

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação de Mestrado

**OZONIOTERAPIA ADJUVANTE À TERAPIA PERIODONTAL NÃO-CIRÚRGICA
EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE ASSOCIADA AO DIABETES MELLITUS
TIPO 2**

Elisa Grillo Araújo

Brasília, 28 de setembro de 2022

Elisa Grillo Araújo

**OZONIOTERAPIA ADJUVANTE À TERAPIA PERIODONTAL NÃO-CIRÚRGICA
EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE ASSOCIADA AO DIABETES MELLITUS
TIPO 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Bruzadelli Macedo

Coorientadora: Prof. Daniela Corrêa Grisi

Brasília, 2022

Elisa Grillo Araújo

**OZONIOTERAPIA ADJUVANTE À TERAPIA PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICA
EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE ASSOCIADA AO DIABETES MELLITUS
TIPO 2**

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 28 de setembro de 2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Bruzadelli Macedo (Orientador)

Prof. Dra. Gisele Lago Martinez

Prof. Dra. Flaviana Soares Rocha

Prof. Dra. Valéria Martins de Araújo Carneiro

Ao meu amado e saudoso pai, Paulo Hernani Araújo.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por todo o amor e incentivo e por ser meu exemplo de determinação e disciplina.

Às minhas filhas, preciosidades da minha vida, Manuela e Alice, por fazerem tudo valer a pena.

Ao meu marido, Claudinei, pelo apoio, carinho e cumplicidade. Amo você!

Aos meus irmãos, Isabel, Laís e Flávio, pela presença sempre tão carinhosa que fazem minha vida ser mais leve e divertida.

Aos pacientes da pesquisa, pela confiança, colaboração e carinho.

Ao Prof. Sérgio Bruzadelli, meu orientador, pela oportunidade de conhecer o fantástico mundo da ozonioterapia.

À minha querida coorientadora, Daniela Grisi, por estar sempre disponível para conversar, ensinar e por nossas reuniões científicas sempre tão proveitosas e agradáveis.

À equipe do projeto Diabetes, que tenho muito orgulho de integrar, em especial à Prof. Maria do Carmo, que me acolheu tão generosamente.

Aos colegas do projeto Ozonioterapia, que fizeram das quartas um dia especial de muito trabalho, aprendizado e happy-hour no Sebinho. Momentos que lembrarei com muito carinho.

À Professora Loise Pedrosa Salles e à equipe do laboratório, Priscilla e Rafael, pelo apoio na análise microbiológica das amostras que, com muita paciência, me ensinaram tanto sobre biologia molecular e sobre a “arte de pipetar”.

Aos meus amigos e colegas que estiveram presentes nessa caminhada, Liliane Raquel, minha parceira de amor à periodontia desde os tempos da especialização; à

Milla Bernat, colega de mestrado e de consultório, também companheira de desabafo nos momentos de desespero; à Ana Luiza Magalhães, amizade que ganhei de presente nessa jornada e que esteve sempre disponível; e um agradecimento todo especial à minha amiga-irmã Mariana Figueiredo Vianna, que me incentivou e me trilhou pelos caminhos da docência, sempre tão generosa e sabida.

Às empresas que gentilmente apoiaram essa pesquisa, Philozon, que disponibilizou o gerador de ozônio, Laboratório Sabin e Fenelon Diagnósticos Odontológicos por Imagem, especialmente ao Dr. Maurício Barriviera, que tornou possível essa parceria. Minha enorme gratidão.

À Universidade de Brasília, à Faculdade de Ciências da Saúde e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, por viabilizar a realização desse projeto.

“Se cheguei aqui foi porque me apoiei nos ombros dos gigantes”

Isaac Newton

RESUMO

Diabetes mellitus e periodontite são duas doenças imunoinflamatórias que mantêm uma relação bidirecional - o estado crônico de uma pode ativar e manter a progressão da outra. A Periodontite é caracterizada por uma disbiose da microbiota bucal e mediada por eventos do sistema imune, enquanto o diabetes mellitus é um grupo de desordens sistêmicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante de defeito na secreção e/ou ação da insulina. A abordagem não-cirúrgica de raspagem e alisamento radicular é o tratamento “padrão ouro” da periodontite, mas muitas vezes essa terapia não produz os resultados clínicos desejados, sobretudo em indivíduos com diabetes, que apresentam alto risco de recorrência de periodontite. A ozonioterapia aliada ao tratamento periodontal tem sido estudada principalmente por seu efeito antimicrobiano, mas o ozônio também apresenta capacidade de biomodulação, como efeito antioxidante, anti-inflamatório e antihipóxia, que representam benefício adicional aos indivíduos com diabetes. Apesar disso, apenas dois estudos avaliaram o efeito da ozonioterapia adjuvante à terapia periodontal nesse grupo de pacientes. Foi realizada uma revisão da literatura e, diante de poucas evidências diretas, foram também revisados os efeitos biomodulatórios do ozônio sobre mecanismos moleculares e vias de sinalização avaliados *in vitro*, modelo animal ou em outras doenças, mas que também estão presentes na periodontite e no diabetes. Baseado nessa revisão de literatura, foi proposto um protocolo nunca testado antes, que une as 3 formas de aplicação do ozônio (água, gás e óleo) à terapia periodontal em pacientes com diabetes tipo 2. O tratamento combinado foi realizado em sete pacientes, sendo avaliados dados clínicos periodontais (índice de sangramento a sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica), bioquímicos (hemoglobina glicada e proteína C-reativa), além de análise microbiológica de algumas amostras (PCR em tempo real). Após 30 e 90 dias do tratamento, os pacientes foram reavaliados e apresentaram resultados periodontais satisfatórios, além de efeitos sistêmicos, mostrando melhora no controle glicêmico e no status inflamatório, sugerindo que a ozonioterapia pode ser uma poderosa ferramenta na terapia periodontal de pacientes com diabetes tipo 2 e merece ser melhor investigada e comparada com a terapia periodontal não-cirúrgica como monoterapia.

Palavras-chave: diabetes mellitus; diabetes mellitus tipo 2; periodontite; ozonioterapia; ozônio; tratamento periodontal não-cirúrgico.

ABSTRACT

Diabetes mellitus and periodontitis are two immunoinflammatory diseases that maintain a bidirectional relationship - the chronic state of one of them can activate and maintain the progression of the other. Periodontitis is characterized by dysbiosis of the oral microbiota and mediated by immune system events, while diabetes mellitus is a group of systemic disorders characterized by hyperglycemia resulting from defect in insulin secretion and/or action. The non-surgical approach of scaling and root planing is the “gold standard” treatment of periodontitis, but this therapy often does not produce the desired clinical results, especially in individuals with diabetes, who are high risk of periodontitis recurrence. Ozone therapy combined with periodontal treatment has been studied mainly for its antimicrobial effect. But ozone also has biomodulation capacity, such as antioxidant, anti-inflammatory and antihypoxic effects, which represent an additional benefit for individuals with diabetes. Despite this, only two studies have evaluated the effect of adjuvant ozone therapy to periodontal therapy in this group of patients. A review of the literature was carried out and, given the lack of direct evidence, the biomodulatory effects of ozone on molecular mechanisms and signaling pathways evaluated in vitro, animal model or in other diseases, but which are also present in periodontitis and diabetes, were also reviewed. Based on this literature review, a never-before-tested protocol was proposed, which combines the 3 forms of ozone application (water, gas and oil) adjuvant to periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. The combined treatment was performed in seven patients. Periodontal clinical data (bleeding index on probing, probing depth and clinical attachment level), biochemical data (glycated hemoglobin and C-reactive protein) were evaluated, as well as microbiological analysis of some samples (real-time PCR). After 30 and 90 days after treatment, patients were reassessed and showed satisfactory periodontal results, in addition to systemic effects, showing improvement in glycemic control and inflammatory status, suggesting that ozone therapy can be a powerful tool in periodontal therapy of patients with diabetes. type 2 and deserves to be further investigated and compared with non-surgical periodontal therapy as monotherapy.

