



Erton Massamitsu Miyasawa

**Estudo *in vivo* dos efeitos da ozonioterapia sistêmica na reparação de  
feridas de extração dental: avaliação histomorfométrica e imuno-  
histoquímica**

CURITIBA  
2023

Erton Massamitsu Miyasawa

Estudo *in vivo* dos efeitos da ozonioterapia sistêmica na reparação de feridas de extração dental: avaliação histomorfométrica e imuno-histoquímica

Tese apresentada a Faculdade ILAPEO  
como parte dos requisitos para obtenção de  
título de Doutor em Odontologia, área de  
concentração em Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo  
Marques Padovan

CURITIBA  
2023

Erton Massamitsu Miyasawa

**Estudo *in vivo* dos efeitos da ozonioterapia sistêmica na reparação de feridas de extração dental: avaliação histomorfométrica e imuno-histoquímica**

Presidente da Banca Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Marques Padovan

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia  
Prof. Dr. José Mauro Granjeiro  
Prof. Dr. Gabriel Mulinari dos Santos  
Profa. Dra. Carolina dos Santos Santinoni

Aprovado em: 27/06/2023

## Dedicatória

Dedico esse trabalho primeiramente a meus pais Mitsuo Miyasawa e Alice Keiko Miyasawa, que sempre foram meu Porto Seguro em todas as situações.

À minha esposa Rosangela Fujinami Umekita Miyasawa e meus filhos Arthur e Theo, que tiveram que suportar minha ausência durante as várias semanas em que tive que estar em outro estado para adquirir mais conhecimento e poder realizar esse sonho.

## Agradecimentos

A **Deus**, por me guiar em todos os passos e decisões na minha vida.

Ao meu orientador, **Professor Dr. Luis Eduardo Marques Padovan**, pela orientação, amizade e humildade, possibilitando meu crescimento acadêmico dentro da nossa instituição.

Ao **Professor Dr. Valdir Gouveia Garcia**, que me acolheu como seu coorientado e não mediu esforços para que esse sonho de finalizar o doutorado fosse realizado.

Ao **Professor Dr. Edilson Ervolino** e sua equipe, que nos acolheu na cidade de Araçatuba e possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa de forma perfeita com uma metodologia impecável. Gratidão é a palavra!

Aos meus amigos da turma de Doutorado 2020 ILAPEO, pela amizade e compartilhamento de conhecimento. Em especial ao amigo **Janderson de Medeiros Cardoso** (considerado uma enciclopédia ambulante) que me acompanhou em todos as etapas do doutorado, inclusive na pesquisa. Muito obrigado meu amigo!

A todos os **professores do programa de doutorado do ILAPEO**, por dividirem seus conhecimentos e transmiti-los a nós sem economizar esforços.

A Diretora do ILAPEO, **Tania Able**, por me apoiar sempre nas minhas necessidades e me proporcionar um aprendizado sem limites dentro da instituição.

A bibliotecária **Andréa Scheida de Mattos**, pela parceria e ensinamentos e compartilhamento do espaço da biblioteca.

Enfim, a todos os **funcionários da Faculdade ILAPEO** que fazem essa máquina de ensino funcionar de forma esplêndida.

## Sumário

1. Artigo científico 1.....	6
2. Artigo científico 2.....	40

## 1. Artigo científico 1

Artigo de acordo com as normas da Faculdade ILAPEO, para futura publicação no periódico **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**

# **ESTUDO *IN VIVO* DOS EFEITOS DA OZONIOTERAPIA SISTÊMICA NA REPARAÇÃO DE FERIDAS DE EXTRAÇÃO DENTAL: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA**

**Erton Massamitsu Miyasawa<sup>1</sup>**  
**Edilson Ervolino<sup>2</sup>**  
**Janderson de Medeiros Cardoso<sup>1</sup>**  
**Leticia Helena Theodoro<sup>3</sup>**  
**Glauco Rodrigues Carmo Silveira<sup>4</sup>**  
**Valdir Gouveia Garcia<sup>5</sup>**  
**Luis Eduardo Marques Padovan<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade Ilapeo, área de Implantodontia Curitiba, PR, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Araçatuba, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Araçatuba, SP, Brasil.

<sup>4</sup> Doutorando do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Araçatuba, SP, Brasil.

<sup>5</sup> Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade Ilapeo, área de Implantodontia, Curitiba, PR, Brasil.

## **RESUMO**

A ozonioterapia tem sido descrita como um tratamento coadjuvante em vários tipos de doenças desempenhando um papel antimicrobiano, antiálgico e anti-inflamatório nas aplicações tópicas, e um agente regulador das funções imunológicas e antioxidativas quando administradas de forma sistêmica. A proposição do presente estudo foi analisar os efeitos biológicos da terapia com ozônio através de aplicação única via intraperitoneal e a influência de diferentes doses, na reparação óssea de alvéolos dentais pós exodontia em ratos. Setenta e dois ratos (albinus, Wistar) foram aleatoriamente separados em quatro grupos que após exodontia do incisivo superior direito, receberam o seguinte tratamento: Grupo C - Controle (sem aplicação da mistura O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub>); Grupo Oz15: animais receberam a mistura O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> na dosagem de 0,3 mg/kg; Grupo Oz35: animais receberam a mistura O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> na dosagem de 0,7 mg/kg; Grupo Oz50: animais receberam a mistura O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> na dosagem de 1,0 mg/kg. Seis animais de cada grupo sofreram eutanásia aos 7,14 e 21 dias. A avaliação histomorfométrica intragrupo revelou que todos os tratamentos promoveram maior porcentagem de tecido ósseo (PTO) nos períodos de 14 e 21 dias, comparado aos 7 dias; que os tratamentos com a mistura O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> a PTO foi maior aos 21 dias, comparado ao período de 14 dias. A avaliação intergrupo demonstrou diferença estatisticamente significativa de PTO entre os grupos Oz35 e Oz50 aos 14 e 21 dias, comparado ao grupo controle nos mesmos períodos; entre Oz50 (14 e 21 dias) comparado ao grupo Oz15 nos mesmos períodos, e entre grupo Oz50 aos 21

dias comparado ao grupo Oz35 no mesmo período. Houve maior imunomarcagem de osteocalcina (OCN) em todos os grupos aos 21 dias, comparado ao controle 7 dias, no mesmo grupo; no período de 21 dias houve maior imunomarcagem de OCN nos grupos controle e Oz15 comparado ao período de 14 dias, no mesmo grupo; o grupo Oz50 nos períodos de 7 e 14 dias demonstrou maior imunomarcagem que o grupo Controle e Oz35 no mesmo período. Não houve diferença na imunomarcagem de fastatase ácida tartarato resistente (TRAP) entre os grupos e períodos avaliados. Dentro dos limites deste estudo pode ser concluído que o uso sistêmico da mistura O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> beneficiou a reparação óssea; que a dose empregada do ozônio possui relevância para melhorar os eventos biológicos; que os resultados mais favoráveis foram evidenciados com a dose de ozônio de 1,0 mg/Kg de animal (50 µg/ml de O<sub>3</sub>).

**Palavras-chave:** Ozônio; Alvéolo dental; Animal.

## ABSTRACT

Ozone therapy has been described as an adjuvant treatment in several types of diseases, playing an antimicrobial, antiallergic and anti-inflammatory role in topical applications, and a regulatory agent of immune and antioxidative functions when administered systemically. The purpose of the present study was to analyze the biological effects of ozone therapy through a single intraperitoneal application and the influence of different doses on bone repair in dental sockets after tooth extraction in rats. Seventy-two rats (albinus, Wistar) were randomly divided into four groups that, after extraction of the upper right incisor, received the following treatment: Group C - Control (without application of the O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture); Group Oz15: animals received the O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture at a dose of 0.3 mg/kg; Oz35 Group: animals received the O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture at a dose of 0.7 mg/kg; Oz50 Group: animals received the O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture at a dosage of 1.0 mg/kg. Six animals from each group were euthanized at 7, 14 and 21 days. The intragroup histomorphometric evaluation revealed that all treatments promoted a higher percentage of bone tissue (PTO) in the periods of 14 and 21 days, compared to 7 days; that the treatments with the O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture to PTO was higher at 21 days, compared to the period of 14 days. The intergroup evaluation showed a statistically significant difference in PTO between the Oz35 and Oz50 groups at 14 and 21 days, compared to the control group at the same periods; between Oz50 (14 and 21 days) compared to the Oz15 group in the same periods, and between the Oz50 group at 21 days compared to the Oz35 group in the same period. There was greater immunostaining of osteocalcin (OCN) in all groups at 21 days, compared to the control at 7 days, in the same group; in the period of 21 days, there was greater immunostaining of OCN in the control and Oz15 groups compared to the period of 14 days, in the same group; the Oz50 group in the periods of 7 and 14 days showed greater immunostaining than the Control and Oz35 groups in the same period. There was no difference in tartrate-resistant acid fastatase (TRAP) immunostaining between groups and periods evaluated. Within the limits of this study, it can be concluded that the systemic use of the O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> mixture benefited bone repair; that the dose of ozone used is relevant to improve biological events; that the most favorable results were evidenced with the ozone dose of 1.0 mg/Kg of animal (50 µg/ml de O<sub>3</sub>).

**Keywords:** Ozone; Dental alveolus; Animal.

## INTRODUÇÃO

A reabilitação de áreas edêntulas com implantes dentais tem se tornado cada vez mais presente no nosso cotidiano, sendo considerado um tratamento previsível e seguro, através de um respaldo científico bem consolidado. A quantidade e qualidade do osso alveolar remanescente após a perda dental é de suma importância para o sucesso da reabilitação, pois

altera a estabilidade do implante durante a sua instalação devido o contato direto entre osso e implante <sup>1</sup>.

O estudo da reparação óssea dos alvéolos dentais após a perda dental tem sido foco de diversos pesquisadores<sup>2-5</sup>, pois durante esse processo muitas mudanças podem ocorrer no alvéolo dental, dificultando o posicionamento ideal do implante para uma correta reabilitação protética. Após a exodontia, o osso alveolar sofre uma contínua remodelação marcada por uma contração nos sentidos horizontal e vertical. O término da reparação do alvéolo dental é observado através do preenchimento ósseo do alvéolo com o fechamento de um firme tecido mole epitelizado. O tempo necessário para reparação do alvéolo em humanos pode variar em detrimento de diferentes fatores, locais e sistêmicos. A entrada do alvéolo pode ser fechada entre 10 e 20 semanas e o preenchimento ósseo pode ser observado radiograficamente entre 3 e 6 meses pós exodontia. A reorganização óssea pode durar por mais de um ano, sendo influenciada pelo tamanho do alvéolo, trauma cirúrgico realizado durante a exodontia e a variabilidade entre os indivíduos <sup>6</sup>.

O estudo da reparação de alvéolos dentais pós exodontia de incisivo central em ratos, constitui um modelo pré-clínico que permite avaliar e melhorar o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse processo<sup>2,3,7</sup>. No estudo de Okamoto & Russo (1973)<sup>2</sup>, ficou evidenciado que o processo de reparo em feridas pós exodontia ocorre em três fases bem distintas. A primeira fase se caracteriza pela formação do coágulo sanguíneo e proliferação das células do tecido conjuntivo. O período de formação de tecido conjuntivo de reparação é a segunda fase, onde os citoplasmas celulares apresentam granulações contendo proteínas com elevada concentração de lisina-hidroxilisina, glicoproteínas, ácido siálico, mucopolissacarídeos ácidos, lipídeos e ácido ribonucleico, e substância fundamental reativa ao azul de toluidina. E, por final o período de ossificação, que se observa uma alta reatividade das

trabéculas ósseas neoformadas, da substância fundamental e dos citoplasmas de fibroblastos e osteoblastos. De acordo com este trabalho, o processo de reparo em feridas de extração dental em incisivo de ratos, se completa em 21 dias pós-operatório, apresentando espessas trabéculas ósseas maduras, delineando pequenos espaços medulares nos três terços alveolares <sup>2</sup>.

Estudos histomorfométricos e imuno-histoquímicos são técnicas utilizadas em análises de tecidos biológicos, incluindo tecido ósseo. O estudo histomorfométrico é uma técnica que utiliza a análise microscópica de tecidos, permitindo a medição e quantificação de diferentes parâmetros, tais como o tamanho e a densidade de células, a espessura de membranas, o tamanho e a quantidade de componentes extracelulares, entre outros. No caso do tecido ósseo, pode ser utilizada para avaliar a densidade mineral óssea, a espessura do osso cortical e trabecular, a atividade osteoblástica e osteoclástica, e outros parâmetros relevantes para a avaliação da saúde óssea. Já o estudo imuno-histoquímico é uma técnica que utiliza anticorpos específicos para detectar proteínas em tecidos biológicos. Esses anticorpos podem ser marcados com corantes, permitindo a visualização das proteínas alvo em células e tecidos. No caso do tecido ósseo, pode ser utilizada para detectar diferentes proteínas específicas, como a osteocalcina (OCN), fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), entre outras, e avaliar a distribuição e a quantidade dessas proteínas no tecido ósseo. Essas técnicas são frequentemente utilizadas em pesquisas e na prática clínica para avaliar a saúde óssea, monitorar a resposta ao tratamento e identificar condições como a osteoporose e a doença de Paget <sup>8-10</sup>.

A osteocalcina é uma proteína produzida pelas células ósseas, também conhecida como proteína óssea Gla. Ela é produzida durante a mineralização do tecido ósseo e é encontrada predominantemente na matriz óssea, bem como em menor quantidade no sangue. Tem um papel importante na regulação do metabolismo ósseo, ajudando na formação e mineralização do tecido ósseo. Ela se liga ao cálcio e a hidroxiapatita, dois componentes importantes do tecido ósseo, e ajuda a estabilizá-los na matriz óssea<sup>11</sup>. Além disso, a osteocalcina também está

envolvida na regulação do metabolismo energético, uma vez que foi demonstrado que ela pode afetar a produção de insulina e a sensibilidade à insulina<sup>12</sup>. A osteocalcina é frequentemente utilizada como um biomarcador do turnover ósseo, ou seja, da atividade de formação e reabsorção óssea. Níveis elevados de osteocalcina geralmente indicam uma maior atividade de formação óssea, enquanto níveis baixos podem indicar uma diminuição da atividade de formação óssea ou um aumento na reabsorção óssea<sup>13</sup>. Por outro lado, a fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) é uma enzima presente em células específicas do tecido ósseo, como os osteoclastos, que são responsáveis pela reabsorção óssea. A TRAP desempenha um papel importante na remodelação óssea, que é um processo contínuo de formação e reabsorção óssea que ocorre ao longo da vida. Os níveis sanguíneos de TRAP podem ser medidos e usados como um indicador do turnover ósseo, que é a taxa na qual o osso é remodelado. A TRAP também pode ser usada como um marcador para monitorar doenças ósseas, como a osteoporose, que envolve uma diminuição da densidade óssea e um aumento do risco de fraturas<sup>10,14,15</sup>.

