.9138679
37.169306					0

14 dias Alveoliten

6900	233245	54052	71800.8516	125852.852	53.9573631
2	240703.391	56932.1172	61715.6172	118647.734	49.292091
3	232429.766	80221.6172	54178.4648	134400.082	57.8239545
4	229977.234	43590.6172	95131	138721.617	60.3197171
5	241303.5	47086.7344	51887	98973.7344	41.0162863
6	233164.234	59746.2148	49523	109269.215	46.863626
51.5455063]					

6901	148417.328	60150.1172	66287.8281	126437.945	85.1908244
2	15179.7461	9920.2412		9920.2412	65.3518256
3	196923		157097	157097	79.7758515
4	226386	146074.734	6375.2075	152449.942	67.340711
5	217330.047	124005.5	3460.7329	127466.233	58.6509941
6	199082.5	128694.734		128694.734	64.6439212
7	174797	135070.906		135070.906	77.2730117
8	21634.0625	16105.1094		16105.1094	74.443297
71.5838045					

ANEXO E- Valores originais de todos os dados obtidos pela Avaliação Histomorfometrica

Media 61.4786432

7079	170105.109	85092	85092	50.0231888
2	20788.8633	9648.7764	9648.7764	46.4131986
3	225494.453	127769.734	127769.734	56.6620297
4	255330	143688.5	143688.5	56.2756041
5	258974.078	117997.617	117997.617	45.5634858
6	237694	78631.0859	78631.0859	33.0808038

50.9875014

6892	171497.5	40792	43807.5	84599.5	49.3298736
	14510.598				
2	6	9677.4404		9677.4404	66.6922204
3	249789	88542.7109	65505.6172	6838.6162	160886.944
	216575.73				64.409139
4	4	140067.469		140067.469	64.6736668
5	238622	70975.6172	72546.5	143522.117	60.1462217
6	243132.5	63414	85675	149089	61.3200621
7	246747	57732.6172		96669.6797	154402.297
					62.5751466

61.3066186

14 dias controle

7081	132018.5	25767.2324	40120.1172	65887.3496	49.9076642
2	11110.7412	5420.0439		5420.0439	48.7820192
3	175306.453	84416.1172		84416.1172	48.1534568
4	130374	70589.7344	1210.1165	87.5	71887.3509
					55.1393306
5	168719.828	98813		98813	58.5663233
6	181207.5	49348.1172	58959.2344	108307.352	59.7697952

53.3864315

14 dias Alveolite

7083	245839.719	160092	28627.8301	188719.83	76.7653946
2	194889.609	31355	11449.6162	42804.6162	21.9635189
3	178208	30543.6172		30543.6172	17.1393076
4	205796.609	35955.1172		35955.1172	17.4711903
5	215185.219	50506.4648		50506.4648	23.471159
6	216245	52375.5	16079.7148	68455.2148	31.6563226
	182915.109	18092.1172		18092.1172	9.8909911

28.3368406

**ANEXO E - Valores originais de todos os dados obtidos pela Avaliação
Histomorfometrica**

7082	153146.5	92539			92539	60.425	
2	219700.5	36536.5	109588.5		146125	66.511	
3	241124.5	28840.732	94565.5859	20344.2324	143751	59.617	
4	223243.609	86042.18	33712.6172		119755	53.643	
5	223284	33766.5	114867		148634	66.567	61.6314551
6	218057.109	29571.582	107860.5		137432	63.026	

Óleo de Girassol Sete dias

6884	180820.734	2432	4621.4473	3463.1165	10516.5638	5.81601653	
2	20213.6309	4401.4966			4401.4966	21.7748935	
3	218055.203	7563	29908.7248	8271	45742.7248	20.9775892	
4	230397	41175.5			41175.5	17.8715435	
5	230431	44224.582	2984.5	14459.1162	61668.1982	26.7621102	
6	220737.609	27683.1992	13179		40862.1992	18.5116616	

7046	177520.234	16085.6162	11703.1982		27788.8144	15.6538856	
2	24465.7793	1979.3054			1979.3054	8.0900975	
3	220386.5	16482.7148	6206	4099	26787.7148	12.1548801	
4	222705	14887.6621	31813.7324		46701.3945	20.97007	
5	231072.5	14930.5	20129.6172	13130.4297	48190.5469	20.8551632	
6	220834.5	42219	8365.6162		50584.6162	22.9061203	
7	220701	4137	9542	42630.6172	56309.6172	25.5139837	

1
8.415
0525

Media 19.4135482

7047	21321.5	1624.6162	231.6172		1856.2334	8.70592313	
2	25773.7734	7086.7866			7086.7866	27.4961159	
3	275573.125	13226	48663		61889	22.4582858	
4	247447.266	15856.3496	21821		37677.3496	16.3054234	
5	223571.719	16203.6982	37529.0625	16174	69906.7607	31.2681591	
6	270239.688	63420.832	2437.2146	13566.2344	79424.281	29.3903097	

22.6040362

**ANEXO E - Valores originais de todos os dados obtidos pela Avaliação
Histomorfometrica**

7049	188598.609	8726.1162	24776.1172	33502.2334	17.7637754	
2	223758	39675.1992	9478.1982	49153.3974	21.9672134	
3	213382.234	17341.4473	41903.5	59244.9473	27.7647047	
4	22183.9531	1375.2969	3374.5625	4749.8594	21.4112398	18.016135
5	218960.5	40733.2344		40733.2344	18.6030057	
6	218960.5	40733.2344		40733.2344	18.6030057	

Sete dias Alveoliten

7039	179656.5	33518.2344	33518.2344	18.6568448	
2	176352.328	3101.2324	3101.2324	1.7585435	
3	179504.328	6289.7344	6289.7344	3.50394582	
4	185471.5	92758.4453	92758.4453	50.0122365	
5	215542.5	56280	56280	26.1108598	
6	176887.516	40681.6172	40681.6172	22.9985802	
	20.5068351				

7040	219048	25680.232	18843.3301	39254.7344	83778.3	38.247
2	230284.234	1932.7148	21669.8301	25685	49287.5	21.403
3	238706.094	28116.232	1045	43626.6172	72787.8	30.493
4	236839.266	26452.117	20343	29357.6172	76152.7	32.154
5	234078.563	34809.99	40728.582	1320	76858.6	32.835
6	218668.349	33907.617	17961.5	20377.4316	72246.5	33.039
	31.361623					

Media 29.5134474