Keywords: diabetes mellitus; type 2 diabetes mellitus; periodontitis; ozone therapy; ozone; non-surgical periodontal treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Tabela 1 – Sumário de ensaios clínicos que testaram o ozônio no tratamento de doenças gengivais _____ 35

Tabela 2 – Sumário dos estudos ‘in-vitro’ que testaram o ozônio em periodontopatógenos e a citotoxicidade em células gengivais _____ 38

Tabela 3 – Sumário de estudos que testaram o ozônio na periodontite experimental em modelo animal _____ 39

Capítulo 2

Figura 1 - Representação esquemática do potencial efeito do ozônio sobre mecanismos envolvidos na periodontite associada ao DM _____ 63

Capítulo 3

Figura 1 – Gerador de ozônio e coluna de ozonização de água _____ 80

Figura 2 – Aplicação de água ozonizada _____ 80

Figura 3 – Aplicação de ozônio gasoso _____ 80

Figura 4 – Aplicação de óleo ozonizado _____ 80

Figura 5 – Termociclador DNA-TECNOLOGY _____ 80

Tabela 1 Média dos parâmetros periodontais, bioquímicos e resultado após 30, 90 dias _____ 82

Tabela 2 Resultado microbiológico paciente 1 _____ 83

Tabela 3 Resultado microbiológico paciente 2 _____ 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3-DPG	2,3-disfosfoglicerato
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Actinomyces actinomycetemcomitans</i>
AA	Ácido araquidônico
CAT	Catalase
CHX	Clorexidina
COX	Ciclooxigenases
CRP	Proteína C reativa
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
ECR	Ensaio clínico randomizado
ERO	Espécie reativa de oxigênio
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HGF-1	Fibroblastos gengivais
HIF-1 α	Fator de transcrição induzível por hipóxia
HO-1	Heme-oxigenase-1
hPDLCs	Células do ligamento periodontal humano
HSP	Proteína de choque térmico
HSP-70	Proteína de choque térmico-70
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	IL-6

IL-7	Interleucina-7
IPV	Índice de placa visível
LOX	Lipoxigenases
MMP	Metaloproteinases de matriz
MMP-13	Metaloproteinases de matriz-13
MMP-8	Metaloproteinases de matriz-8
MMP-9	Metaloproteinases de matriz-9
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NBW3	Água nano-bolha de ozônio
NFκB	Fator nuclear kappa beta
NIC	Nível de inserção clínica
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2
OPG	Osteoprotegerina
OUFBW	Bolha ultrafina de ozônio aquoso estável
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PAMPS	Padrões moleculares associados ao patógenos
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
POL	Produto de oxidação lipídica
PS	Profundidade à sondagem
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa beta
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
SOD	Superóxido dismutase
SS	Sangramento à sondagem
TGFβ	Fator transformador de crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPNC	Tratamento periodontal não-cirúrgico

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução, Revisão da Literatura e Objetivos

1.1 Introdução	16
1.2 Revisão de literatura	20
1.2.1 Histórico da ozonioterapia	20
1.2.2 Propriedades biológicas	23
1.2.2.1 Ação antimicrobiana	24
1.2.2.2 Ação imunoestimuladora	24
1.2.2.3 Ação anti-inflamatória e analgésica	25
1.2.3 Vias de aplicação	27
1.2.3.1 Ozônio gasoso	27
1.2.3.2 Água ozonizada	28
1.2.3.3. Óleo ozonizado	30
1.2.4 Toxicidade e contra-indicações	31
1.2.5 Ozonioterapia adjuvante ao tratamento periodontal	32
1.3 Objetivos	39
1.4 Referências	40

CAPÍTULO 2 – Potencial citoprotetor da ozonioterapia adjuvante ao tratamento periodontal-não cirúrgico de pacientes com diabetes mellitus

Resumo_____	51
2.1 Introdução_____	51
2.2 Potencial efeito antioxidante e anti-inflamatório_____	53
2.2.1 Nrf2_____	55
2.2.2 NFkB_____	56
2.2.3 Hsp70_____	57
2.3 Potencial Anti-hipóxico e de homeostase óssea e tecidual_____	59
2.3.1 RANKL/OPG_____	61
2.3.2 MMP8_____	62
2.4 Conclusões_____	64
2.5 Referências_____	64

CAPÍTULO 3 – Ozonioterapia adjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes com diabetes mellitus tipo 2: relato de casos

Resumo_____	75
3.1 Introdução_____	76
3.2 Informações dos pacientes_____	76
3.3 Intervenção terapêutica_____	78
3.4 Acompanhamento e resultados_____	81

3.4.1 Resultados clínicos e bioquímicos	81
3.4.2 Resultado do piloto microbiológico	83
3.5 Discussão	84
3.6 Conclusões	85
3.7 Referências	86

Capítulo 4 – Discussão Geral e Conclusões

4.1 Discussão geral	90
4.2 Perspectivas futuras	91
4.3 Conclusões	92

Capítulo 5 - Press Release _____ 93

ANEXOS

ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	94
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	95
ANEXO C - RESULTADO COMPLETO DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA POR PCR	97

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) e periodontite são doenças crônicas multifatoriais com alta prevalência em todo o mundo. As duas condições são processos patológicos interrelacionados que compartilham vias patogênicas e de sinalização molecular semelhantes. A periodontite é uma doença inflamatória multifatorial associada a biofilmes disbióticos e é caracterizada pela destruição progressiva do aparelho de suporte dentário [1], enquanto o DM é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção ou ação da insulina, ou ambos [2].

A maioria dos casos diagnosticados de DM pode ser diferenciada em duas categorias etiopatogênicas principais: diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2). O DM1 é causado por uma deficiência absoluta da secreção de insulina, principalmente resultante da destruição autoimune das células β pancreáticas. Aproximadamente 5-10% dos pacientes com DM estão nesta categoria. O DM2, mais prevalente (90–95%), é frequentemente causado por uma combinação de resistência à ação da insulina e uma inadequada resposta compensatória, levando à deficiência relativa da secreção de insulina. O risco de desenvolver DM2 aumenta com a idade, peso e falta de atividade física [2,3]. A hiperglicemia crônica em pacientes com DM está associada a uma variedade de doenças secundárias decorrentes de complicações macrovasculares e microvasculares [4].

Embora etiologicamente diferentes, DM e periodontite provocam uma resposta imune do hospedeiro por meio da ativação de citocinas inflamatórias [5], além de estarem relacionadas ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs). O aumento da resposta inflamatória está correlacionado com a piora da progressão da doença, tanto no DM quanto na periodontite. Dessa forma, as duas doenças mantêm uma associação patogênica bidirecional que tem sido amplamente documentada [1,6–11]. Enquanto o DM está associado ao aumento da ocorrência e progressão da

periodontite, esta última está associada ao pior controle glicêmico e é considerada a “sexta complicação do DM” [12].

A American Diabetes Association reconhece esta relação e recomenda a triagem do DM nos consultórios odontológicos com a finalidade de antecipar o diagnóstico, estimando que 30% dos pacientes acima de 30 anos apresentam alteração glicêmica [2]. Recentemente a Sociedade Brasileira de Periodontologia (SOBRAPE) e a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) elaboraram diretrizes conjuntas destinadas aos pacientes, médicos, cirurgiões-dentistas e equipes atuantes no Sistema Único de Saúde. No intuito de incentivar a parceria entre endocrinologistas, periodontistas e outros profissionais da Saúde envolvidos no cuidado aos pacientes com o DM, as diretrizes oferecem subsídios para implementação de rotinas que proporcionam uma abordagem mais completa aos pacientes com DM e periodontite, com consequente melhora da qualidade de vida e com possível redução de custos para toda atividade médica e odontológica [13].

O início e a progressão da periodontite ocorrem como consequência da resposta imune inflamatória do hospedeiro, que é desencadeada por lipopolissacarídeos bacterianos [14]. A resposta inflamatória é caracterizada pela secreção desregulada de mediadores inflamatórios, principalmente interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), prostaglandina E2 (PGE2), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) e as metaloproteinases de matriz (MMPs), particularmente MMP-8 (metaloproteinases de matriz-8), MMP-9 (metaloproteinases de matriz -9) e MMP-13 (metaloproteinases de matriz-13), bem como citocinas reguladoras de células T (IL-12 e IL-18) e as quimiocinas.

A complexidade das redes de citocinas na patogênese periodontal, que está se tornando cada vez mais evidente, é influenciada por fatores que modificam a reação inflamatória local. O DM é um desses fatores responsáveis pelo estado pró-inflamatório no tecido. A soma total da resposta inflamatória nos tecidos periodontais determina o padrão e a taxa de progressão da doença [9].