A utilização de terapias que podem favorecer o reparo ósseo alveolar em quantidade e qualidade após a perda dental pode permitir a reabilitação com implantes em menor tempo e maior estabilidade primária. A utilização terapêutica do ozônio tem ganhado notoriedade no tratamento de diversas doenças, devido suas características oxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, resultando em uma melhora da oxigenação tecidual, modulação do sistema imune e ativação de uma resposta do sistema antioxidante endógeno do paciente. O ozônio é uma molécula triatômica composta de três átomos de oxigênio, com alta capacidade oxidante, reativa e instável<sup>16</sup>. Apesar do relato da sua existência ter ocorrido desde 1785, pelo holandês Martin van Marum que notou um cheiro diferente ao redor de sua máquina eletrostática, foi o químico Christian Friedrich Schonbein da Universidade Basileia (Suíça) que descobriu o ozônio em 1840 ao observar que sua pilha voltaica emitia um gás com cheiro forte em contato com o oxigênio, denominando-o inicialmente de “ozein”<sup>17,18</sup>. Sua capacidade antimicrobiana foi

descoberta desde 1873 e o primeiro livro sobre suas aplicações médicas data de 1885, pelo Dr. Kenworth (Associação Médica da Flórida). Seu uso foi também relatado na Primeira Guerra Mundial (1914-1918) pelos alemães, no tratamento das feridas dos combatentes<sup>19,20</sup>. O ozônio medicinal tem se mostrado eficaz como uma substância terapêutica em patologias como hipóxia crônica, inflamações e desequilíbrios redox. A eficácia da terapia com ozônio é dependente de uma dose precisa, que se tornou possível devido ao desenvolvimento de geradores de ozônio capazes de produzir a mistura oxigênio-ozônio com precisão, reprodutibilidade e qualidade<sup>16,21</sup>. A sua utilização na odontologia se estende para as diversas especialidades, como dentística restauradora<sup>22</sup>, endodontia<sup>23</sup>, periodontia<sup>24</sup> e cirurgia oral<sup>25</sup>, abordando principalmente as suas propriedades tópicas antimicrobianas, desinfetantes e cicatriciais<sup>26</sup>. A ação da ozonioterapia aplicada por via sistêmica na reparação óssea de alvéolos dentais pós exodontia ainda é um assunto escasso na literatura<sup>5</sup>. Assim constitui objetivo do presente estudo avaliar os efeitos do ozônio e a influência de diferentes doses de ozônio medicinal, aplicados por via sistêmica intraperitoneal, no reparo ósseo de alvéolos dentais pós exodontia, em animais clinicamente saudáveis.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **Animais**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp (Processo nº 0123-2021) (Anexo 1) de acordo com os princípios éticos de experimentação animal. Setenta e dois ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*), com idade entre 3 e 4 meses, com peso médio de 335 gramas provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – SP. Todos os animais foram mantidos em ambiente climatizado (gaiola plástica) com controle de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e com ciclo de luz de 12 horas. Neste período os animais receberam ração sólida triturada (Ração

Presence – Moinho Primor S.A. – São Paulo, SP) e água “ad libitum”. Todos os procedimentos seguiram o *guideline* para cuidados e uso de animais em laboratório (Arrive Guidelines 2.0)<sup>27</sup>.

### **Cálculo da amostra**

O cálculo amostral foi realizado utilizando o programa GPower 3.1.9.2, considerando um valor de alfa (erro tipo I) e beta (erro tipo II) de 5% e 80% respectivamente, e um tamanho de efeito considerado médio (ES=0.25). Considerando também o número de grupos e tempos operatórios foi determinado o uso total de 64 animais. Considerando possíveis intercorrências e perdas de amostras, uma margem de 15% foi incluída, e desta forma, foi considerado um número total de 72 animais.

Procedimentos experimentais

### **Anestesia**

Para os procedimentos cirúrgicos, todos animais foram submetidos à anestesia geral através de aplicação intramuscular de uma associação de cloridrato de ketamina (80 mg/Kg de peso corporal do animal; Francotar, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg de peso corporal do animal; Coopazine, Coopers Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil).

Procedimento cirúrgico da exodontia

Após a realização da anestesia, foi realizada a antissepsia da área cirúrgica com solução de iodo tópico (PVP-I Tópico 10%, Riodeine – Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil) seguida da sindesmotomia, luxação e exodontia do incisivo central superior direito de cada animal, usando instrumentos modificados e técnica operatória descrita por Okamoto & Russo (1973)<sup>2</sup>. Sutura do tecido mole das bordas alveolares foram realizadas com fio de polygalactina 910, 4-0 (Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP,

Brasil). Concluída a sutura das margens gengivais, todos os animais receberam, por via intramuscular, dose única de 0,2 mL de antibiótico (PentabióticoC Veterinário Reforçado Wyeth S.A. Indústrias Farmacêuticas, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) e 5mg/kg de analgésico (Tramadol<sup>®</sup>, Janssen-Cilag Farmacêutica LTDA, São Paulo, SP, Brasil). por via muscular. Ração triturada foi oferecida a todos os animais durante todo o período experimental (Ração Presence – Moinho Primor S.A. – São Paulo, SP).

### **Grupos e tratamentos**

Concluída a exodontia e sutura, os animais foram aleatoriamente separados em 4 grupos com 18 animais cada um, que receberam um dos seguintes tratamentos: C – Controle (n = 18): Os animais não receberam nenhum tratamento sistêmico; Oz15 (n = 18): Os animais receberam por via intraperitoneal uma dose de ozônio de 0,3 mg/Kg, com concentração de 15 µg/ml de O<sub>3</sub> liberada pelo gerador; Oz35 (n = 18): Os animais receberam por via intraperitoneal uma dose de ozônio de 0,7 mg/Kg com concentração de 35 µg/ml de O<sub>3</sub> liberada pelo gerador; Oz50 (n = 18): Os animais receberam por via intraperitoneal uma dose de ozônio de 1,0 mg/Kg com concentração de 50 µg/ml de O<sub>3</sub> liberada pelo gerador (Figura 1).

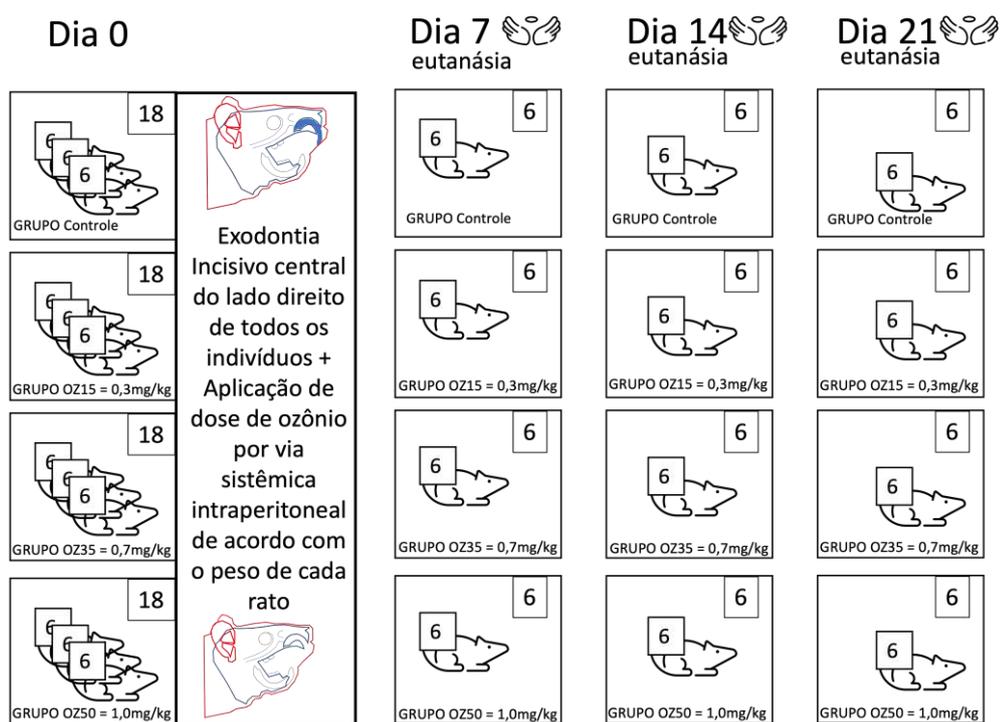


Figura 1: Delineamento da pesquisa. Distribuição de animais, grupos e tratamentos: Grupo Controle (sem aplicação de ozônio), OZ15 (0,3mg de O<sub>3</sub>/kg de animal), OZ35 (0,7mg de O<sub>3</sub>/kg de animal) e OZ50 (1,0mg de O<sub>3</sub>/kg de animal). Avaliados em 3 tempos: 7 dias, 14 dias e 21 dias após a exodontia e aplicação de O<sub>3</sub>.

## Gerador do Ozônio

Foi utilizado no presente estudo um gerador de ozônio comercialmente denominado de Philozon Medplus V (Philozon, Balneário Camboriu, SC, Brasil) que possui Registro na Anvisa sob no. 80472910001 com as seguintes características: válvula de segurança com sistema de vácuo, regulagem automática do fluxo de oxigênio, catalizador interno automático e possibilidade de concentrações produzidas ajustáveis entre 5 e 60 µg/ml, podendo ser definidas no display no painel do equipamento.

## Eutanásia dos animais

Seis animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia através de dose excessiva de anestésico (Tiopental, 150 mg/Kg de peso corporal) a cada sete dias após a execução do

protocolo experimental e procedimentos operatórios (7, 14 e 21 dias). As peças obtidas sofreram o trâmite laboratorial de rotina.

## **Procedimentos laboratoriais**

### **Preparo das amostras**

As maxilas direitas contendo o sítio de extração dental foram cuidadosamente dissecadas e submetidas à fixação em formaldeído 4% (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato-salino (PBS, 0,1 M, 4°C, pH 7,4) por um período mínimo de 48 horas. Em seguida as amostras foram submetidas à desmineralização em ácido etilenodiamino tetra-acético 10% (EDTA; Sigma-Aldrich) em PBS, durante 60 dias. Após a desmineralização, as amostras foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol, impregnadas e incluídas em parafina histológica e, por fim, seccionadas em micrótomo com 5 µm de espessura. A microtomia foi executada seguindo um plano de corte longitudinal em relação ao alvéolo dental e os cortes seriados que corresponderem à porção central do sítio de extração dental foram devidamente coletados em lâminas de vidro silanizadas.

### **Análise histopatológica e área de interesse (AI)**

Para a análise histopatológica as secções histológicas foram submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina (HE) e avaliadas por um único profissional experiente e cego aos grupos e tratamentos (EE).

As análises microscópicas, isto é, a análise histométrica e as análises imuno-histoquímicas, foram realizadas por um único examinador calibrado e cego aos grupos experimentais (EE). Tais análises foram realizadas utilizando-se um sistema composto por um microscópio de luz (Axio Scope®, Carl Zeiss Microscopy) com câmera digital acoplada

(AxioCam® MRc5, Carl Zeiss Microscopy), conectados ao microcomputador. As fotomicrografias das lâminas histológicas foram capturadas com o auxílio do software ZEN 2® (Blue edition; versão 6.1.7601; Carl Zeiss Microscopy). A região de interesse para as análises consistiu em um retângulo com 1280  $\mu\text{m}$  x 960  $\mu\text{m}$  na região central do terço médio do alvéolo dental (Figura 2).

Para análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTO), foram obtidas fotomicrografias das lâminas histológicas que foram analisadas através do software ImageJ® (versão 1.51i; National Institutes of Health), através da ferramenta Polygon selections, a qual demarcou e mensurou a área ocupada por tecido ósseo neoformado. Em seguida foi calculada a porcentagem correspondente da região de interesse que era ocupada por tecido ósseo neoformado.

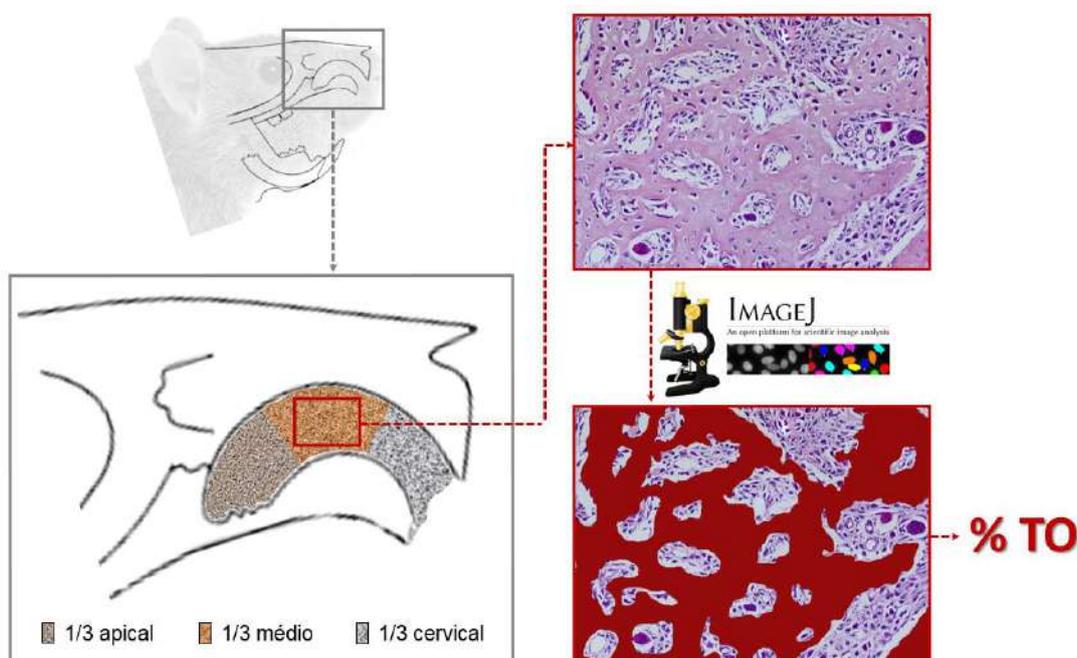


Figura 2: Área de interesse (AI)- Para avaliação histológica, foram utilizados cortes retangulares da região central do terço médio do alvéolo dental (1280 $\mu\text{m}$  x 960 $\mu\text{m}$ ).

## **Análises Imuno-histoquímicas**

Para as análises imuno-histoquímicas, os cortes histológicos foram desparafinizados pelo xilol e hidratados em série decrescente de etanol. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato 10 mM e pH 6,0 (Spring Bioscience), em câmara pressurizada (Decloaking Chamber®, Biocare Medical) a 95°C. No final de cada etapa da reação imuno-histoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M e pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em solução constituída de 3% de peróxido de hidrogênio em PBS, por 1 hora, e em solução constituída de 4% de leite em pó desnatado em PBS, também por 1 hora, para o bloqueio da peroxidase e da biotina endógenas, respectivamente. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado em solução constituída de 1,5% de soro albumina bovino em PBS acrescido de 0,05% de Triton® X-100 (Sigma-Aldrich), durante 12 horas. As lâminas contendo as amostras de cada grupo experimental foram divididas em 2 lotes, e cada lote foi incubado por 24 horas com um dos seguintes anticorpos primários: anti-OCN (Abcam Laboratories) e anti-TRAP (Santa Cruz Laboratories). Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories), por 2 horas e, subsequentemente, tratados pela estreptavidina conjugada à peroxidase da raiz forte (Vector Laboratories), por 2 horas. A revelação foi realizada utilizando-se como cromógeno o composto 3,3'-diaminobenzidina (Vector Laboratories). Os espécimes foram submetidos à contracoloração com Hematoxilina de Harris, em seguida, foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e recobertos com meio de montagem e lamínulas de vidro.

Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se apenas a utilização do anticorpo primário. Todas as etapas da reação imuno-histoquímica foram baseadas no protocolo descrito por Ervolino et al. (2019)<sup>4</sup>.

### **Osteocalcina (OCN)**

Para a análise imuno-histoquímica da osteocalcina foi realizado uma análise semi-quantitativa respeitando o seguinte critério de escores. ESCORE 0: padrão de imunomarcção nulo (ausência total de células imunoreativas (IR) e ausência de marcação na matriz extracelular (MEC)); ESCORE 1: baixo padrão de imunomarcção ( $\cong$  1/4 das células IR e fraca marcação na MEC); ESCORE 2: moderado padrão de imunomarcção ( $\cong$  1/2 das células IR e moderada marcação na MEC); ESCORE 3: alto padrão de imunomarcção ( $\cong$  3/4 das células IR e moderada marcação na MEC)<sup>3</sup>.

### **Fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP)**

Para a análise imuno-histoquímica da TRAP efetuou-se uma análise semiquantitativa onde a quantidade de células imunoreativas (IR) foi distribuída nos seguintes escores: ESCORE 0: padrão de imunomarcção nulo (ausência total de células IR); ESCORE 1: baixo padrão de imunomarcção (até 5 células IR por campo); ESCORE 2: moderado padrão de imunomarcção (entre 6 e 12 células IR por campo); ESCORE 3: alto padrão de imunomarcção (mais de 12 células IR por campo)<sup>3</sup>.

### **Análise Estatística**

Para a análise estatística foi empregado o programa Biostat 5.0 (IDSM- Amazonas/Brasil) e  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo. Para a porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTO) utilizou-se o Teste de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e o pós-teste de Tukey. Para os escores da imunomarcção de OCN e TRAP utilizou-se o Teste de Análise de Variância de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Student-Newman-Keuls.

## RESULTADOS

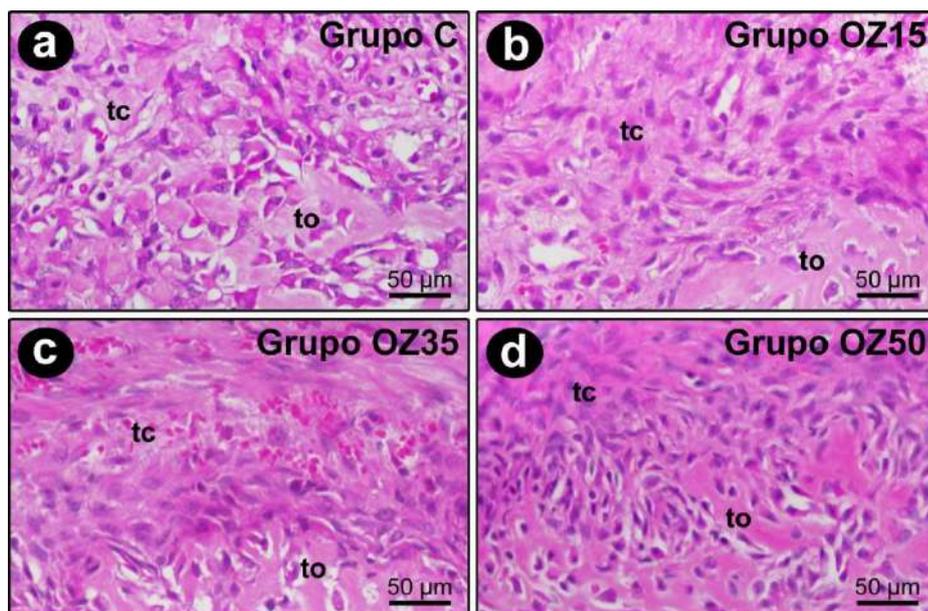
### Avaliação histológica

Aos 7 dias pós exodontia os alvéolos dentais se mostravam preenchidos por remanescentes do coágulo sanguíneo, tecido conjuntivo ricamente vascularizado e celularizado. Nas imediações das paredes dos alvéolos se constatou o início da deposição de matriz óssea e o começo da formação de delicadas trabéculas ósseas, as quais se mostravam mais evidentes no Grupo OZ50 (Figura 3 d).

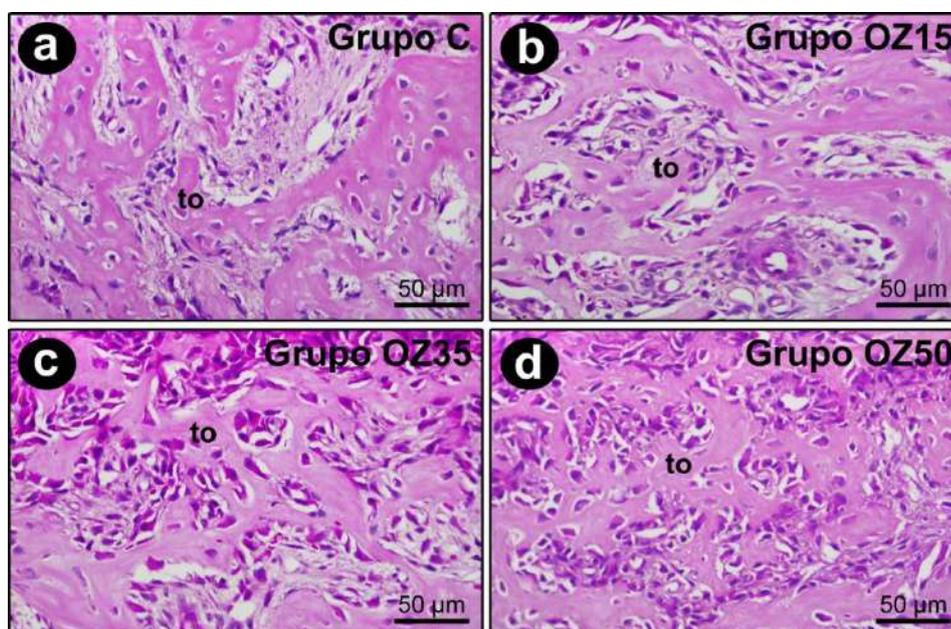
Aos 14 dias pós operatórios uma rede delicada de trabéculas ósseas, compostas por tecido ósseo imaturo, ocupava grande parte dos alvéolos dentais. Tais trabéculas se mostravam repletas de osteoblastos com características morfológicas de intensa atividade, especialmente nos grupos OZ35 e OZ50, onde o trabeculado ósseo se apresentava evidentemente mais denso. Entremeadado nas trabéculas ósseas constatou-se um delicado tecido conjuntivo muito vascularizado e bastante celularizado, especialmente nos grupos OZ35 e OZ50 (Figura 4 c,d).

Aos 21 dias pós exodontia grande parte dos alvéolos dentais se mostrava ocupado por trabéculas ósseas, cuja espessura e nível de maturação se apresentavam maiores no grupo OZ35, e especialmente, no grupo OZ50. O tecido conjuntivo situado entre as trabéculas se apresentava bastante vascularizado e um pouco menos celularizado que nos períodos anteriores (Figura 5 c,d).

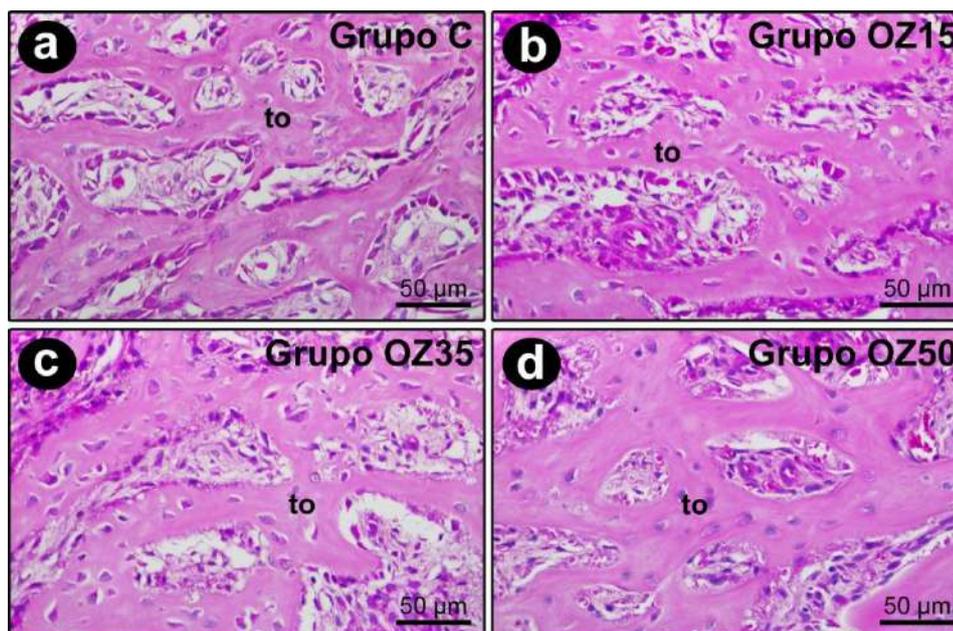
As características histológicas apresentadas pelo grupo OZ50 são condizentes com um processo de reparação alveolar mais acelerado (Figura 5 d)



**Figura 3:** Aspecto histológico do sítio de extração dental aos 7 dias pós-operatórios nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrograficas evidenciando as características histológicas do tecido situado no 1/3 médio do alvéolo dental nos grupos C (a), OZ15 (b), OZ35 (c) e OZ50 (d) aos 7 pós exodontia. Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo neoformado. Aumento original: 400x. Barras de escala: 50 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).



**Figura 4:** Aspecto histológico do sítio de extração dental aos 14 dias pós-operatórios nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrograficas evidenciando as características histológicas do tecido ósseo situado no 1/3 médio do alvéolo dental nos grupo C (a), OZ15 (b), OZ35 (c) e OZ50 (d) aos 14 pós exodontia. Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo neoformado. Aumento original: 400x. Barras de escala: 50 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

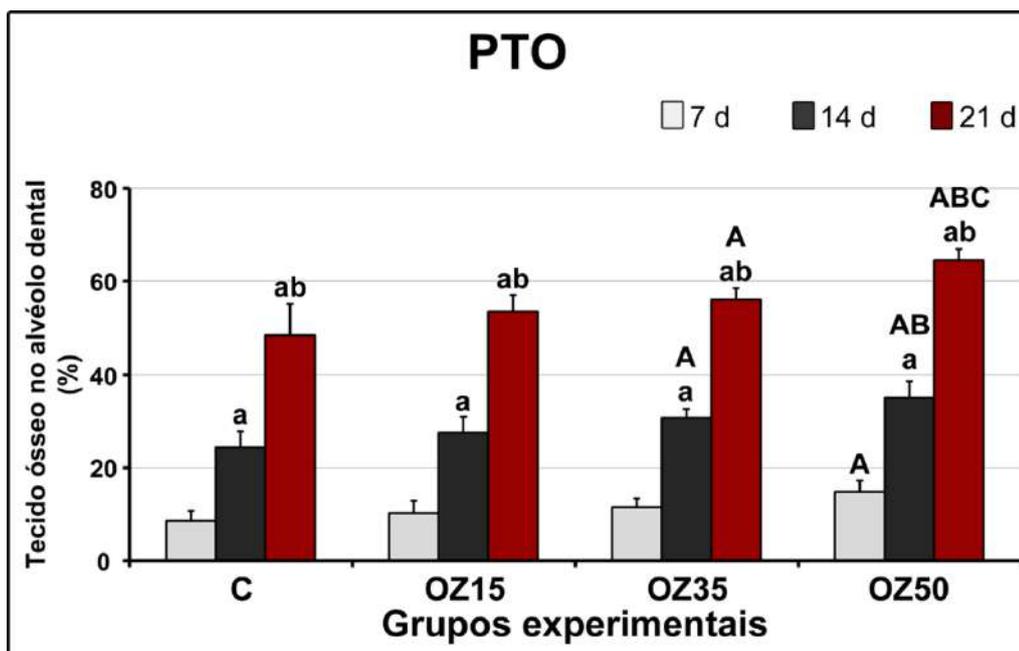


**Figura 5:** Aspecto histológico do sítio de extração dental aos 21 dias pós-operatórios nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrograficas evidenciando as características histológicas do tecido ósseo situado no 1/3 médio do alvéolo dental nos grupo C (a), OZ15 (b), OZ35 (c) e OZ50 (d) aos 21 pós exodontia. Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo neoformado. Aumento original: 400x. Barras de escala: 50 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

### Avaliação histométrica

Na análise intragrupo constatou-se que a PTO foi maior aos 14 dias quando comparado com os 7 dias, em todos os grupos experimentais. Aos 21d a PTO foi maior tanto em relação aos 7 dias quanto aos 14 dias, em todos os grupos experimentais (Figura 6).

Na análise intergrupos constatou-se que no grupo OZ35 aos 14 dias e aos 21 dias a PTO foi maior que no grupo C nos respectivos períodos experimentais. No grupo OZ50 a PTO foi maior que no grupo C em todos os períodos experimentais. Aos 14 dias e aos 21 dias no grupo OZ50 a PTO foi maior no grupo OZ15. A PTO aos 21 dias no grupo OZ50 foi maior que no grupo OZ35 (Figura 6).