O estresse oxidativo tem sido sugerido como um dos mecanismos subjacentes que contribui para a periodontite em pacientes com DM, sendo um importante fator patogênico [15–19]. Caracterizado por um desequilíbrio entre espécies oxidativas e redutoras, o estresse oxidativo também é definido como uma perturbação da sinalização redox que resulta em alteração da função de biomoléculas-chave [20].

As EROs são produzidas a partir de células imunes e apresentam efeito antibacteriano, desempenhando um importante papel na defesa do hospedeiro e na regulação imune. Contudo, o excesso de EROs pode ter efeitos citotóxicos, causar danos oxidativos às proteínas e ao DNA; interferir no crescimento celular e na progressão do ciclo celular; e induzir apoptose dos fibroblastos gengivais. Esses efeitos fazem com que as EROs induzam danos diretos aos tecidos periodontais ou atuem como moléculas sinalizadoras intracelulares durante a osteoclastogênese, exercendo também um papel indireto na destruição óssea periodontal [21].

O tratamento da periodontite tem como objetivo eliminar ou reduzir o número de bactérias periodontopatógenas, o sangramento à sondagem (SS), a profundidade à sondagem (PS); bem como aumentar o nível de inserção clínica (NIC). Correa e colaboradores [22] ressaltam que, além dos benefícios clínicos e microbiológicos, a terapia periodontal também tende a reduzir inflamação sistêmica e concentração de algumas citocinas circulantes. Esse controle da inflamação sistêmica é de extrema importância para o manejo do DM pois representa diminuição das complicações de longo prazo [23]. Segundo a meta-análise conduzida por Baeza e colaboradores [10], o tratamento periodontal tem impacto no controle metabólico de pacientes com DM2, apresentando uma redução média de 0,56% no valor da hemoglobina glicada (HbA1c).

O tratamento periodontal não-cirúrgico (TPNC), que envolve a remoção de placa e cálculo (supra e subgengival), é a terapia “padrão ouro” da periodontite. No entanto, esse tratamento sozinho muitas vezes não produz os resultados clínicos desejados, pois pode não eliminar completamente bolsas residuais e bactérias periodontopatógenas, principalmente em regiões de furca, concavidades radiculares, áreas interproximais e bolsas profundas inacessíveis aos instrumentos periodontais. Dificuldades que aumentam o risco de progressão de doença e aumento de perda de

inserção [24–26]. Outra limitação das abordagens terapêuticas convencionais diz respeito à resposta (hiper)inflamatória crônica contra o microbioma bucal associado a fatores genéticos, sistêmicos ou ambientais [27], como o DM.

Devido à causa microbiana subjacente da periodontite, a terapia antibiótica em conjunto com o TPNC tem sido proposta, mas devido aos efeitos adversos, principalmente em relação ao impacto no microbioma humano e risco de surgimento de espécies bacterianas resistentes, seu uso irrestrito é criticamente questionado [28–30]. Outras estratégias adjuvantes ao TPNC foram desenvolvidas para otimizar a resposta do hospedeiro à infecção periodontal e são conhecidas como “terapia de modulação do hospedeiro” [26,31], com foco na resolução da inflamação e restauração da homeostase tecidual, especialmente em pacientes suscetíveis com alto risco de desenvolver alterações periodontais [32].

Nesse contexto, o ozônio se apresenta como uma potencial ferramenta na terapia periodontal devido aos seus múltiplos efeitos, principalmente antimicrobiano e imunomodulador. O ozônio é um gás altamente oxidativo com efeitos danosos para diversas espécies de microrganismos [33]. Além disso, é responsável pela geração de radicais livres que causam estresse oxidativo agudo, mas controlado, nas células humanas. Desse modo, o ozônio é capaz de modular a defesa antioxidante, o metabolismo do oxigênio e a energia celular, levando a respostas biológicas positivas [34].

As propriedades do ozônio nos fazem acreditar que seu uso em pacientes imunocomprometidos, como portadores de DM, possa contribuir para melhores resultados da TPNC, além da diminuição da inflamação sistêmica, do estresse oxidativo e, conseqüentemente, melhora do controle do DM. Apesar dos potenciais benefícios, apenas dois estudos [35,36] avaliaram o efeito do ozônio adjuvante à TPNC nesse grupo de pacientes.

Marconcini e colaboradores [35] utilizaram protocolos de administração domiciliar de água ozonizada que resultou em um aumento da capacidade antioxidante da saliva, mas sem diferença na HbA1c; enquanto Delvecchio e colaboradores [36] realizaram irrigação com água ozonizada combinada à aplicação

de ozônio gasoso, mostrando uma tendência de melhor controle glicêmico, mas também sem diferença estatística.

Diante da carência de evidências na literatura que respalde a prática clínica, a proposta deste estudo foi revisar a ozonioterapia como adjuvante ao TPNC, discutir o potencial citoprotetivo dessa terapia combinada quando utilizada em pacientes com DM e propor um protocolo ainda não testado que combina as três formas de aplicação do ozônio (água, gás e óleo) em pacientes com DM2. O tratamento proposto será apresentado em uma série de relato de casos em que será discutido o efeito do ozônio sobre parâmetros periodontais e também sistêmicos, com o objetivo de sugerir um protocolo para ser testado em outros estudos.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Histórico da ozonioterapia

O ozônio é um gás continuamente produzido na estratosfera, localizada a 25-30 km da superfície da Terra. A partir de uma molécula de oxigênio atmosférico, a radiação UV ou a descarga elétrica de um raio, a divide em dois átomos altamente reativos que, por uma reação endotérmica, se combina ao oxigênio intacto para formar o ozônio triatômico [37]. O ozônio, um gás azul-pálido que se condensa em um líquido azul profundo em temperaturas muito baixas, forma uma camada ao redor da Terra que tem a capacidade de absorver os raios ultravioleta nocivos presentes no espectro de luz do sol [38]. Na natureza, o ozônio está presente na forma gasosa com concentração de 1-10 ppm e seu peso molecular é 47,98 g/mol [39].

O terceiro átomo de oxigênio do ozônio orbita em torno do oxigênio molecular de estrutura diatômica, sendo assim, o vínculo que liga o terceiro átomo da estrutura da molécula é muito fraco. Por isso o ozônio é altamente reativo e de fácil decomposição e recombinação de seus constituintes em oxigênio molecular mais estável [40].

O ozônio é o terceiro oxidante mais poderoso conhecido, tem energia mais alta em comparação com o oxigênio atmosférico, é 1,6 vezes mais denso e 10 vezes mais solúvel em água [39].

Em 1785, o físico holandês Van Marum foi o primeiro a identificar o odor característico do ozônio, observado quando faíscas elétricas passavam perto de sua máquina eletrostática [41]. Em 1801, Cruickshank observou o mesmo odor no ânodo durante a eletrólise da água [42], mas a descoberta do ozônio apenas aconteceu em 1840 na Universidade de Basil, Suíça, quando Christian Friedrich Schonbein (1799-1868) demonstrou as mudanças das propriedades do oxigênio com a formação do gás ozônio [41].

O ozônio deriva seu nome da palavra grega “ozein”, que significa “cheirar”, devido a esse odor característico [43], que é geralmente percebido pelo nariz humano em 0,02 ou 0,05 ppm [43,44].

Uma das aplicações mais conhecidas do ozônio é no tratamento de água. A eficácia do ozônio foi validada por mais de 3.000 estações de tratamento de água municipais em todo o mundo [45]. Em 1982, a Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA) publicou regulamento afirmando que o ozônio é geralmente reconhecido como seguro (status GRAS - Generally recognized as safe) para uso como desinfetante de água engarrafada. As condições incluíam uma dosagem máxima de ozônio de 0,4 mg/L em 4 minutos de tempo de contato, e que a água a ser tratada deve atender aos requisitos de água potável da Agência de Proteção Ambiental dos EUA [46].