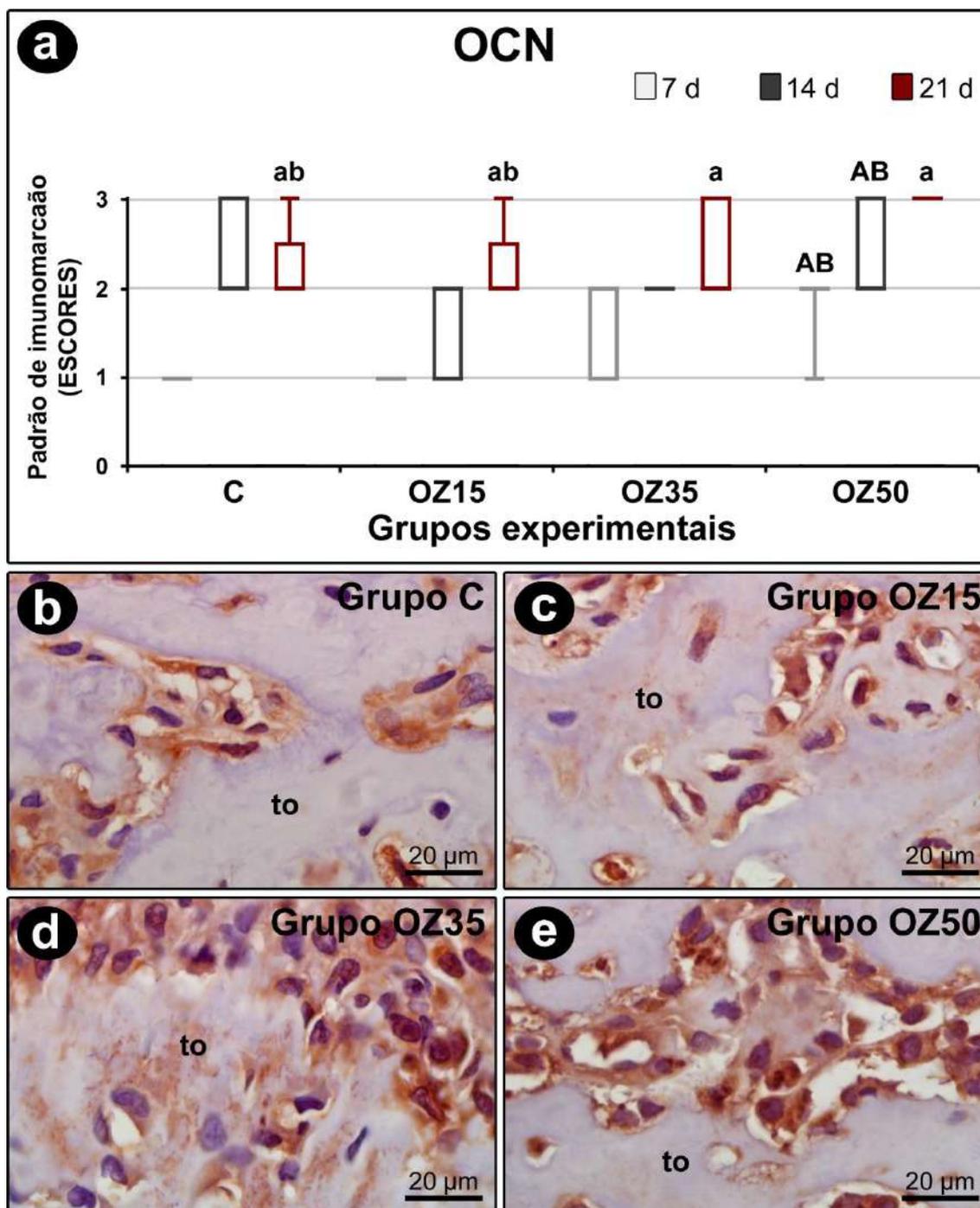
**Figura 6:** Gráfico evidenciando a porcentagem de tecido ósseo (PTO) no 1/3 médio do alvéolo dental nos grupos C, OZ15, OZ35 e OZ50 aos 7, 14 e 21 dias pós operatórios. Símbolos: **a**, diferença em relação aos 7 dias no mesmo grupo; **b**, diferença em relação aos 14 dias no mesmo grupo; **A**, diferença em relação ao grupo C no mesmo período; **B**, diferença em relação ao grupo OZ15 no mesmo período; **C**, diferença em relação ao grupo OZ35 no mesmo período. Testes estatísticos: Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; Análise de Variância (ANOVA); Pós-teste de Tukey.

## Avaliação Imuno-histoquímica

### Osteocalcina (OCN)

Na análise intragrupo constatou-se que a imunomarcagem para OCN aos 21d foi maior que aos 7d em todos os grupos experimentais. Aos 21d em C e OZ15 a imunomarcagem para OCN foi maior 21d em relação aos 14d (Figura 7).

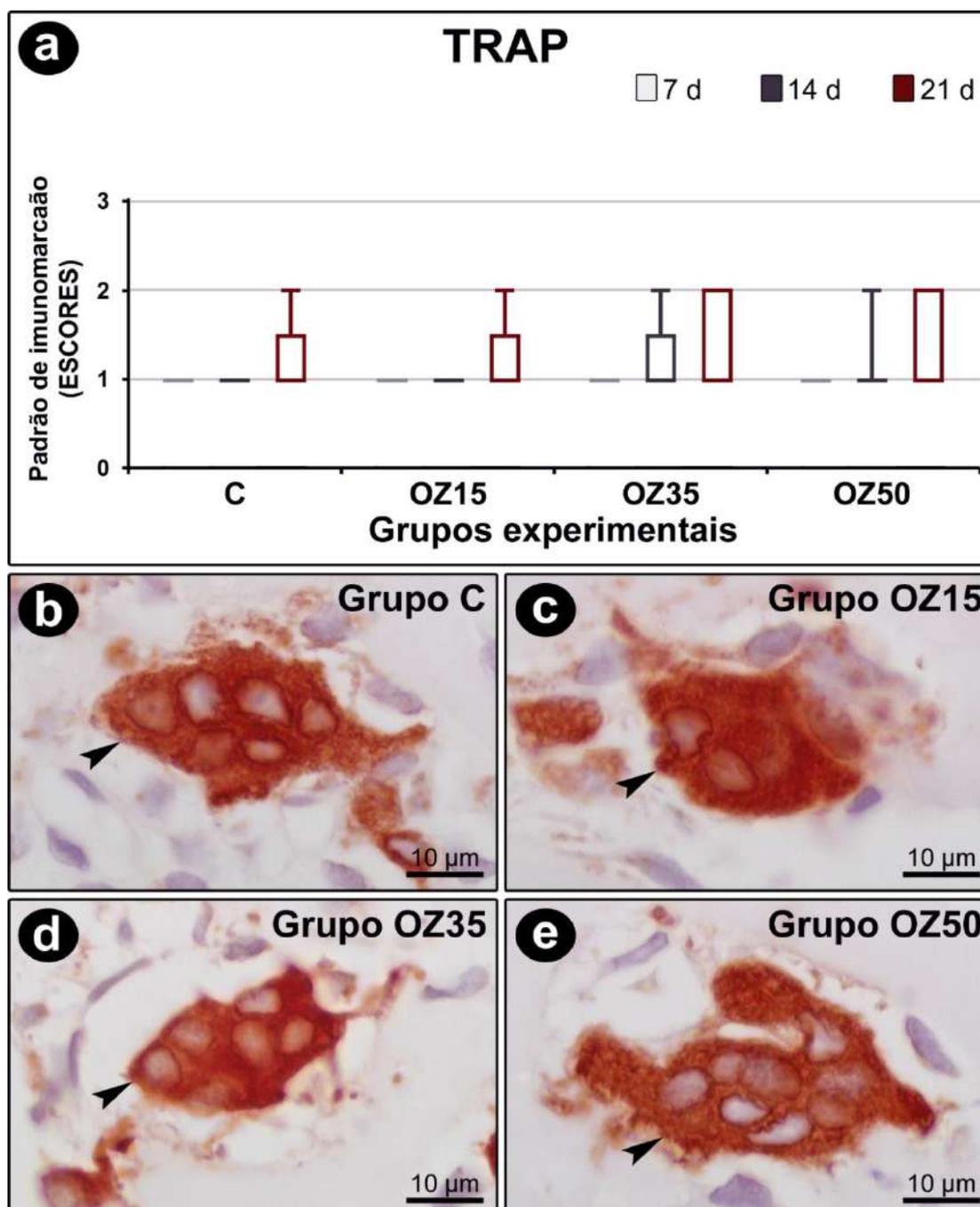
Na análise intergrupos constatou-se que no grupo OZ50 aos 7d e aos 14d a imunomarcagem para OCN foi maior que no grupo C e que no grupo OZ15 (Figura 7).



**Figura 7:** Imunomarcção para OCN no sítio de extração dental aos 21 dias pós-operatórios nos diferentes grupos experimentais. **(a)** Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção para OCN no alvéolo dental nos grupos C, OZ15, OZ35 e OZ50 aos 7, 14 e 21 dias pós operatórios. Testes estatísticos: Análise de Variância de Kruskal Wallis; Pós-teste de Student-Newman-Keuls. **(b – e)** Fotomicrograficas evidenciando o padrão de imunomarcção para OCN no 1/3 médio do alvéolo dental nos grupo C **(b)**, OZ15 **(c)**, OZ35 **(d)** e OZ50 **(e)** aos 21 pós exodontia. Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo neoformado; **a**, diferença em relação aos 7 dias no mesmo grupo; **b**, diferença em relação aos 14 dias no mesmo grupo; **A**, diferença em relação ao grupo C no mesmo período; **B**, diferença em relação ao grupo OZ15 no mesmo período. . Aumento original: 1000x. Barras de escala: 10 µm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

### Fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP)

Tanto a análise intragrupo, quanto a análise intergrupos, não constatou diferença estatisticamente significativa na imunomarcção para TRAP (Figura 8).



**Figura 8:** Imunomarcção para TRAP no sítio de extração dental aos 14 dias pós-operatórios nos diferentes grupos experimentais. **(a)** Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP no alvéolo dental nos grupos C, OZ15, OZ35 e OZ50 aos 7, 14 e 21 dias pós-operatórios. Testes estatísticos: Análise de Variância de Kruskal Wallis; Pós-teste de Student-Newman-Keuls. **(b – e)** Fotomicrográficas evidenciando as células TRAP-positivas (osteoclastos) presentes no 1/3 médio do alvéolo dental nos grupo C **(b)**, OZ15 **(c)**, OZ35 **(d)** e OZ50 **(e)** aos 14 pós-exodontia. Abreviações e símbolos: setas pretas, células TRAP-positivas (osteoclastos). Aumento original: 1000x. Barras de escala: 10 µm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

## DISCUSSÃO

Este estudo teve a finalidade de avaliar os efeitos da ozonioterapia sistêmica no reparo ósseo como também os efeitos de diferentes doses de ozônio administrada por via intraperitoneal, no reparo de feridas de extração dental.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que o tratamento com o O<sub>3</sub> influencia o reparo de feridas ósseas. Ficou evidente em todos os grupos tratados com O<sub>3</sub> que a porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTO) foi maior quando comparado ao grupo controle. Destaca-se ainda que tais resultados mostraram-se dose-dependente, com resultados mais favoráveis com dose mais elevada, de 1,0 mg/Kg, com concentração de 50 µg/ml de O<sub>3</sub>. Por outro lado a ozonioterapia contribuiu para aceleração do estágio de maturação óssea que se mostrou mais evoluído nos espécimes tratados com O<sub>3</sub> que se caracterizou pela elevada imunomarcagem de OCN, denotando os efeitos benéficos da ozonioterapia nas células com atividade formadora determinada pelos osteoblastos e, em contrapartida, controlou a atividade dos osteoclastos (TRAP), de reabsorção óssea, uma vez que não evidenciou diferenças estatísticas significantes entre os espécimes tratados ou não com ozônio.

Nossos resultados revelaram que a via sistêmica (intraperitoneal) de aplicação da ozonioterapia em animais mostrou ser efetiva, sem efeitos indesejáveis para os animais e constitui a via de aplicação escolhida por diversos pesquisadores devido sua praticidade de execução e eficiência na absorção do ozônio<sup>5,28</sup>. Ressalta-se ainda que as todas doses de ozônio empregadas em nossos estudos (0,3mg de O<sub>3</sub>/kg, com concentração de 15 µg/ml de O<sub>3</sub>, 0,7mg de O<sub>3</sub>/kg, com concentração de 35 µg/ml de O<sub>3</sub>, 1,0mg de O<sub>3</sub>/kg com concentração de 50 µg/ml de O<sub>3</sub>) promoveram aumento da PTO, comprovando a ação benéfica do O<sub>3</sub> na neoformação óssea. Destaca-se que doses com baixas concentrações de O<sub>3</sub>, na faixa terapêutica (10-80 µg/ml de gás), podem ser efetivamente suprimidas pela poderosa capacidade antioxidante do

organismo para evitar efeitos tóxicos nas células; tais concentrações de ozônio têm sido usadas como agente esterilizante, promover a cicatrização de feridas, regular a imunidade e desempenhando das funções analgésicas <sup>29</sup>. Um fator importante a ser considerado é que o tempo de vida útil da molécula de ozônio está diretamente relacionado a temperatura. Quanto mais alta a temperatura mais curto é a vida útil do ozônio e, conseqüentemente, menor sua potência de ação. Como exemplo, a meia-vida do ozônio é de 140 minutos a 0°C, e atingiu apenas 40 minutos a 20°C<sup>29</sup>.

A ozonioterapia é um método de tratamento biológico com uma ampla gama de aplicações tanto na medicina quanto na odontologia. A cascata de compostos derivados do ozônio tem a capacidade de agir em diversos alvos no organismo, podendo acarretar uma correção multifatorial de diversas condições patológicas. Hipóteses do seu mecanismo de ação estão apresentadas na literatura, porém inconclusivas. Estudos mostram que a terapia com ozônio induz um estresse oxidativo moderado, aumenta a produção de antioxidantes endógenos, melhora a perfusão local e a entrega de oxigênio, como também a resposta imunológica <sup>30</sup>. Outros estudos relatam que o O<sub>3</sub> aumenta o transporte de oxigênio pelo sangue, resultando em uma ativação do metabolismo celular dos processos aeróbicos (ciclo de Krebs, glicólise, β-oxidação de ácidos graxos) e utilização dos recursos energéticos. Sabe-se também que o metabolismo dos tecidos inflamados é aumentado com a ozonioterapia devido a elevação da oxigenação e redução dos processos inflamatórios totais, aumentando, portanto, sua capacidade de regeneração tecidual <sup>5,31-34</sup>.

Embora com a metodologia aplicada neste estudo não tenhamos condições de esclarecer o mecanismo de ação que resultou nos benefícios do tratamento com O<sub>3</sub> na reparação de feridas de extração dental, baseando-nos na literatura, pode ser inferido que tais resultados se devem à diferentes fatores como a capacidade do O<sub>3</sub> de promover maior suprimento de sangue no tecido injuriado, aumentando a oxigenação deste tecido. Estudos mostram que o O<sub>3</sub> tem a capacidade

de melhorar o metabolismo do oxigênio, estimulando importantes enzimas que participam de sua metabolização, aumentando a saturação de oxigênio no sangue circulante com consequente aumento do aporte de oxigênio às células do organismo, a oxigenação e a respiração celular <sup>35</sup>.

Não existe ainda um consenso na literatura em relação a dose mais eficaz de O<sub>3</sub> para a melhora na reparação de feridas ósseas e regeneração tecidual. Estudos mostraram que a dose de 0,7 mg/kg de animal administrada por via intraperitoneal beneficiou a reparação de feridas de extração dental a longo prazo de pós-operatório e que a aplicação de O<sub>3</sub> via sistêmica acelera a cicatrização do osso alveolar após a extração <sup>5</sup>, e, no tratamento da doença periodontal induzida, reduz a atividade osteoclástica e a perda óssea alveolar <sup>28</sup>.

Na análise comparativa dos nossos resultados com os de Erdemci et al (2014)<sup>5</sup> e o de Saglam et al. (2020)<sup>28</sup> notamos que a dose de 0,7 mg/kg de peso do animal, mostrou-se efetiva também em nosso estudo, porém, a dose de 1,0 mg/kg foi a que demonstrou os melhores resultados em nosso estudo, o que abre espaço para pesquisas futuras.

Os efeitos benéficos da ozonioterapia também foram comprovados em pesquisas em diferentes modelos e doses. Estudos documentaram efeitos protetores da ozonioterapia na isquemia e reperfusão na injúria de ovários de ratas, quando tratadas com baixa dose (0,5 mg/kg), obtendo redução de marcadores inflamatórios durante a isquemia dos ovários <sup>36</sup>, enquanto outros com doses mais elevadas (1,0 e 2,0 mg/kg) observaram melhora na reparação de injúrias cerebrais por hipóxia isquêmica, onde a dose de 2,0 mg/kg foi a que diminuiu a taxa de apoptose neural com maior eficácia <sup>37</sup>.

A ozonioterapia tenha sido aplicada em diferentes áreas da Odontologia, como na Periodontia, Estomatologia, Dentística, Cirurgia, Prótese, Ortodontia e Implantodontia com vários graus de eficácia da ozonioterapia, com bons resultados na odontologia restauradora, tratamento de canal radicular e osteonecrose da mandíbula, mas evidências conflitantes ou

insuficientes são notadas em cirurgia oral e endodontia<sup>38-40</sup>. Os seus efeitos na reparação óssea alveolar ainda é um assunto inconclusivo que necessita um maior número de pesquisas.

Concordando com esses aspectos favoráveis em relação à utilização do ozônio, nosso estudo apresentou resultados motivadores evidenciando que existe um favorecimento à formação e reparação óssea de alvéolos pós exodontia, onde os marcadores de osteocalcina e as áreas de formação óssea apresentaram-se maiores nos grupos em que foram administrados a terapia com ozônio.

## CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo pode ser concluído que o uso sistêmico da mistura O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> beneficiou a reparação óssea; que a dose empregada do ozônio possui relevância para melhorar os eventos biológicos; que os resultados mais favoráveis foram evidenciados com a dose de ozônio de 1,0 mg/Kg de animal (50 µg/ml de O<sub>3</sub>).

## REFERÊNCIAS

1. Zarb GA, Schmitt A. The longitudinal clinical effectiveness of osseointegrated dental implants: The Toronto study. Part II: The prosthetic results. *J Prosthet Dent.* 1990 Jul;64(1):53–61.
2. Okamoto T, de Russo MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Aracatuba.* 1973;2(2):153–69.
3. Hassumi JS, Mulinari-Santos G, Fabris AL da S, Jacob RGM, Gonçalves A, Rossi AC, et al. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:1–12.
4. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone.* 2019 Mar;120:101–13.
5. Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M, Bassorgun I, Ozler M, Oter S, et al. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar

- bone healing following tooth extraction in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(6):777–83.
6. Araujo M, Silva C, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol 2000*. 2015;68(1):122–34.
  7. Okamoto T, Fialho A. Estudo histológico comparativo entre dois métodos de obtenção de cortes de alvéolos de ratos. *Rev Odont UNESP* . 1990;19:63–74.
  8. Vermeulen A, Vermeer C, Bosman F. Histochemical detection of osteocalcin in normal and pathological human bone. *J Histochem Cytochem*. 1989;37(10):1503–8.
  9. Engler-Pinto A, Siéssere S, Calefi A, Oliveira L, Ervolino E, de Souza S, et al. Effects of leukocyte- and platelet-rich fibrin associated or not with bovine bone graft on the healing of bone defects in rats with osteoporosis induced by ovariectomy. *Clin Oral Implants Res*. 2019 Oct;30(10):962–76.
  10. Devlin MJ, Eick GN, Snodgrass JJ. The utility of dried blood spot measurement of bone turnover markers in biological anthropology. *Am J Hum Biol*. 2022 Nov;34(11):e23816.
  11. Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino E, Barattolo R, Zambonin G, et al. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol*. 1994;127(4):1149–58.
  12. Zanatta LCB, Boguszewski CL, Borba VZC, Kulak CAM. Osteocalcina, metabolismo energético e da glicose. *Arq bras endocrinol metab* . 2014;58(5):444–51.
  13. Avolio G, Brandão CM, Xavier de Oliveira J, Costa C, Alonso G. The role of vitamin D 3 and osteocalcin in the bone metabolism: a necessary analysis to optimize the osteointegration. *J Health Sci Inst* . 2008 Jul;26(3):347–50.
  14. Hayman A. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008 May;41(3):218–23.
  15. Barbeck M, Fienitz T, Jung AK, Jung O, Alkildani S, Rothamel D. Comparison of the validity of enzymatic and immunohistochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in the context of biocompatibility analyses of bone substitutes. *In Vivo (Brooklyn)*. 2022 Sep;36(5):2042–51.
  16. Hidalgo-Tallón FJ, Torres-Morera LM, Baeza-Noci J, Carrillo-Izquierdo MD, Pinto-Bonilla R. Updated review on ozone therapy in pain medicine. *Front Physiol*. 2022 Feb;13:840623.
  17. Rubin MB, Friedrich C. The history of ozone. The Schönbein period , 1839-1868. *Bull Hist Chem [Internet]*. 2001;26(1):40–56. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/THE-HISTORY-OF-OZONE.-THE-SCHÖNBEIN-PERIOD%2C-Rubin/c264b7525b84cc5c9a8cd1b5b2a0a3ce67f3fd2e>
  18. Adel D, Chern J. The xtructure of ozone. *Physics (College Park Md)*. 1942;14:14.
  19. Stoker G. The surgical uses of ozone. *The Lancet*. 1916;188(4860):712.

20. Stoker G. The surgical uses of ozone. *The Lancet*. 1917;189(4891):797.
21. Schwartz A, Director MD, Martínez-Sánchez G. Ozone therapy and its scientific foundations. *Revista Española de Ozonoterapia*. 2012;2(1):199–232.
22. AL-Omiri MK, Alqahtani NM, Alahmari NM, Hassan RA, Al Nazeh AA, Lynch E. Treatment of symptomatic, deep, almost cariously exposed lesions using ozone. *Sci Rep*. 2021 Dec;11(1).
23. Sinha N, Asthana G, Parmar G, Langaliya A, Shah J, Kumbhar A, et al. Evaluation of ozone therapy in endodontic treatment of teeth with necrotic pulp and apical periodontitis: A randomized clinical trial. *J Endod*. 2021 Dec;47(12):1820–8.
24. Rapone B, Ferrara E, Santacroce L, Topi S, Gnoni A, Dipalma G, et al. The gaseous ozone therapy as a promising antiseptic adjuvant of periodontal treatment: A randomized controlled clinical trial. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Jan;19(2):1–14.
25. Firoozi P, Moreira Falci SG, Kim SG, Assael LA. Nonpharmacological complementary interventions for the management of pain after third molar surgery: An umbrella review of current meta-analyses. *Pain Res Manag*. 2022;2022:1816748.
26. Bahl D, Samuel S, Charyulu RN, Dole S. Use of topical ozone therapy for wound healing after transalveolar extractions: A miracle alternative therapy. *World J Dent*. 2022 Jan 1;13(1):57–61.
27. du Sert NP, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the arrive guidelines 2.0. *PLoS Biol*. 2020 Jul 1;18(7).
28. Saglam E, Alinca SB, Celik TZ, Hacisalihoglu UP, Dogan MA. Evaluation of the effect of topical and systemic ozone application in periodontitis: An experimental study in rats. *J Appl Oral Sci*. 2020;28.
29. Bocci V, Di Paolo N. Oxygen-ozone therapy in medicine: An update. *Blood Purif*. 2009 Dec;28(4):373–6.
30. Masan J, Sramka M, Rabarova D, Elizabeth S. The possibilities of using the effects of ozone therapy in neurology. *Neuro Endocrinol Lett*. 2021 Mar;42(1):13–21.
31. Srikanth A, Sathish M, Harsha AVS. Application of ozone in the treatment of periodontal disease. *J Pharm Bioallied Sci*. 2013 Jun;5(SUPPL.1).
32. Alpan AL, Toker H, Ozer H. Ozone therapy enhances osseous healing in rats with diabetes with calvarial defects: A morphometric and immunohistochemical study. *J Periodontol*. 2016 Aug;87(8):982–9.
33. Kazancioglu HO, Ezirganli S, Aydin MS. Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. *J Craniofac Surg*. 2013 Nov;24(6):2141–6.

34. Ozdemir H, Toker H, Balci H, Ozer H. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: A histologic and histometric study in rats. *J Periodontal Res.* 2013 Dec;48(6):722–6.
35. Seidler V, Linetskiy I, Hubálková H, Stankova H, Smucler R, Mazanek J. Ozone and its usage in general medicine and dentistry. A review article. *Prague Med Rep [Internet]*. 2008 Feb;109(1):5–13. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/23678941>
36. Aslan MK, Boybeyi Ö, Şenyücel MF, Ayva Ş, Kisa Ü, Aksoy N, et al. Protective effect of intraperitoneal ozone application in experimental ovarian ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 2012 Sep;47(9):1730–4.
37. Resitoglu B, Celik Y, Komur M, Polat A, Erdogan S, Arslankoylu AE, et al. The efficacy of ozone therapy in neonatal rats with hypoxic ischemic brain injury. *Bratisl Med J.* 2018;119(2):81–5.
38. Suh Y, Patel S, Kaitlyn R, Gandhi J, Joshi G, Smith N, et al. Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. *Med Gas Res.* 2019;9(3):163–7.
39. Gupta G, Mansi B. Ozone therapy in periodontics. *J Med Life.* 2012;5(1):59–67.
40. Barczyk I, Masłyk D, Walczuk N, Kijak K, Skomro P, Gronwald H, et al. Potential clinical applications of ozone therapy in dental specialties—a literature Review, supported by own observations. *Int J Environ Res Public Health.* 2023 Feb;20(3).

## ANEXO 1

## Comitê de Ética da Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Efeitos da ozonioterapia sistêmica na reparação de feridas de extração dental em ratos**", Processo FOA nº 0123-2021, sob responsabilidade de Valdir Gouveia Garcia apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Junho de 2021.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 24 de Dezembro de 2022.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 24 de Janeiro de 2023.

## CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Effects of systemic ozonotherapy on the repair of dental extraction wounds in rats**", Protocol FOA nº 0123-2021, under the supervision of Valdir Gouveia Garcia presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 24, 2021.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** December 24, 2022.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** January 24, 2023.

**Prof. Associado João Carlos Callera**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP  
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: [ceua.foa@unesp.br](mailto:ceua.foa@unesp.br)

## ANEXO 2

**TESTE DE NORMALIDADE DE SHAPIRO-WILK,  
ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E PÓS-TESTE DE TUKEY  
Porcentagem de Tecido Ósseo (PTO)**

**TESTE DE NORMALIDADE DE SHAPIRO-WILK**

SHAPIRO-WILK	C-7d	C-14d	C-28d	0Z15-7d	0Z15-14d	0Z15-21d
	- 1 -	- 2 -	- 3 -	- 4 -	- 5 -	- 6 -
Desvio máximo =	0.2216	0.193	0.1528	0.2338	0.2062	0.2633
Valor crítico (0.05) =	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Valor crítico (0.01) =	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348
p(valor)	ns	Ns	ns	ns	ns	ns

SHAPIRO-WILK	0Z35-7d	0Z35-14d	0Z35-21d	0Z50-7d	0Z50-14d	0Z50-21d
	- 7 -	- 8 -	- 9 -	- 10 -	- 11 -	- 12 -
Desvio máximo =	0.2463	0.2581	0.2272	0.2048	0.1559	0.1766
Valor crítico (0.05) =	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Valor crítico (0.01) =	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348
p(valor)	ns	Ns	ns	ns	ns	ns

**ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E PÓS-TESTE DE TUKEY  
Porcentagem de Tecido Ósseo (PTO)**

FONTES DE VARIACÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	11	29.3 e+03	26.7 e+02
Erro	72	755.105	10.488
F =	254.1332		
(p) =	< 0.0001		
Média (Coluna 1) =	8.6243		
Média (Coluna 2) =	24.4657		
Média (Coluna 3) =	48.3971		
Média (Coluna 4) =	10.31		
Média (Coluna 5) =	27.5457		
Média (Coluna 6) =	53.53		
Média (Coluna 7) =	11.6243		
Média (Coluna 8) =	30.6714		
Média (Coluna 9) =	56.1129		

Média (Coluna 10) =	14.8286		
Média (Coluna 11) =	35.05		
Média (Coluna 12) =	64.5586		
<b>Tukey:</b>	<b>Diferença</b>	<b>Q</b>	<b>(p)</b>
Médias ( 1 a 2) =	15.8414	12.9421	< 0.01
Médias ( 1 a 3) =	39.7729	32.4936	< 0.01
Médias ( 1 a 4) =	1.6857	1.3772	ns
Médias ( 1 a 5) =	18.9214	15.4584	< 0.01
Médias ( 1 a 6) =	44.9057	36.6871	< 0.01
Médias ( 1 a 7) =	3	2.4509	ns
Médias ( 1 a 8) =	22.0471	18.0121	< 0.01
Médias ( 1 a 9) =	47.4886	38.7972	< 0.01
Médias ( 1 a 10) =	6.2043	5.0688	< 0.05
Médias ( 1 a 11) =	26.4257	21.5893	< 0.01
Médias ( 1 a 12) =	55.9343	45.6972	< 0.01
Médias ( 2 a 3) =	23.9314	19.5515	< 0.01
Médias ( 2 a 4) =	14.1557	11.5649	< 0.01
Médias ( 2 a 5) =	3.08	2.5163	ns
Médias ( 2 a 6) =	29.0643	23.745	< 0.01
Médias ( 2 a 7) =	12.8414	10.4912	< 0.01
Médias ( 2 a 8) =	6.2057	5.0699	< 0.05
Médias ( 2 a 9) =	31.6471	25.8551	< 0.01
Médias ( 2 a 10) =	9.6371	7.8734	< 0.01
Médias ( 2 a 11) =	10.5843	8.6472	< 0.01
Médias ( 2 a 12) =	40.0929	32.7551	< 0.01
Médias ( 3 a 4) =	38.0871	31.1164	< 0.01
Médias ( 3 a 5) =	20.8514	17.0352	< 0.01
Médias ( 3 a 6) =	5.1329	4.1934	ns
Médias ( 3 a 7) =	36.7729	30.0427	< 0.01
Médias ( 3 a 8) =	17.7257	14.4816	< 0.01
Médias ( 3 a 9) =	7.7157	6.3036	< 0.01
Médias ( 3 a 10) =	33.5686	27.4249	< 0.01
Médias ( 3 a 11) =	13.3471	10.9044	< 0.01
Médias ( 3 a 12) =	16.1614	13.2036	< 0.01
Médias ( 4 a 5) =	17.2357	14.0812	< 0.01
Médias ( 4 a 6) =	43.22	35.3099	< 0.01
Médias ( 4 a 7) =	1.3143	1.0737	ns
Médias ( 4 a 8) =	20.3614	16.6349	< 0.01
Médias ( 4 a 9) =	45.8029	37.42	< 0.01
Médias ( 4 a 10) =	4.5186	3.6916	ns
Médias ( 4 a 11) =	24.74	20.2121	< 0.01
Médias ( 4 a 12) =	54.2486	44.32	< 0.01
Médias ( 5 a 6) =	25.9843	21.2287	< 0.01
Médias ( 5 a 7) =	15.9214	13.0075	< 0.01