O ozônio como desinfetante da água potável é mais forte que o cloro, sendo capaz de inativar 63 tipos bactérias diferentes, diversas variedades de leveduras e até 13 fungos patogênicos. Mais recentemente, devido à contaminação das águas subterrâneas por matéria fecal, a questão da desinfecção tornou-se ainda mais complexa, pois protozoários encistados, como *Giardia lamblia*, ou cistos de *Cryptosporidium parvum* e ovos de helmintos (*Ascaris suum* e *Ascaris lumbricoides*), requerem contato mais prolongado com ozônio do que bactérias e vírus [45].

Na medicina, a ozonioterapia ficou conhecida a partir do seu uso durante a 1ª guerra mundial, no tratamento de feridas pós-traumáticas em soldados alemães. A ideia do uso medicinal do ozônio desenvolveu-se lentamente durante o século

passado e foi estimulada pela falta de antibióticos e pelas propriedades desinfetantes do ozônio [33].

Na odontologia, o Dr. E.A. Fisch (1899–1966) foi o primeiro dentista a usar água ozonizada em sua prática. Ele a apresentou ao cirurgião alemão Dr. E. Payr (1871-1946) quando este foi submetido a tratamento endodôntico com ozônio [33]. Ele ficou tão surpreso com o resultado obtido que o relatou no 59º Congresso da Sociedade Cirúrgica Alemã, em 1935, e entusiasticamente estendeu sua aplicação clínica à cirurgia geral [38].

Em 1959, o físico Joachim Hansler (1908-1981) inventou o primeiro gerador capaz de precisar a concentração de ozônio, representando um avanço para sua aplicação na medicina e a base para a expansão da ozonioterapia nos últimos 40 anos [41,47].

Do ponto de vista clínico, o ozônio apresenta múltiplas aplicações médico-cirúrgicas que estão relacionadas à sua capacidade germicida, ação nos processos isquêmicos, inflamatórios e no desequilíbrio do estado redox celular [48]. No entanto, não há consenso na comunidade médica sobre seu uso e benefícios. O motivo pode ser devido ao ozônio, diferentemente dos medicamentos, não atuar diretamente por meio de interações tradicionais de droga-receptor [49]. Outra questão foi o uso empírico da ozonioterapia por décadas, sem a devida compreensão dos mecanismos de ação e toxicidade, gerando resultados duvidosos, o que provocou muito ceticismo, preconceito, e forte oposição da medicina convencional [37,45]. Felizmente essa situação está mudando à medida que mais países estão usando o ozônio em centros médicos públicos e universidades. Além disso, diferentes grupos de pesquisa, principalmente italianos, alemães, russos e cubanos, estão desenvolvendo trabalhos científicos e reunindo suas experiências em manuais para divulgação [48].

A ozonioterapia deve ser compreendida como uma terapia complementar e não alternativa, que deve ser realizada junto e não no lugar dos medicamentos alopáticos. Compreender a diferença entre complementar e alternativo é fundamental para as boas práticas no uso do ozônio [50].

1.2.2 Propriedades biológicas do ozônio

1.2.2.1 Ação antimicrobiana

O ozônio é conhecido por ser um oxidante potente com capacidade de oxidar qualquer entidade biológica conhecida [43]. Seus efeitos bactericidas foram documentados em uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos, vírus, protozoários, bem como esporos e células vegetativas [51,52]. O ozônio também se mostrou capaz de matar bactérias extremamente resistentes aos antibióticos, como *Pseudomona aeruginosa* e a *Escherichia coli*. [41].

O efeito antimicrobiano do ozônio é resultado de sua ação sobre as células, danificando sua membrana citoplasmática devido à ozonólise de ligações duplas, ou devido aos efeitos oxidantes secundários, pela modificação do conteúdo intracelular [41,53,54]. Ao entrar na célula, o ozônio promove a oxidação de ácidos nucleicos e aminoácidos [55].

A ruptura ou lise é um mecanismo de inativação mais rápido do que o de outros desinfetantes e que não leva à resistência de microrganismos [56].

A ação antimicrobiana do ozônio aumenta em meio líquido, especialmente em pH ácido [41] e é inespecífica e seletiva às células microbianas, não danificando as células do corpo humano devido à grande capacidade antioxidante dos mamíferos [41,53,55].

No que diz respeito ao espectro de ação, cada microrganismo possui uma sensibilidade diferente ao ozônio. As bactérias são mais sensíveis que as leveduras e os fungos. As bactérias Gram-positivas são mais sensíveis ao ozônio do que as Gram-negativas e os esporos, por sua vez, são mais resistentes que as células vegetativas [51].

1.2.2.2 Ação imunoestimuladora

A instabilidade do ozônio traz diversas vantagens para fins terapêuticos, como por exemplo o potencial oxidativo, que é o terceiro maior na escala química [57]. Esse potencial causa diferentes efeitos no sistema imunológico; sistema simpático e parassimpático [45]. É bem conhecido que a presença de compostos derivados de reações de oxidação no corpo humano produz uma cascata de reações bioquímicas. No entanto, o mecanismo dessas reações não é totalmente conhecido [58].

A oxidação induzida pelo ozônio potencializa a resposta antioxidante do organismo vivo. Este é um fator crítico emitido pelo sistema imunológico para superar infecções, isquemia e regeneração celular [59]. O efeito paradoxal do ozônio como promotor de resposta antioxidante capaz de regular o estresse oxidativo é comum no reino animal [58]. Esse fenômeno pode ser descrito como uma indução de tolerância ao ozônio e às EROs geradas e é denominado como “pré-condicionamento oxidativo” ou “adaptação ao estresse oxidativo” [60].

O estresse oxidativo induzido por meio de uma dose calibrada e transitória de ozônio, reage com biomoléculas e produz uma série de compostos. Apesar de sua toxicidade intrínseca, esses compostos estimulam importantes vias bioquímicas [37], como por exemplo, o fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) e o fator nuclear kappa beta (NFkB) [50].

O ozônio reage com fluidos intersticiais produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), aldeídos e produtos de oxidação lipídica (POLs). Essas substâncias induzem a ativação da via Nrf2, que por sua vez provocam um aumento nos sistemas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona s-transferase (GSTr), heme-oxigenase-1 (HO-1), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), NADPH quinona oxidorredutase 1 (NQO1) e proteína de choque térmico-70 (HSP70) [48].

É necessário saber distinguir a dose terapêutica da tóxica para o uso médico do ozônio, concentrações que variam de 5 a 60 µg/ml são aceitas como seguras [45,58].

O efeito terapêutico do ozônio depende de um equilíbrio crítico entre uma pequena dose apropriada de ozônio e variáveis quase infinitas, como a multiplicidade de antioxidantes, o tempo de vida de EROs e POLs e respectivas farmacocinéticas in vivo. Além disso, o fator mais importante é a variabilidade da resposta biológica dependendo da reatividade enzimática e do estágio da doença [37].

O ozônio influencia a imunidade celular e humoral, estimula a proliferação de células imunocompetentes e a síntese de imunoglobulinas. Ele também ativa a função dos macrófagos e aumenta a sensibilidade dos microrganismos à fagocitose [41,55]. Em resposta ao ozônio, as células imunes desencadeiam uma cascata de eventos, por meio das citocinas, que regulam a imunidade. Portanto, o ozônio é promissor para a ativação imunológica em pacientes imunocomprometidos [53], atuando como um modificador da resposta biológica [37,41].

O ozônio ativa mecanismos de síntese de proteínas, aumenta o número de ribossomos e mitocôndrias nas células. Essas alterações no nível celular explicam a elevação da atividade funcional e do potencial de regeneração de tecidos e órgãos [55].

1.2.2.3 Ação anti-inflamatória e analgésica

O ozônio está relacionado à síntese de substâncias biologicamente ativas que melhoram o metabolismo dos tecidos inflamados, aumentando sua oxigenação e reduzindo os processos inflamatórios locais [41,55], além de atuar na síntese do ácido araquidônico [61].

A ativação do Nrf2, além do seu efeito modulador do sistema antioxidante, também induz a diminuição da atividade do NFkB, provocando inativação de enzimas proteolíticas e efeito anti-inflamatório, com a diminuição de IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e TNF α e aumento de IL-4, IL-10, IL-13 e fator transformador de crescimento beta (TGF β). Ao mesmo tempo, há proliferação de fibroblastos e condrócitos que favorecem a regeneração cartilaginosa [48].