<b>Médias ( 5 a 8) =</b>	<b>3.1257</b>	<b>2.5536</b>	<b>ns</b>
<b>Médias ( 5 a 9) =</b>	<b>28.5671</b>	<b>23.3388</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 5 a 10) =</b>	<b>12.7171</b>	<b>10.3897</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 5 a 11) =</b>	<b>7.5043</b>	<b>6.1309</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 5 a 12) =</b>	<b>37.0129</b>	<b>30.2388</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 6 a 7) =</b>	<b>41.9057</b>	<b>34.2361</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 6 a 8) =</b>	<b>22.8586</b>	<b>18.675</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 6 a 9) =</b>	<b>2.5829</b>	<b>2.1101</b>	<b>ns</b>
<b>Médias ( 6 a 10) =</b>	<b>38.7014</b>	<b>31.6183</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 6 a 11) =</b>	<b>18.48</b>	<b>15.0978</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 6 a 12) =</b>	<b>11.0286</b>	<b>9.0101</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 7 a 8) =</b>	<b>19.0471</b>	<b>15.5611</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 7 a 9) =</b>	<b>44.4886</b>	<b>36.3463</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 7 a 10) =</b>	<b>3.2043</b>	<b>2.6178</b>	<b>ns</b>
<b>Médias ( 7 a 11) =</b>	<b>23.4257</b>	<b>19.1383</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 7 a 12) =</b>	<b>52.9343</b>	<b>43.2463</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 8 a 9) =</b>	<b>25.4414</b>	<b>20.7851</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 8 a 10) =</b>	<b>15.8429</b>	<b>12.9433</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 8 a 11) =</b>	<b>4.3786</b>	<b>3.5772</b>	<b>ns</b>
<b>Médias ( 8 a 12) =</b>	<b>33.8871</b>	<b>27.6851</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 9 a 10) =</b>	<b>41.2843</b>	<b>33.7285</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 9 a 11) =</b>	<b>21.0629</b>	<b>17.2079</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 9 a 12) =</b>	<b>8.4457</b>	<b>6.9</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 10 a 11) =</b>	<b>20.2214</b>	<b>16.5205</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 10 a 12) =</b>	<b>49.73</b>	<b>40.6284</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>Médias ( 11 a 12) =</b>	<b>29.5086</b>	<b>24.1079</b>	<b>&lt; 0.01</b>

## ANEXO 3

## Avaliação do Imunomarcador Osteocalcina (OCN)

OCN	Resultados	- 2 -
H =	60.1733	
Graus de liberdade =	11	
(p) Kruskal-Wallis =	0	
R 1 (posto médio) =	14	
R 2 (posto médio) =	28.1429	
R 3 (posto médio) =	55.1429	
R 4 (posto médio) =	14	
R 5 (posto médio) =	28.1429	
R 6 (posto médio) =	55.1429	
R 7 (posto médio) =	28.1429	
R 8 (posto médio) =	47	
R 9 (posto médio) =	63.2857	
R 10 (posto médio) =	42.2857	
R 11 (posto médio) =	59.2143	
R 12 (posto médio) =	75.5	
<b>Student-Newman-Keuls</b>	<b>Dif. Postos</b>	<b>p-valor</b>
Grupos ( 1 e 2) =	14.1429	0.2781
Grupos ( 1 e 3) =	41.1429	0.0016
Grupos ( 1 e 4) =	0	1
Grupos ( 1 e 5) =	14.1429	0.2781
Grupos ( 1 e 6) =	41.1429	0.0016
Grupos ( 1 e 7) =	14.1429	0.2781
Grupos ( 1 e 8) =	33	0.0114
Grupos ( 1 e 9) =	49.2857	0.0002
Grupos ( 1 e 10) =	28.2857	0.0301
Grupos ( 1 e 11) =	45.2143	0.0005
Grupos ( 1 e 12) =	61.5	< 0.0001
Grupos ( 2 e 3) =	27	0.0384
Grupos ( 2 e 4) =	14.1429	0.2781
Grupos ( 2 e 5) =	0	1
Grupos ( 2 e 6) =	27	0.0384
Grupos ( 2 e 7) =	0	1
Grupos ( 2 e 8) =	18.8571	0.1481
Grupos ( 2 e 9) =	35.1429	0.007
Grupos ( 2 e 10) =	14.1429	0.2781
Grupos ( 2 e 11) =	31.0714	0.0172
Grupos ( 2 e 12) =	47.3571	0.0003
Grupos ( 3 e 4) =	41.1429	0.0016
Grupos ( 3 e 5) =	27	0.0384
Grupos ( 3 e 6) =	0	1

Grupos ( 3 e 7) =	27	0.0384
Grupos ( 3 e 8) =	8.1429	0.5323
Grupos ( 3 e 9) =	8.1429	0.5323
Grupos ( 3 e 10) =	12.8571	0.3241
Grupos ( 3 e 11) =	4.0714	0.7548
Grupos ( 3 e 12) =	20.3571	0.1184
Grupos ( 4 e 5) =	14.1429	0.2781
Grupos ( 4 e 6) =	41.1429	0.0016
Grupos ( 4 e 7) =	14.1429	0.2781
Grupos ( 4 e 8) =	33	0.0114
Grupos ( 4 e 9) =	49.2857	0.0002
Grupos ( 4 e 10) =	28.2857	0.0301
Grupos ( 4 e 11) =	45.2143	0.0005
Grupos ( 4 e 12) =	61.5	< 0.0001
Grupos ( 5 e 6) =	27	0.0384
Grupos ( 5 e 7) =	0	1
Grupos ( 5 e 8) =	18.8571	0.1481
Grupos ( 5 e 9) =	35.1429	0.007
Grupos ( 5 e 10) =	14.1429	0.2781
Grupos ( 5 e 11) =	31.0714	0.0172
Grupos ( 5 e 12) =	47.3571	0.0003
Grupos ( 6 e 7) =	27	0.0384
Grupos ( 6 e 8) =	8.1429	0.5323
Grupos ( 6 e 9) =	8.1429	0.5323
Grupos ( 6 e 10) =	12.8571	0.3241
Grupos ( 6 e 11) =	4.0714	0.7548
Grupos ( 6 e 12) =	20.3571	0.1184
Grupos ( 7 e 8) =	18.8571	0.1481
Grupos ( 7 e 9) =	35.1429	0.007
Grupos ( 7 e 10) =	14.1429	0.2781
Grupos ( 7 e 11) =	31.0714	0.0172
Grupos ( 7 e 12) =	47.3571	0.0003
Grupos ( 8 e 9) =	16.2857	0.2116
Grupos ( 8 e 10) =	4.7143	0.7177
Grupos ( 8 e 11) =	12.2143	0.3489
Grupos ( 8 e 12) =	28.5	0.0288
Grupos ( 9 e 10) =	21	0.1073
Grupos ( 9 e 11) =	4.0714	0.7548
Grupos ( 9 e 12) =	12.2143	0.3489
Grupos ( 10 e 11) =	16.9286	0.1942
Grupos ( 10 e 12) =	33.2143	0.0109
Grupos ( 11 e 12) =	16.2857	0.2116

## ANEXO 4

## Avaliação do Imunomarcador TRAP

<b>TRAP</b>	<b>Resultados</b>	<b>- 2 -</b>
<b>H =</b>	<b>25.2609</b>	
<b>Graus de liberdade =</b>	<b>11</b>	
<b>(p) Kruskal-Wallis =</b>	<b>0.0083</b>	
<b>R 1 (posto médio) =</b>	<b>35</b>	
<b>R 2 (posto médio) =</b>	<b>35</b>	
<b>R 3 (posto médio) =</b>	<b>47</b>	
<b>R 4 (posto médio) =</b>	<b>35</b>	
<b>R 5 (posto médio) =</b>	<b>35</b>	
<b>R 6 (posto médio) =</b>	<b>47</b>	
<b>R 7 (posto médio) =</b>	<b>35</b>	
<b>R 8 (posto médio) =</b>	<b>47</b>	
<b>R 9 (posto médio) =</b>	<b>59</b>	
<b>R 10 (posto médio) =</b>	<b>35</b>	
<b>R 11 (posto médio) =</b>	<b>41</b>	
<b>R 12 (posto médio) =</b>	<b>59</b>	
<b>Student-Newman-Keuls</b>	<b>Dif. Postos</b>	<b>p-valor</b>
<b>Grupos ( 1 e 2) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 1 e 3) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 1 e 4) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 1 e 5) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 1 e 6) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 1 e 7) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 1 e 8) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 1 e 9) =</b>	<b>24</b>	<b>0.0657</b>
<b>Grupos ( 1 e 10) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 1 e 11) =</b>	<b>6</b>	<b>0.6454</b>
<b>Grupos ( 1 e 12) =</b>	<b>24</b>	<b>0.0657</b>
<b>Grupos ( 2 e 3) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 2 e 4) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 2 e 5) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 2 e 6) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 2 e 7) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 2 e 8) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 2 e 9) =</b>	<b>24</b>	<b>0.0657</b>
<b>Grupos ( 2 e 10) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 2 e 11) =</b>	<b>6</b>	<b>0.6454</b>
<b>Grupos ( 2 e 12) =</b>	<b>24</b>	<b>0.0657</b>
<b>Grupos ( 3 e 4) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 3 e 5) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>

<b>Grupos ( 3 e 6) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 3 e 7) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 3 e 8) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 3 e 9) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 3 e 10) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 3 e 11) =</b>	<b>6</b>	<b>0.6454</b>
<b>Grupos ( 3 e 12) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 4 e 5) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 4 e 6) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 4 e 7) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 4 e 8) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 4 e 9) =</b>	<b>24</b>	<b>0.0657</b>
<b>Grupos ( 4 e 10) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 4 e 11) =</b>	<b>6</b>	<b>0.6454</b>
<b>Grupos ( 4 e 12) =</b>	<b>24</b>	<b>0.0657</b>
<b>Grupos ( 5 e 6) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 5 e 7) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 5 e 8) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 5 e 9) =</b>	<b>24</b>	<b>0.0657</b>
<b>Grupos ( 5 e 10) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 5 e 11) =</b>	<b>6</b>	<b>0.6454</b>
<b>Grupos ( 5 e 12) =</b>	<b>24</b>	<b>0.0657</b>
<b>Grupos ( 6 e 7) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 6 e 8) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 6 e 9) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 6 e 10) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 6 e 11) =</b>	<b>6</b>	<b>0.6454</b>
<b>Grupos ( 6 e 12) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 7 e 8) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 7 e 9) =</b>	<b>24</b>	<b>0.0657</b>
<b>Grupos ( 7 e 10) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 7 e 11) =</b>	<b>6</b>	<b>0.6454</b>
<b>Grupos ( 7 e 12) =</b>	<b>24</b>	<b>0.0657</b>
<b>Grupos ( 8 e 9) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 8 e 10) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 8 e 11) =</b>	<b>6</b>	<b>0.6454</b>
<b>Grupos ( 8 e 12) =</b>	<b>12</b>	<b>0.3574</b>
<b>Grupos ( 9 e 10) =</b>	<b>24</b>	<b>0.0657</b>
<b>Grupos ( 9 e 11) =</b>	<b>18</b>	<b>0.1674</b>
<b>Grupos ( 9 e 12) =</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Grupos ( 10 e 11) =</b>	<b>6</b>	<b>0.6454</b>
<b>Grupos ( 10 e 12) =</b>	<b>24</b>	<b>0.0657</b>
<b>Grupos ( 11 e 12) =</b>	<b>18</b>	<b>0.1674</b>

## 2 Artigo científico 2

Artigo de acordo com as normas da Faculdade ILAPEO, para futura publicação no periódico  
**International Journal of Implant Dentistry**

### **INCIDENCE OF SINUSITIS AFTER SURGERY FOR ZYGOMATIC IMPLANT PLACEMENT IN PATIENTS WITH ATROPHIC MAXILLA: A SYSTEMATIC REVIEW.**

**Authors:**

Erton Massamitsu Miyasawa  
Camila Pereira Vianna  
Roberta Schroder Rocha  
Paulo Domingos Ribeiro Júnior  
Larissa Carvalho Trojan  
Luis Eduardo Marques Padovan

#### ABSTRACT

*Objective:* The aim of this systematic review is to verify the prevalence of sinusitis in patients with atrophic maxilla who were rehabilitated with zygomatic implants.  
*Methods:* Electronic searches were made for prospective cohort, retrospective cohort, ambidirectional, or randomized controlled trial studies in humans. According to pre-established criteria.

*Results:* A total of 25 studies were included for data extraction and quality assessment by two independent reviewers. The selected studies were published between 2005 and 2019 and included a total of 1050 patients with mean ages ranging from 48 to 63 years old and a total of 2423 zygomatic implants. There was no occurrence of sinusitis in 9 studies, while it ranged from 1.85% to 92.5% cases in the other 16 studies, with higher incidence for intrasinus technique. Regarding the quality assessment of the studies, the only RCT included in this review presented some concerns regarding the risk of bias, according to ROB-2 tool, whereas most of the observational studies were evaluated as presenting a serious or critical risk of bias, according to ROBINS-I tool. The mean incidence of sinusitis in patients with zygomatic implants rehabilitation is 13.56% and it seems to be related to their placement technique.

*Conclusions:* The present study is most based on observational studies with serious or critical risk of bias. Therefore, it should be interpreted with caution, and more randomized controlled studies are needed for better comprehension.

## **INTRODUCTION**

After teeth loss, the maxilla suffers a continuous process of bone resorption that leads to maxillary ridges atrophy, with irreversible and cumulative characteristics. This condition results in mucosal, functional, psychologic, aesthetics, and economic problems for patients. In severe cases, rehabilitation with conventional implants is limited by insufficient bone quantity and quality, which can be exacerbated by pneumatized maxillary sinus and wide nasal cavity<sup>1,2</sup>.

The therapeutic approach with dental implants on atrophic maxilla can be based on grafting and reconstruction or anchorage techniques. Normally, reconstruction treatments require longer periods as well as higher costs and morbidity. On the other hand, anchorage techniques associated with tilted implants, enable faster recovery to the patients, usually with lower costs<sup>3,4</sup>. Zygomatic implants (ZI) are included in this treatment category, in which their fixation, on zygomatic bone, is located in a distance, unattainable by conventional dental implants<sup>5,6</sup>.

Three principal techniques for ZI installation are well described in the literature. The first one was introduced by Branemark in the late 80's and its main characteristic is the implant head positioning in the palatal region, crossing the maxillary sinus, and anchored in the zygomatic bone<sup>7</sup>. In 2000, Stela e Warner proposed a technique modification taking the implant head over the maxillary ridge, and consequently, positioning it buccally, against the lateral wall of maxillary sinus<sup>8</sup>. The third one, known as exteriorization technique, the implant is anchored on zygomatic bone without penetrating sinus maxillary interior, being supported, mostly, in the bony crest of the residual ridge region<sup>9</sup>.

Among complications related to ZI, sinusitis or sinus infections are the most reported<sup>10</sup> and thereby, this systematic review aims to verify their prevalence.

## **METHODS**

### **Search strategy and studies selection**

Electronic searches were made in the Pubmed, EMBASE, Scielo, Lilacs, Cochrane Controlled Trials Database and Scopus databases for studies published up

to January 24<sup>th</sup>. The search strategies included key words combination, as seen in Table 1, and were customized according to the database being searched.

Table 1. Search terms used for Pubmed/MEDLINE, Embase, Scielo, Lilacs, Cochrane and Scopus.

((("atrophy"[MeSH Terms]) OR ("bone resorption"[MeSH Terms])) OR ("dental implants"[MeSH Terms]) OR ("dental implantation"[MeSH Terms]) OR ("dental prosthesis"[MeSH Terms]) OR ("maxilla"[MeSH Terms])) OR ("jaw, edentulous"[MeSH Terms]) OR ("jaw"[MeSH Terms]) OR ("atrophy/surgery"[MeSH Terms]) OR ("bone resorption/physiopathology"[MeSH Terms]) OR ("maxilla/surgery"[MeSH Terms]) OR ("jaw, edentulous/rehabilitation"[MeSH Terms]) OR ("atrophies"[All Fields]) OR ("bone resorptions"[All Fields]) OR ("dental implant"[All Fields]) OR ("surgical dental prosthesis"[All Fields]) OR ("dental prosthesis implantation"[All Fields]) OR ("surgical dental treatment"[All Fields]) OR ("maxillary bone"[All Fields]) OR ("maxillae"[All Fields]) OR ("edentulous jaw"[All Fields]) OR ("edentulous jaws"[All Fields]) OR ("jaws"[All Fields]))

**AND**

(((((("zygoma"[MeSH Terms]) OR ("zygoma/surgery"[MeSH Terms])) OR ("zygomas"[All Fields]) OR ("malar bone"[All Fields]) OR ("cheek bones"[All Fields]) OR ("zygomatic arch"[All Fields]) OR ("malar"[All Fields]) OR ("zygomatic"[All Fields]) OR ("zygomatic implants"[All Fields]))))

**AND**

("sinusitis"[MeSH Terms]) OR ("maxillary sinusitis"[MeSH Terms]) OR ("paranasal sinus diseases"[MeSH Terms]) OR ("postoperative complications"[MeSH Terms]) OR ("sinus infection"[All Fields]) OR ("sinusitides"[All Fields]) OR ("maxillary sinusitides"[All Fields]) OR ("paranasal sinus disease"[All Fields]) OR ("postoperative complication"[All Fields]) OR ("sinus infections"[All Fields]) OR ("rhinosinusitis"[All Fields]) OR ("rhinosinusitides"[All Fields]))

Initial screening of titles and abstracts was performed by two independent reviewers. After that, full-reading and selection of studies were carried out for data extraction. It was based on the criteria described in Table 2.

Table 2. Inclusion and exclusion criteria applied in study selection.

Inclusion criteria	Exclusion criteria
Studies with humans	In vitro assays
Patients with atrophic maxilla	Case reports, case series, systematic reviews and meta-analyses
Studies that evaluated occurrence of sinusitis after the procedure	Publications in languages other than English, Portuguese and Spanish
Prospective cohort, retrospective cohort, ambidirectional, or randomized controlled trial studies	
Studies in Portuguese, Spanish or English.	

## Quality assessment of included studies

The risk of bias for RCT was assessed by two independent reviewers using Cochrane Risk of Bias tool (RoB 2.0)<sup>11</sup> and the Risk of Bias in Non-randomized Studies (ROBINS-I)<sup>12</sup> for observational studies. Any disagreement between reviewers was resolved after additional discussion. Pre-operative evaluation of sinus health as well as technique for zygomatic implants placements were considered as confounding factors when not controlled in included studies.

## RESULTS

From twenty-five publications included in this review: eleven retrospective cohort studies, twelve prospective cohort studies, one ambidirectional cohort study, and one RCT of parallel groups with two arms. The study selection process is illustrated in the PRISMA flow diagram (Figure 1).

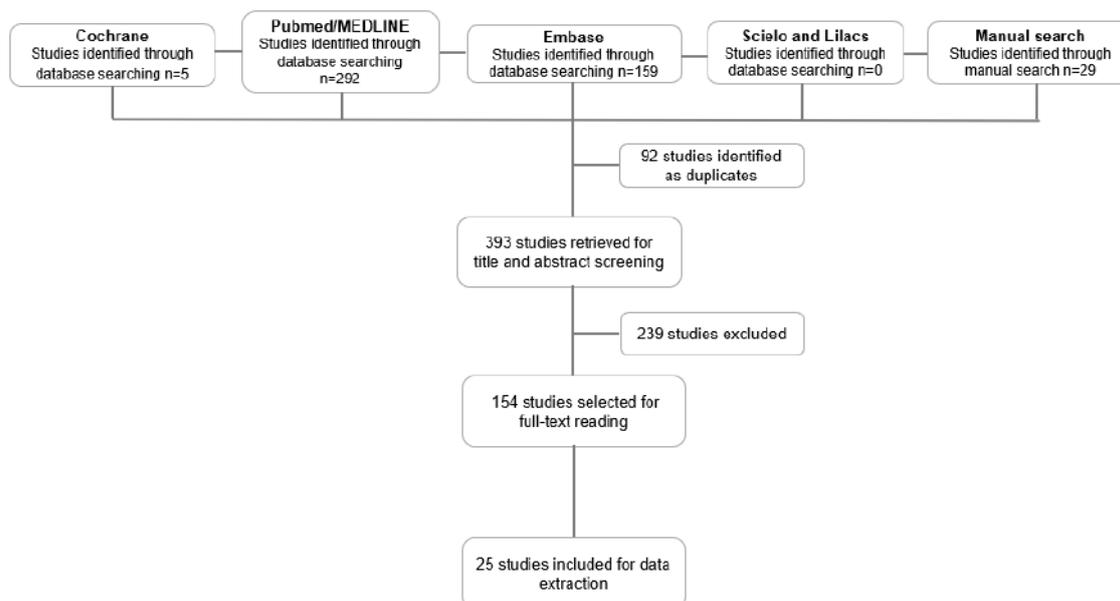


Figure 1. Flow chart according to the PRISMA statement.

The selected studies were published between 2005 and 2019 and included a total of 1050 patients with mean ages ranging from 48 to 63 years old and a total of 2423 zygomatic implants. Follow-up time ranged from 6 months to 18 years, and the mean of implant survival rate found was 96.97% ( $\pm 2.88$ ) and the range between 90.3% and 100%, despite one study that did not report it.

Regarding the technique used for zygomatic implant placement, 12 studies reported applying intrasinus (Branemark), 4 studies reported extrasinus, 2 studies reported the use of sinus slot, and 4 studies reported the use of both intra and extra sinus techniques, depending on subjects' anatomy. Two studies were not clear about the techniques used for interventions. Among the 25 studies, 10 conducted conventional loading (after healing period) of implants, whereas 11 studies described immediate or early loading. Implants were reported to be loaded under both immediate and conventional protocols in 2 studies.

Pre-operative sinus health evaluation was described in 19 studies, and in 6 it was not clearly specified. Nevertheless, the presence of acute sinusitis was expressly considered exclusion criteria in only 4 studies. Method for sinusitis diagnostic has lacked in most studies, CBCT was used in 7 studies, while radiography and questionnaires were applied by fewer authors. There was no occurrence of sinusitis in 9 studies, the mean occurrence was 13.56% ( $\pm$  21.11) and ranged from 1.85% to 92.85% cases in 16 studies. The sinusitis occurrence is described in Table 3 and all data is summarized in Table 4.

Technique	Sinusitis occurrence (%)		Implant survival (%)
	Mean	S.D	
Extrasinus	4.27	7.40	99.17
Intrasinus	21.14	29.24	95.81
Intrasinus and extrasinus	8.31	7.30	97.69
Not informed	13.60	19.23	97.56

Table 3 – Sinusitis occurrence summarized per technique.

**Table 4**  
Included studies characteristics.

Authors	N subjects	Mean age (years)	Technique	Number of implants	Implant brand	Loading protocol	Implant survival (%)	Implant success (%)	Previous sinus evaluation	Pre-operative medication	Sinusitis occurrence (%)	Sinusitis diagnostic method	Follow-up time (years)	Study design
Becker et al. [14]	16	61.1	Intranasus	31	Nobel Biocare, Astra	Conventional loading	90.3	Not informed	Yes	Benzylpenicillin 3 g; Metronidazole 0.5 g	37.5	Not informed	3.8	Ambidirectional cohort study
Zwahlen et al. [15]	18	63	Intranasus	34	Nobel Biocare	Conventional loading	94.1	Not informed	Not informed	Corticosteroid	5.6	Not informed	0.6	Prospective cohort study
Davó et al. [18]	42	57	Intranasus	81	BioCera Brahamark System, Nobel Biocare	Immediate loading	100	100	Yes	Not informed	2.3	Not informed	1.7	Retrospective cohort study
Davó et al. [31]	36	Not informed	Intranasus and sinus slot	71	Nobel Biocare	Immediate loading	Not informed	Not informed	Yes	Not informed	0	CBCT	1.8	Prospective cohort study
Davó, Ruben. [16]	24	51.4	Intranasus	45	Nobel Biocare	Conventional loading	97.4	Not informed	Yes	Not informed	20.83	CBCT and radiography	5	Retrospective cohort study
Chow et al. [32]	16	60	Intranasus and extranasus	37	Nobel Biocare	Immediate and early loading	100	100	Yes	Amoxicillin-Clavulanic acid	0	CBCT	2	Prospective cohort study
Aparicio et al. [30]	20	52	Extranasus	36	Nobel Biocare	Immediate and conventional loading	100	Not informed	Not informed	Antibiotics	0	Not informed	3.4	Prospective cohort study
Davó et al. [33]	17	57.7	Intranasus	68	Nobel Biocare	Immediate loading	100	Not informed	Not informed	Amoxicillin-Clavulanic acid 2 g	0	Not informed	1	Prospective cohort study
Aparicio et al. [34]	25	48	Intranasus and extranasus	47	Nobel Biocare	Immediate and early loading	100	Not informed	Not informed	Antibiotics	0	Not informed	5	Prospective cohort study
Stévenart et al. [29]	20	56	Intranasus	80	Nobel Biocare	Immediate and conventional loading	96	Not informed	Yes	Amoxicillin-Clavulanic acid 1 g	50	Not informed	3.3	Prospective cohort study
Sartori et al. [35]	16	Not informed	Not informed	37	Neodent	Immediate loading	100	100	Not informed	Not informed	0	Not informed	1	Prospective cohort study
Migloranca et al. [36]	21	55.14	Extranasus	40	Nobel Biocare	Immediate loading	97.5	97.5	Not informed	Cephalexin 2 g	0	Not informed	8	Prospective cohort study
Urgel et al. [41]	54	56	Intranasus	101	Nobel Biocare	Conventional loading	96.04	Not informed	Yes	Not informed	1.85	Not informed	6	Retrospective cohort study
Hinze et al. [37]	10	61.5	Intranasus	22	Nobel Biocare	Immediate loading	90.9	Not informed	Yes	Clindamycin 600 mg	0	CBCT	0.5	Prospective cohort study
Aparicio et al. [21]	22	63	Not informed	41	Nobel Biocare	Conventional loading	95.12	Not informed	Yes	Not informed	27.2	CBCT, LMS and questionnaire	10	Prospective cohort study
Malo et al. [19]	39	53.5	Extranasus	92	Nobel Biocare	Immediate loading	100	Not informed	Yes	Not informed	12.82	Not informed	3	Retrospective cohort study
Aparicio et al. [38]	102	Not informed	Intranasus and extranasus	197	Nobel Biocare	Immediate loading	95.12	Not informed	Yes	Not informed	3.75	Questionnaire and CBCT	7.31	Ambidirectional cohort study
Bohner et al. [22]	14	60	Intranasus	58	Nobel Biocare	Conventional loading	97	Not informed	Yes	Not informed	92.85	Intranasus	9.3	Prospective cohort study

(continued on next page)

Table 4 (continued)

Authors	N subjects	Mean age (years)	Technique	Number of implants	Implant brand	Loading protocol	Implant survival (%)	Implant success (%)	Previous sinus evaluation	Pre operative medication	Sinusitis occurrence (%)	Sinusitis diagnostic method	Follow-up time (years)	Study design
Malo et al. [27]	352	55.2	Intranasal and extranasal	747	Nobel Biocare	Immediate loading	98.2	94.4	Yes	Not informed	7.38	Not informed	7	Retrospective cohort study
D'Agostino et al. [10]	41	54	Intranasal and extranasal	133	Nobel Biocare	Not informed	Not informed	Not informed	Yes	Not informed	14.6	SNOT-20 score and LMS	2.9	Retrospective cohort study
Araújo et al. [23]	37	55.64	Sinus slot	129	Neodent, Conexão	Conventional loading	98.44	Not informed	Yes	Not informed	21.62	Not informed	1	Retrospective cohort study
Atalay et al. [24]	16	53	Intranasal	32	Nobel Biocare	Conventional loading	93.7	93.7	Yes	Not informed	0	Not informed	2.3	Retrospective cohort study
Esposito et al. [28]	35	58.3	Intranasal and extranasal	141	Nobel Biocare	Immediate loading	97.87	Not informed	Yes	Amoxicillin-Garvulanic acid 1750/250 mg or Clindamycin 600 mg Dexamethasone; Amoxicillin	8.57	Not informed	0.3	RCT of parallel group design with two arms
Chana et al. [25]	45	56	Intranasal and extranasal	88	Nobel Biocare	Conventional loading	94.32	Not informed	Yes	600 mg Dexamethasone; Amoxicillin	2.22	Not informed	18	Retrospective cohort study
Aleksandrowicz et al. [26]	22	50.4	Intranasal and extranasal	35	Nobel Biocare	Conventional loading	97.15	97.4	Yes	Not informed	18.18	Not informed	12	Retrospective cohort study

## Quality analysis

The quality assessment of the RCT study is shown in Figure 2 and the analysis of observational studies is in Figure 3. The only RCT study was evaluated as presenting some concerns regarding bias while most observational studies presented a critical or serious risk of bias.