Um estudo investigou a eficácia da terapia com ozônio no dano articular em ratos com artrite induzida. O tratamento com ozônio melhorou os danos nas

articulações, reduziu a inflamação, diminuiu as concentrações de TNF- α , bem como os níveis de mRNA de TNF- α e IL-1 β . Além disso, o equilíbrio redox celular, os níveis de óxido nítrico e frutolisina foram restabelecidos após o pós-condicionamento oxidativo com ozônio [62].

O ozônio também pode ser uma prática eficaz para prevenir o desenvolvimento da dor neuropática por meio de mecanismos complexos ainda inexplorados. Um dos mecanismos é a modulação de caspases pró-inflamatórias ou pró-apoptóticas específicas no cérebro, que são enzimas envolvidas no processo de apoptose, necrose, regulação celular, e inflamação. Essa foi a conclusão de um estudo que, após induzir dano ciático em camundongos, confirmou que a lesão causou a ativação corticofrontal dos genes das caspases 1, 8 e 12, responsáveis pela alodinia (dor provocada por estímulo que normalmente não geraria dor) e verificou que a expressão desses genes foi normalizada com uma única injeção periférica de ozônio ao redor da área danificada, o que também reduziu a alodinia mecânica [63].

Propriedades químicas da infecção e inflamação têm a capacidade de atrair o ozônio aplicado para a região afetada. A infecção ou inflamação é carregada positivamente (ácida), por isso atrai o ozônio, que é carregado negativamente (básico) [41].

1.2.2.4 Ação anti-hipóxica

O ozônio reage com componentes do sangue (eritrócitos, leucócitos, plaquetas, células endoteliais e sistema vascular), aumentando da pressão de oxigênio nos tecidos e melhorando o transporte de oxigênio no sangue. Essa capacidade afeta positivamente a microcirculação e a revitalização dos tecidos [53,64].

A melhora da circulação sanguínea, entrega de oxigênio ao tecido isquêmico, angiogênese e vasodilatação observados na ozonioterapia [37,65], estão relacionados à liberação de fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), ao efeito combinado de óxido nítrico e monóxido de carbono e ao aumento do nível de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) intraeritrocitário [53,55].

1.2.3 Vias de aplicação de ozônio

1.2.3.1 Ozônio gasoso

O ozônio para fins médicos é produzido por um gerador e envolve o envio de uma descarga elétrica através de um condensador especialmente construído contendo oxigênio [38], que passa através de um gradiente de alta voltagem de 5 a 13mV. O produto final é uma mistura gasosa que contendo oxigênio e ozônio [33,42,43]. O gerador deve ser capaz de calcular com precisão as concentrações de ozônio (1 µg/mL- 80 µg/mL) para garantir seu uso seguro, pois o ozônio em quantidades aumentadas é tóxico [66]. Nenhuma outra substância além de oxigênio e ozônio pode estar presente na mistura de gases produzida [50].

O ar não deve ser usado para produzir ozônio medicinal devido à geração de compostos tóxicos de nitrogênio [45]. O oxigênio para fins industriais também não se qualifica para gerar ozônio de uso médico, pois os requisitos de higiene, velocidade de enchimento, umidade interna da garrafa e esterilidade desses cilindros são diferentes dos médicos [50].

O ozônio gerado no equipamento deve ser coletado com uma seringa calibrada. A seringa de vidro é ideal por não reagir com o ozônio, mas é impraticável, por isso foi substituída por descartáveis (de polipropileno ou silicone) [33]. Por ser um gás muito instável, com meia-vida de 40 minutos a 20°C, o ozônio não pode ser armazenado, devendo ser usado imediatamente [42,66].

As formas de aplicação medicinal do ozônio são basicamente três: tópica, infiltrativa e sistêmica. As aplicações tópicas aproveitam o poder germicida do ozônio e seu efeito positivo nos processos de cicatrização e, geralmente, é aplicado diretamente, com o uso de sacos zip-lock. Outra possibilidade é a infiltração de ozônio (concentração entre 4 e 30µg/ml), que é útil no tratamento de doenças musculoesqueléticas, como artrite, tendinite, miosite, fascite, neurite ou dor miofascial. Por último, a terapia sistêmica consiste na administração do ozônio por via intravenosa indireta (também conhecida como auto-hemoterapia) ou insuflação retal. A administração intravenosa indireta consiste na extração de determinada quantidade de sangue que, em circuito fechado, é colocada em contato com o gás ozônio, que se

dissolverá e reagirá em poucos segundos, sendo imediatamente reinfundido. A insuflação retal consiste na administração de um enema gasoso com uma sonda no reto, onde reage com o muco retal e gera peróxidos que são absorvidos pela mucosa, atingindo o plexo hemorroidário e o sistema geral de circulação sanguínea venosa [48].

De acordo com a “Declaração de Madrid sobre Terapia de Ozônio” [50], cada paciente responde de forma diferente ao estresse oxidativo controlado induzido por tratamentos com ozônio. Assim, a administração do ozônio deve ser desenvolvida de forma progressiva, ou seja, começando com pequenas doses e aumentando-as progressivamente.

1.2.3.2 Água ozonizada

A concentração de ozônio na água pura corresponde a cerca de 25% da concentração do gás utilizado para confecção da água ozonizada devido à solubilização do ozônio à temperatura ambiente [45]. A solubilidade do ozônio na água é 13 vezes maior do que a do oxigênio a 0-30°C. O ozônio é progressivamente mais solúvel em água mais fria e sua decomposição é mais rápida em temperaturas mais altas da água. O produto da decomposição do ozônio é oxigênio; assim, os produtos alimentícios tratados com ozônio estão livres de resíduos [51].

A pureza da água geralmente afeta a estabilidade do ozônio. Embora o ozônio em água pura se degrade rapidamente em oxigênio, ele se degrada ainda mais rapidamente em soluções impuras [51].

Para preservar as propriedades do ozônio, a água ozonizada deve ser guardada em um recipiente escuro e refrigerado, e utilizada nas primeiras horas após sua ozonização [67].

A água ozonizada atua como um potente e confiável agente antimicrobiano contra bactérias, fungos, protozoários e vírus [41]. Ela pode ser usada como enxaguatório bucal no tratamento das doenças gengivais e halitose. Para uso na cavidade bucal é uma alternativa mais segura ao ozônio gasoso [53,66].

Huth e colaboradores compararam, 'in-vitro', a água ozonizada, o gás e outros antissépticos já estabelecidos (hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e clorexidina) em relação ao efeito tóxico no epitélio e nos fibroblastos. A água ozonizada apresentou a menor citotoxicidade, atendendo às características biológicas celulares ideais em termos de biocompatibilidade para aplicação bucal [68].

Outra característica do ozônio aquoso é sua capacidade de acelerar a cicatrização ao estimular a proliferação celular, uma ferramenta essencial no tratamento de feridas crônicas [45]. Exames planimétricos, imuno-histoquímicos e micromorfológicos de feridas em mucosa bucal foram realizados em um experimento na Universidade de Basel, Suíça. Os pacientes que aplicaram água ozonizada em suas feridas apresentaram uma aceleração da cicatrização nas primeiras 48 horas e fechamento mais precoce da ferida do que os pacientes que aplicaram água normal e os que não receberam tratamento. A maior produção do TGF β na presença do ozônio tem uma influência marcante na proliferação celular, quimiotaxia (monócitos e fibroblastos), angiogênese, síntese de matriz extracelular e síntese de colágeno [69].

Os efeitos anti-inflamatórios da água ozonizada foram testados em um modelo experimental de camundongo. A injeção intraperitoneal de água ozonizada diminuiu níveis de TNF- α e aumentou a atividade de SOD, sugerindo propriedades anti-inflamatórias com ação terapêutica potencial para a inflamação aguda. A água ozonizada pode ser injetada diretamente entre as articulações para o tratamento de artrite e reumatismo [58].

A fim de superar os problemas associados à curta vida útil da água ozonizada, Chiba e Takahashi [70] desenvolveram um método patenteado para produzir água de nanobolhas de ozônio (NBW3). Uma nanobolha tem menos de 100 nm em diâmetro e é produzida pelo colapso de uma micro-bolha ($\leq 50 \mu\text{m}$ de diâmetro) em uma solução eletrolítica por meio de um estímulo físico (como uma onda de choque causada por descarga na solução). Acredita-se que a interface da nanobolha seja distribuída predominantemente com íons hidroxila (OH $^-$) sobre íons hidrônio (H $^+$). Os íons positivos na solução eletrolítica se concentram em torno do núcleo de gás devido à sua superfície carregada negativamente e agem como conchas que evitam que o gás se disperse (fenômeno do salting-out). Devido a essa característica de

comportamento dos íons, as nanobolhas retêm a oxidação e suas propriedades, permanecendo estáveis por mais de 6 meses se for protegido contra a exposição aos raios ultravioleta [71]. Assim como a água ozonizada, o NBW3 possui atividade bactericida sem apresentar toxicidade para os tecidos orais humanos [71,72].

1.2.3.3 Óleo ozonizado

Os óleos vegetais ozonizados têm mostrado aplicações interessantes em diversos campos, como nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Entre os efeitos terapêuticos pode-se listar bactericida, fungicida, mediadores de inflamação, cicatrização de feridas [58], que são relacionados às propriedades imunológicas, antioxidantes e oxigenantes [73].

A produção do óleo ozonizado deve ser realizada em laboratórios por pessoas qualificadas, seguindo rígidas medidas de segurança. Os ozonídeos (compostos químicos derivados do ozônio) são de caráter explosivo, representando um perigo potencial. Um grama de óleo pode absorver mais de 160 mg de ozônio e são compostos por produtos de reação estáveis, permanecendo estáveis por 2 anos se mantido frio [45]. Esta é uma vantagem adicional do ponto de vista comercial [58].

A aplicação do óleo ozonizado na cavidade bucal apresenta longa permanência, penetração adequada do medicamento, alta eficácia e aceitabilidade [55].

Atualmente, nas farmácias europeias existem produtos como o Azexin – óleo de girassol ozonizado – com registro oficial de produto sanitário com indicação para o tratamento de úlceras cutâneas [45].

O modo de ação dos óleos ozonizados permanece uma questão em aberto. Provavelmente, quando o triozonida (três átomos de oxigênio ligados por ligação dupla de carbono) estável entra em contato com a ferida, ele se decompõe lentamente em diferentes peróxidos, que se dissolvem prontamente em água, gerando H₂O₂, o que pode explicar a prolongada atividade desinfetante e estimuladora [74].

A eficácia do óleo ozonizado pode representar uma terapia integrativa no tratamento de lesões teciduais, principalmente em pacientes portadores de patologias como DM e aterosclerose, e no processo de envelhecimento. Para doenças como úlceras ou estomatite aftosa, gengivite e dermatite, o óleo ozonizado auxilia no alívio da dor e na aceleração do processo de cicatrização [73].

1.2.4 Toxicidade e contra-indicações

Os efeitos tóxicos do ozônio se manifestam após a sua inalação e absorção nos pulmões. As vias respiratórias e tecidos pulmonares são os alvos da toxicidade do ozônio [75], onde os sistemas antioxidantes naturais estão praticamente ausentes [45].

Pryor e colaboradores [76] sugerem que os efeitos tóxicos pulmonares do ozônio são devidos, pelo menos em parte, a uma cascata de POL e não ao próprio ozônio. O ozônio inalado reage com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), que são encontrados nos lipídios da camada de revestimento alveolar (LLA), e gera POLs.

Os POLs são tidos como as espécies mais prováveis de atuar como moléculas de transdução de sinal. Esses produtos podem ativar lipases específicas, como a fosfolipase A2 ou fosfolipase C, para liberar ácido araquidônico (AA), que pode então ser convertido em outros mediadores químicos, como várias prostaglandinas (PGs) e fatores de ativação plaquetária (FAP), via ciclooxygenases (COXs) e lipoxigenases (LOXs), que induzem uma resposta inflamatória das vias aéreas. Os efeitos incluem hiperreatividade das vias aéreas, aumento da permeabilidade macromolecular epitelial, infiltração de neutrófilos e hipersecreção de muco nas vias aéreas.

A toxicidade do ozônio varia, dependendo de sua concentração e da duração da exposição. Os sintomas resultantes da exposição ao ozônio a 0,1 e 1,0 ppm incluem dores de cabeça, garganta seca, irritação do sistema respiratório e ardência nos olhos. A exposição a 1,0 e 100 ppm pode causar sintomas semelhantes aos da asma, como cansaço e perda de apetite. Tempos de exposição curtos em altas concentrações podem causar irritação na garganta, hemorragia e congestão pulmonar [56].

Em caso de intoxicação por ozônio, o paciente deve ser colocado em decúbito dorsal, inalar oxigênio úmido e ingerir ácido ascórbico, vitamina E e n-acetilcisteína [41].

Existem algumas contraindicações relativas para a terapia com ozônio: gravidez, anemia grave, hipertireoidismo, trombocitopenia, miastenia grave, intoxicação alcoólica aguda, infecção miocárdica recente, hemorragias e deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) [61]. Essa enzima é necessária para fornecer íons de hidrogênio ao sistema glutathiona, responsável por tamponar a oxidação nas hemácias produzidas por lipoperóxidos [48].

1.2.5 Ozonioterapia adjuvante ao tratamento periodontal

A ozonioterapia na Periodontia é muito pouco estudada. Atualmente (agosto/2022) constam no Pubmed 109 artigos relacionados ao uso do ozônio nas doenças periodontais (“PERIODONTAL OR PERIODONTITIS OR GINGIVITIS” AND OZONE), dos quais 31 ensaios clínicos (Tabela 1), 6 estudos ‘in-vitro’ (Tabela 2), 2 em modelo animal (Tabela 3) e 3 revisões sistemáticas (64,77,78).

Dos ensaios clínicos, 5 foram realizados em gengivite e 26 em periodontite. Em relação à forma de aplicação, 18 utilizaram água ozonizada, 10 ozônio aquoso e 5 utilizaram óleo ou gel ozonizado.

A recente revisão sistemática conduzida por Moraschini e colaboradores [77] mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros periodontais na ozonioterapia adjuvante ao TPNC quando comparados ao TPNC sozinho. No entanto, os autores ressaltam que esses resultados não devem ser considerados definitivos devido à heterogeneidade entre os estudos, presença de fatores de confusão e curto tempo de acompanhamento de alguns estudos incluídos. Há necessidade de mais ensaios clínicos randomizados (ECR) de qualidade para melhor compreensão do assunto.

O objetivo primário da TPNC é controlar a infecção periodontal microbiana por meio da remoção de biofilme bacteriano, cálculo e toxinas das superfícies dentárias. Falhas na descontaminação radicular estão relacionadas às características

anatômicas dos defeitos periodontais que dificultam a instrumentação subgengival, como bolsas profundas, concavidades radiculares e regiões de furca, que podem representar bolsas residuais pós-tratamento, menor estabilidade clínica e risco de progressão de doença [24,25,79]. Por isso há uma busca contínua por terapias adjuvantes que possam melhorar os resultados da instrumentação subgengival isoladamente [80].

A clorexidina (CHX) é um dos agentes antimicrobianos orais mais amplamente utilizados e está disponível em diferentes formulações. A substância é conhecida por sua substantividade e ação bactericida, causando um dano letal à membrana bacteriana, sendo ativa em bactérias gram-negativas e gram-positivas. Por outro lado, a CHX apresenta alguns efeitos colaterais, como o manchamento de dentes e de outras superfícies orais, aumento na formação de cálculos, alteração na percepção do paladar [55], além de toxicidade para os fibroblastos, diminuição da produção de proteínas de colágeno, fatores que prejudicam a cicatrização periodontal [81]. Assim, o poderoso efeito antimicrobiano do ozônio [55,81–84] o torna um potencial agente terapêutico adjuvante ao tratamento da doença periodontal, com a vantagem de ser não invasivo, indolor e biocompatível [85].

Alguns estudos clínicos compararam o ozônio à CHX 0,2% como adjuvantes no manejo da gengivite ou periodontite. A água, óleo ou gel ozonizados avaliados apresentaram quase todos os resultados como sendo semelhantes ou superiores à CHX em relação aos parâmetros clínicos periodontais [55,82,86–88]. Apenas o gel ozonizado apresentou resultados inferiores quando comparado ao gel de CHX 1% em um estudo de boca dividida. Entretanto, os autores fazem uma ressalva que, levando-se em consideração os efeitos adversos da CHX, o gel ozonizado pode ser considerado um substituto válido [89].