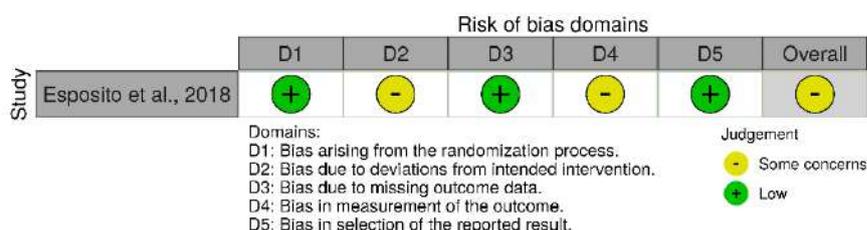


Figure 2 Summary of the risk of bias of the included RCT study according to RoB-2 tool.

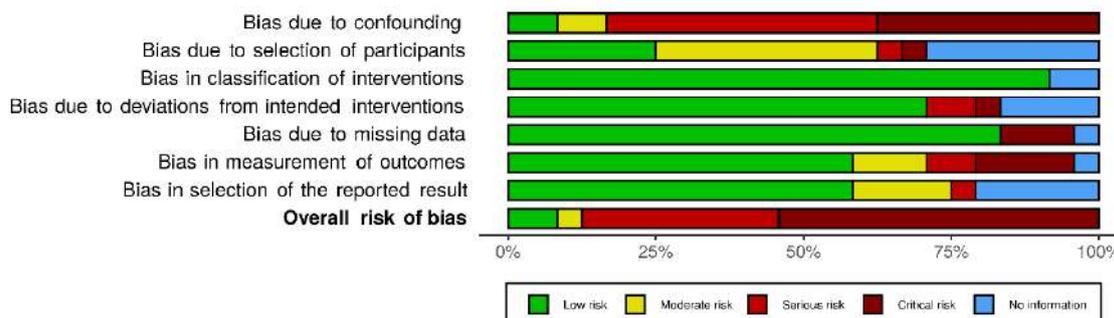


Figure 3. Summary of the risk of bias of included observational studies according to ROBINS-I tool.

## DISCUSSION

Zygomatic implants have been used since the '80s for rehabilitation of atrophic maxilla as an alternative to bone grafts, reducing time, cost, and patients' morbidity<sup>13</sup>. Prosthetic rehabilitation can be associated with conventional (two-stages)<sup>14-16</sup> or immediate loading<sup>17-19</sup>. In this review, 10 studies conducted conventional loading rehabilitation<sup>14-16,20-26</sup>, 14 studies reported immediate or early loading<sup>18,19,27-38</sup>, whereas another one did not specify the loading technique applied<sup>10</sup>. Despite the collection of that data, studies did not present any correlations between loading technique and sinus complications.

Among adverse events associated with zygomatic implants, sinus pathologies are the most frequent<sup>10</sup>, and might be related to the installation technique. In the conventional technique, introduced by Branemark<sup>13</sup>, the zygomatic implant crosses the maxillary sinus and it is anchored in the zygomatic bone. Using a small window in the maxillary bone it is possible to irrigate and raise the sinus membrane. The sinus slot technique, developed by Stella and Warner<sup>8</sup>, in which the implant is positioned tangential to the lateral wall of maxillary sinus, improving the emergence of implant head over the crest of alveolar ridge, facilitating the prosthetic rehabilitation and providing more comfort to the patient. Depending on the anatomy of the external lateral wall of the maxillary sinus (degree of convexity), it is possible to install those implants externally of the maxillary sinus<sup>32,39</sup>. This approach is known as the extrasinus technique, in which the implant does not penetrate the sinus cavity, decreasing the risk of developing sinus pathologies<sup>32,39</sup>.

Among the 25 reviewed studies, 4 approached exclusively the extrasinus technique, reporting its advantages regarding implant position. In 7 studies, the traditional Branemark technique was addressed<sup>14–16,20,22,33,37</sup>, whereas in 2 studies the sinus slot was the reported technique<sup>28,40</sup>. In the 12 remaining studies, the installation approach was not specified, or different techniques were applied according to patients' anatomy. Although the occurrence of sinusitis was not great in most studies (the mean occurrence was 13.56%), there seems to be a relationship with technique applied, since there were more cases of sinus infection when the implants were installed crossing the sinus cavity to attach zygoma bone.

Regarding the quality assessment of the studies, the only RCT included in this review presented some concerns regarding the risk of bias, according to ROB-2 tool, whereas most of the observational studies were evaluated as presenting a serious or critical risk of bias, according to ROBINS-I tool. For greater scientific evidence, it is necessary the development of more randomized clinical trials, addressing methodological issues that are very common in the literature, such as study design, clear definition of sinusitis, diagnostic methods, and standard surgery technique for the study population, in order to eliminate confounding factors. Since the present reviewed is based almost in its totality on observational studies, it should be interpreted with caution.

## CONCLUSIONS

According to the findings of this systematic review, the mean prevalence of sinusitis in patients with zygomatic implants rehabilitation is 13.56% and it seems to be related to their placement technique. However, since the present study is most based on observational studies with serious or critical risk of bias, it should be interpreted with caution, and more randomized controlled studies are needed for better comprehension.

## REFERENCES

1. Atwood, D. A. Reduction of residual ridges: A major oral disease entity. *J. Prosthet. Dent.* **26**, 266–279 (1971).
2. Mercier, P. & Lafontant, R. Residual alveolar ridge atrophy: Classification and influence of facial morphology. *J. Prosthet. Dent.* **41**, 90–100 (1979).
3. Aparicio, C., Perales, P. & Rangert, B. Tilted implants as an alternative to maxillary sinus grafting: A clinical, radiologic, and periotest study. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **3**, 39–49 (2001).
4. Peñarrocha-Oltra, D., Candel-Martí, E., Ata-Ali, J. & Peñarrocha-Diago, M. Rehabilitation of the Atrophic Maxilla With Tilted Implants: Review of the Literature. *J. Oral Implantol.* **39**, 625–632 (2013).
5. Weisher, T., Schettler, D. & Mohr, C. Titanium implants in the zygoma as retaining elements after hemimaxillectomy. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **12**, 211–214 (1997).
6. Migliorança, R. M. *et al.* History of zygomatic implants: A systematic review and meta-analysis. *Dent. Oral Craniofacial Res.* **5**, 1–9 (2019).
7. Brånemark, P. I. *et al.* Zygoma fixture in the management of advanced atrophy of the maxilla: Technique and long-term results. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* **38**, 70–85 (2004).
8. Stella, J. P. & Warner, M. R. Sinus slot technique for simplification and improved orientation of zygomaticus dental implants: a technical note. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **15**, 889–893 (2000).
9. Maló, P., de Araujo Nobre, M. & Lopes, I. A new approach to rehabilitate the severely atrophic maxilla using extramaxillary anchored implants in immediate function: A pilot study. *J. Prosthet. Dent.* **100**, 354–366 (2008).
10. D'Agostino, A. *et al.* Are Zygomatic Implants Associated With Maxillary Sinusitis? *J. Oral Maxillofac. Surg.* **74**, 1562–1573 (2016).
11. Higgins, J. P. T., Savović, J., Page, M. J. & Sterne, J. A. C. Revised Cochrane

- risk-of-bias tool for randomized trials (RoB 2). *Cochrane* 1–24 (2019).
12. Sterne, J. A., Higgins, J. P., Elbers, R. G. & Reeves, B. C. Risk Of Bias In Non-randomized Studies of Interventions (ROBINS-I): detailed guidance. *BMJ* 1–53 (2016).
  13. Brånemark, P. I. *et al.* Zygoma fixture in the management of advanced atrophy of the maxilla: Technique and long-term results. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* **38**, 70–85 (2004).
  14. Becktor, J. P., Isaksson, S., Abrahamsson, P. & Sennerby, L. Evaluation of 31 zygomatic implants and 74 regular dental implants used in 16 patients for prosthetic reconstruction of the atrophic maxilla with cross-arch fixed bridges. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **7**, 159–165 (2005).
  15. Zwahlen, R. A., Grätz, K. W., Oechslin, C. K. & Studer, S. P. Survival rate of zygomatic implants in atrophic or partially resected maxillae prior to functional loading: A retrospective clinical report. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **21**, 413–420 (2006).
  16. Davó, R. Zygomatic implants placed with a two-stage procedure: a 5-year retrospective study. *Eur. J. Oral Implantol.* **2**, 115–24 (2009).
  17. Duarte, L. R., Peredo, L. G., Nary Filho, H., Francischone, C. E. & Brånemark, P. I. Reabilitação da maxila atrófica utilizando quatro fixações zigomáticas em sistema de carga imediata. *ImplantNews* **1**, 45–50 (2004).
  18. Davó, R., Malevez, C., Rojas, J., Rodríguez, J. & Regolf, J. Clinical outcome of 42 patients treated with 81 immediately loaded zygomatic implants: a 12- to 42-month retrospective study. *European journal of oral implantology* **1**, 141–150 (2008).
  19. Maló, P., Nobre, M. de A., Lopes, A., Ferro, A. & Moss, S. Three-year outcome of a retrospective cohort study on the rehabilitation of completely edentulous atrophic maxillae with immediately loaded extra-maxillary zygomatic implants. *Eur. J. Oral Implantol.* **7**, 267–81 (2014).
  20. Urgell, J. P., Gutiérrez, V. R. & Escoda, C. G. Rehabilitation of Atrophic Maxilla with Zygomatic Implants: Review of 101 zygomatic implants. *Med. Oral Patol. Oral y Cir. Bucal* **13**, E363–E370 (2008).
  21. Aparicio, C. *et al.* The Long-Term Use of Zygomatic Implants: A 10-Year Clinical and Radiographic Report. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **16**, 447–459 (2014).
  22. Bothur, S., Kullendorff, B. & Olsson-Sandin, G. Asymptomatic Chronic Rhinosinusitis and Osteitis in Patients Treated with Multiple Zygomatic Implants: A Long-Term Radiographic Follow-up. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **30**, 161–168 (2015).
  23. Araújo, R., Sverzut, A., Trivellato, A. & Sverzut, C. Retrospective Analysis of 129 Consecutive Zygomatic Implants Used to Rehabilitate Severely Resorbed

- Maxillae in a Two-Stage Protocol. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **32**, 377–384 (2016).
24. Atalay, B., Doğanay, Ö., Saraçoğlu, B. K., Bultan, Ö. & Hafiz, G. Clinical evaluation of zygomatic implant-supported fixed and removable prosthesis. *J. Craniofac. Surg.* **28**, 185–189 (2017).
  25. Chana, H., Smith, G., Bansal, H. & Zahra, D. A Retrospective Cohort Study of the Survival Rate of 88 Zygomatic Implants Placed Over an 18-year Period. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **34**, 461–470 (2019).
  26. Aleksandrowicz, P. *et al.* Extra-sinus zygomatic implants to avoid chronic sinusitis and prosthetic arch malposition: 12 years of experience. *J. Oral Implantol.* **45**, 73–78 (2019).
  27. Davó, R., Malevez, C., López-Orellana, C., Pastor-Beviá, F. & Rojas, J. Sinus reactions to immediately loaded zygoma implants: a clinical and radiological study. *Eur. J. Oral Implantol.* **1**, 53–60 (2008).
  28. Chow, J., Wat, P., Hui, E., Lee, P. & Li, W. A new method to eliminate the risk of maxillary sinusitis with zygomatic implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **25**, 1233–40 (2010).
  29. Davo, R., Pons, O., Rojas, J. & Carpio, E. Immediate function of four zygomatic implants: a 1-year report of a prospective study. *Eur. J. Oral Implantol.* **3**, 323–34 (2010).
  30. Aparicio, C. *et al.* Immediate/early loading of zygomatic implants: Clinical experiences after 2 to 5 years of follow-up. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **12**, 77–82 (2010).
  31. Sartori, E. M. *et al.* Evaluation of satisfaction of patients rehabilitated with zygomatic fixtures. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **70**, 314–319 (2012).
  32. Migliorança, R. M., Sotto-Maior, B. S., Senna, P. M., Francischone, C. E. & Cury, A. A. D. B. Immediate occlusal loading of extrasinus zygomatic implants: A prospective cohort study with a follow-up period of 8 years. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **41**, 1072–1076 (2012).
  33. Hinze, M., Vrielinck, L., Thalmair, T., Wachtel, H. & Bolz, W. Zygomatic Implant Placement in Conjunction with Sinus Bone Grafting: The “Extended Sinus Elevation Technique.” A Case-Cohort Study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **28**, e376–e385 (2013).
  34. Aparicio, C. *et al.* Zygomatic Implants Placed Using the Zygomatic Anatomy-Guided Approach versus the Classical Technique: A Proposed System to Report Rhinosinusitis Diagnosis. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **16**, 627–642 (2014).
  35. Maló, P., de Araújo Nobre, M., Lopes, A., Ferro, A. & Moss, S. Extramaxillary surgical technique: Clinical outcome of 352 patients rehabilitated with 747 zygomatic implants with a follow-up between 6 months and 7 years. *Clin.*

*Implant Dent. Relat. Res.* **17**, e153–e162 (2015).

36. Esposito, M. *et al.* Immediately loaded zygomatic implants vs conventional dental implants in augmented atrophic maxillae: 4 months post-loading results from a multicentre randomised controlled trial. *Eur. J. Oral Implantol.* **11**, 11–28 (2018).
37. Stiévenart, M. & Malevez, C. Rehabilitation of totally atrophied maxilla by means of four zygomatic implants and fixed prosthesis: a 6-40-month follow-up. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **39**, 358–363 (2010).
38. Aparicio, C. *et al.* Extrasinus zygomatic implants: Three year experience from a new surgical approach for patients with pronounced buccal concavities in the edentulous maxilla. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **12**, 55–61 (2010).
39. Migliorança, R. M. *et al.* Restoration of the edentulous maxilla using extrasinus zygomatic implants combined with anterior conventional implants: a retrospective study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **26**, 665–72 (2011).
40. Araújo, P. P. T. *et al.* Evaluation of patients undergoing placement of zygomatic implants using sinus slot technique. *Int. J. Implant Dent.* **2**, (2016).