Em um experimento 'in-vitro' que investigou a eficácia antimicrobiana do ozônio gasoso/aquoso em comparação à CHX contra microrganismos periodontais, nenhum dos agentes foi capaz de reduzir substancialmente a contagem de *A. actinomycetemcomitans* em culturas de biofilme. No entanto, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. micra* foram eliminados por CHX a 2% ou gás ozônio em altas concentrações. Não houve diferença significativa na eficácia do ozônio aquoso ou gasoso em

comparação à CHX 2%, mas eles foram mais eficazes quando comparados à CHX 0,2% [90].

Além da ação bactericida do ozônio, a periodontia também pode se beneficiar dos efeitos biomoduladores desse gás. Em resposta à condição hipóxica induzida pela doença periodontal, a ozonioterapia ativa o fator de transcrição induzível por hipóxia (HIF-1- α) e mecanismos que corrigem o estado hipóxico são acionados [91,92], favorecendo revascularização do tecido gengival e aumento da angiogênese [93].

Outro potencial efeito biológico do ozônio diz respeito à perda óssea alveolar. Em um modelo de periodontite induzida em ratos, o ozônio se mostrou capaz de diminuir as contagens de células RANKL-positivas, aumentar células osteoprotegerina (OPG) positivas, sendo eficaz na diminuição da perda óssea alveolar [92].

A MMP-8 é uma enzima proteolítica, principal responsável pela degeneração dos tecidos periodontais. Ela é também conhecida como collagenase-2 ou collagenase de neutrófilos [94]. Durante a doença periodontal, a MMP-8 é secretada por vários tipos de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, e o seu nível está associado à severidade da doença periodontal, sendo considerado um biomarcador quantitativo de doença periodontal, podendo ser usado no monitoramento da resposta à terapia periodontal/periimplantar [95,96]. O uso de bochechos à base de azeite ozonizado adjuvante ao tratamento periodontal levou a uma redução significativa nas concentrações salivares de MMP-8 em pacientes com periodontite [97]. Por outro lado, em outro estudo que avaliou os níveis de MMP-1, MMP-8 e MMP-9 em pacientes com periodontite crônica e agressiva, o ozônio gasoso se mostrou capaz de reduzir os níveis de MMPs apenas nos pacientes com periodontite agressiva [24].

Como observado, a ozonioterapia pode trazer inúmeros benefícios ao paciente em relação ao melhor prognóstico do tratamento periodontal. Porém, mais estudos são necessários para que se possa instituir protocolos de aplicação de ozônio na terapia periodontal pautados na prática da Odontologia Baseada em Evidência Científica [98].

Tabela 1 – Sumário dos ensaios clínicos que testaram o ozônio no tratamento de doenças gengivais.

Autor/ano	Doença/Tipo de estudo	Tratamento/Forma aplicação	Tempo	Conclusão
Al Habashneh et. al, 2015 [67]	Periodontite - ECR	TPNC + água ozonizada 30-60s (teste) ou água destilada (controle)	3 meses	Sem diferença entre os grupos.
Ameyaroy et. al, 2020 [99]	Periodontite - Modelo boca dividida	TPNC + TFD (terapia fotodinâmica) ou (água ozonizada) por 5-10 min.	2, 4 e 6 meses	Não houve diferença entre os grupos, mas resultado clínico ligeiramente melhor no grupo ozônio.
Ana Maria Ramirez-Peña et al., 2022 [100]	Periodontite - Modelo boca dividida	4 sessões de gás Ozônio (teste) ou ar (controle) 2ml, 30 µgr/mL, 1 vez por semana.	3 meses	Ozônio apresentou ganho do NIC, diminuição da PS, placa e mobilidade.
Colombo et al., 2021 [89]	Periodontite - Modelo boca dividida	TPNC + gel ozonizado GeliO3 (teste) ou gel de CHX (controle).	1 e 3 meses	O GeliO3 pode ser considerado um substituto válido para a CHX.
Dhingra KL Vandana 2011 [101]	Gengivite em pacientes ortodônticos - Estudo piloto	Irrigação com água ozonizada 5 a 10 minutos	2 semanas e 1 mês	Redução da inflamação gengival em pacientes ortodônticos.
Gandhi et al., 2019 [55]	Periodontite - Modelo boca dividida	TPNS + aplicação subgengival de 0,2% CHX ou óleo de oliva ozonizado . Imediatamente e 2 semanas depois.	3 meses	Melhora parâmetros clínicos e microbiológicos. Tão eficaz quanto CHX, mas isento de efeitos adversos.
Hayakumo et al., 2013 [102]	Periodontite - ECR controlado	TPNC sessão única + água da torneira ou NBW3 .	4 e 8 semanas	Maior redução PS, ganho de NIC e no número médio de bactérias placa sub no grupo NBW3.
Indurkar and Verma, 2016 [82]	Gengivite - ECR	Massagem gengival com 1 ml de óleo ozonizado ou gel de CHX 1%. 10 min., 3X ao dia, por 3 semanas.	3 semanas	Sem diferença estatística entre os grupos.
Isaac et al., 2015 [83]	Periodontite - Estudo Clínico/ Microbiológico	TPNC + Água ozonizada por 1 min - 1 vez por semana durante um mês.	1 mês	Maior redução PS, ganho NIC e redução contagens anaeróbicas totais no grupo ozônio.
Katti et al., 2013 [84]	Periodontite	Irrigação bolsas com água ozonizada ou soro fisiológico no Water Pik - 40 seg, 3 X por semana durante 2 semanas.	15 e 30 dias	A água ozonizada foi mais eficaz na redução da inflamação e da microbiota subgengival.
Kaur et al., 2019 [86]	Periodontite	Irrigação após 2 semanas de TPNC + água ozonizada (teste) ou CHX 0,2% por dois minutos e meio.	1 e 3 meses	A água ozonizada apresentou resultado ligeiramente melhor do que CHX, mas houve diferença estatisticamente significativa apenas no escore de placa.

Kislitsyna et al., 2017 [103]	Periodontite em musicistas	TPNC apenas ou + ozônio gasoso .	3 e 6 meses	O ozônio reduziu inflamação e normalizou circulação sanguínea local, ampliou períodos de remissão e estabilização do processo de recuperação.
Kshitish and Laxman, 2010 [87]	Periodontite - Modelo boca dividida. Ensaio clínico e microbiológico.	Irrigação subgengival com água ozonizada ou CHX em diferentes intervalos de tempo.	18 dias	Grupo ozônio apresentou maior redução índice de placa, índice gengival e efeito antifúngico.
Marconcini et.al, 2021 [104]	Periodontite associada ao DM1 e DM2 .	TPNC + enxaguatório bucal com CHX ou enxaguatório bucal com antioxidante ou água ozonizada .	1,3 e 6 meses	Ozônio e antioxidante apresentaram maior redução de SS e SAT (marcador de estresse oxidativo) aos 3 meses. Não houve diferença entre os grupos na redução de HbA1c após 3 e 6 meses.
Moreo et al., 2020 [105]	Periodontite - Modelo boca dividida.	TPNC com ou sem água ozonizada	7 dias	Maior diminuição na quantidade de bactérias nos sítios tratados com ozônio.
Nardi et al., 2020 [106]	Periodontite – ECR - avaliação de MMP-8	TPNC apenas ou + enxaguante bucal à base de azeite ozonizado	14 dias, 1 mês e 6 meses	TPNC + Azeite ozonizado foi mais eficaz na redução da MMP-8 salivar do que TPNC sozinho.
Nicolini et al., 2021 [107]	Gengivite - ECR controlado cruzado.	Enxágue com água ozonizada por 1 min, uma vez ao dia, sob supervisão.	24, 48, 72 e 96 horas	A água ozonizada parece não afetar a formação de biofilmes supra e subgengivais, bem como a inflamação gengival.
Padya et al., 2016 [108]	Periodontite - ECR modelo boca dividida	TPNC apenas ou associado à CHX 0,2%, ou água ozonizada ou solução salina	1 mês	CHX é mais eficaz seguido da água ozonizada, enquanto a solução salina mostrou-se ineficaz.
Patel et al., 2012 [88]	Periodontite, ECR duplo cego - Modelo boca dividida	TPNC + óleo de oliva ozonizado ou gel de CHX	2, 4, 6 e 8 semanas	O uso de ozônio resultou em significante melhora dos parâmetros clínicos e microbiológicos.
Piva et al., 2020 [109]	Periodontite ECR - Modelo boca dividida	Raspagem ultrassônica com ou sem água ozonizada (Ozonline)	3 e 6 meses	Após Ozonline®, houve diminuição na quantidade de bactérias,.
Ranjith et al., 2022 [110]	Periodontite ECR, triplo-cego, grupos paralelos	TPNC + água ozonizada (grupo teste) ou soro fisiológico (grupo controle)	4 semanas	O grupo ozônio mostrou melhora significativa em todos os parâmetros clínicos, exceto PS de bolsas rasas e médias.
Rapone et al., 2021 [36]	Periodontite associada ao DM2 - ECR	TPNC apenas (controle) ou + irrigação água ozonizada 150ml e gás ozônio (teste)	3, 6, 9 e 12 meses	Sem diferença entre grupos mas tendência de maior eficácia no grupo ozônio.

Rapone et al., 2022 [111]	Periodontite - ECR	TPNC apenas ou + Irrigação com água ozonizada + gás ozônio	3 e 6 meses	TPNC + ozônio apresentou melhores resultados
Seydanur Dengizek et al., 2019 [112]	Periodontite - ECR	TPNC + ozônio gasoso (grupo teste) ou placebo (grupo controle)	1 mês	Sem diferença estatística significativa.
Skurska et al., 2010 [24]	Periodontite crônica e agressiva – ECR - Avaliação MMPs	TPNC + gás ozônio - a cada dois dias durante uma semana durante 1 minuto (42,2 µg /ml)	2 meses	Sem diferença nos parâmetros clínicos. Ozônio aumentou níveis de MMP na periodontite crônica e reduziu na periodontite agressiva.
Talmaç e Çalışır, 2021 [5]	Gengivite em pacientes fumantes e não-fumantes	TPNC + gás ozônio - 60s por dente a cada 2 dias por 1 semana ou equipamento desligado.	1 semana	Ozônio melhorou parâmetros clínicos em fumantes e não fumantes.
Tasdemir et al., 2019 [113]	Periodontite - ECR	TPNC + ozônio gasoso (75% de potência por 30 s - 75 µg/ml) 2 X por semana, durante 2 semanas ou gerador desligado.	3 meses	A ozonioterapia não teve nenhum efeito adicional nos parâmetros periodontais e proteínas de fase aguda, menos PTX-3, que foi mais baixo com ozônio.
Tecco et al., 2022 [114]	Gengivite em mulheres grávidas	Instrução de higiene bucal apenas ou + irrigação domiciliar água ozonizada .	15 dias e 2 meses	Grupo ozônio teve diminuição do SS ao longo do tempo.
Uraz et al., 2019 [115]	Periodontite Estudo clínico, microbiológico e bioquímico ECR	TPNC + Ozônio gasoso 2100 ppm com 80% de oxigênio 3 X 30s por 1 semana.	3 meses	Não houve diferenças significativas entre os dois tratamentos para nenhum dos parâmetros.
Vasthavi et al. 2020 [116]	Periodontite ECR	TPNC + irrigação água ozonizada ou água destilada por 30 a 45 segundos.	14 dias, 21 dias e 2 meses	Melhora significativa nos parâmetros clínicos e microbiológicos a favor do ozônio.
Yilmaz et al., 2013 [117]	Periodontite. ECR e microbiológico	TPNC apenas ou + O3 gasoso tópico ou + laser de Er: YAG	90 dias	Sem efeito adicional nos parâmetros periodontais e microbiológicos.

Tabela 2 – Sumário dos estudos ‘in-vitro’ que testaram o ozônio em periodontopatógenos e citotoxicidade em células gengivais.

Autor/ano	Doença/Tipo de estudo	Tratamento/Forma aplicação	Conclusão
Eick et al., 2012 [118]	In vitro	O gás ozônio foi gerado por 6 s–2x24 s (correspondendo a 0,56 mg–2 x 2,24 mg de ozônio) contra 23 periodontopatógenos	O ozônio apresentou forte atividade antibacteriana mas o efeito é reduzido na presença de soro.
Huth et al., 2006 [68]	In-vitro	Avaliação do efeito citotóxico do ozônio gasoso e aquoso em células epiteliais orais humanas (BHY) e HGF-1 em comparação com CHX 2%, 0,2%; NaOCl 5,25%, 2,25%; H2O2 3%,	O ozônio nas formas gasosa e aquosa mostrou efeitos antimicrobianos. A forma aquosa apresentou menor citotoxicidade, atendendo às características biológicas celulares ideais em termos de biocompatibilidade para aplicação bucal.
Huth et al., 2011 [90]	In-vitro	Culturas planctônicas ou biofilme de periodontopatógenos (<i>Aa</i> , <i>Pg</i> , <i>Tf</i> e <i>parvimonas</i>) expostos por 1 min ao ozônio gasoso e aquoso ou CHX ou solução salina tamponada com fosfato.	Altas concentrações de ozônio aquoso reduziram patógenos periodontais, iguais ou mais eficazes do que CHX (especialmente 0,2%). O ozônio gasoso altamente concentrado foi tão eficaz quanto 2% CHX, e mais eficaz do que 0,2% CHX.
Leewananthawet, 2019 [72]	In-vitro	Avaliação das respostas celulares com tratamento OUIBW (bolha ultrafina de ozônio aquoso estável) sobre fibroblastos do ligamento periodontal primário humano (hPDLFs) e células epiteliais gengivais humanas (Ca9-22).	As análises de RNA-seq revelaram que os genes envolvidos nas respostas ao estresse oxidativo ou na via de sinalização MAPK foram regulados positivamente após OUIBW.
Montevecchi et al., 2013 [119]	In-vitro	Comparações entre óleo ozonizado (O3-Oil), CHX 0,2% e 10% de iodopovidona (PVP-I) através de um disco de difusão teste. Para cada antisséptico foi feita uma série de duas diluições e foram testados contra cepas liofilizadas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	O3-Oil apresentou maiores diâmetros de inibição de crescimento do que CHX e PVP-I em todas as diluições para ambas as cepas testadas. CHX perdeu qualquer eficácia antibacteriana quando diluído mais de 1:32.
Pietrocola et al., 2018 [120]	In-vitro	O gel ozonizado . O-zone foi comparado a 2 agentes à base de CHX em <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. intermedia</i> e <i>S. mutans</i>	O gel O-zone demonstrou menor atividade antibacteriana se comparado aos agentes à base de CHX.

Tabela 3: Sumário dos estudos dos que testaram o ozônio na periodontite experimental em modelo animal.

Autor/ano	Doença/Tipo de estudo	Tratamento/Forma aplicação	Conclusão
Saglam et al., 2020 [92]	Periodontite experimental em ratos	Aplicação de ozônio sistêmico ou tópico por 30 s. Ambas as aplicações de gás ozônio foram feitas durante duas semanas em intervalos de dois dias.	Ozônio sistêmico e tópico diminuíram as contagens de células positivas para RANKL. Ozônio tópico diminuiu também as contagens de células positivas para HIF-1- α e ozônio sistêmico foi mais eficaz na redução de perda óssea alveolar.
Zubachyk e Ilchyshyn, 2014 [121]	Periodontite associada ao tabagismo em ratos	Avaliação das propriedades terapêuticas do óleo de espinheiro marinho ozonizado .	Houve prevenção e correção de distúrbios metabólicos nos tecidos periodontais.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Estudar a ozonioterapia como adjuvante ao TPNC em pacientes com DM2.

1.3.2 Objetivos Específicos

1) Discutir as evidências científicas disponíveis sobre o uso do ozônio no tratamento da periodontite.

2) Discutir o potencial citoprotetivo da ozonioterapia adjuvante ao TPNC em pacientes com DM (capítulo 2).

3) Apresentar um protocolo de ozonioterapia adjuvante ao TPNC em pacientes com DM2 avaliando os desfechos clínicos periodontais e o impacto da terapia combinada nos níveis de HbA1c e proteína C-reativa (CRP). O protocolo proposto será relatado em uma série de relato de casos (capítulo 3).

1.4 REFERÊNCIAS

1. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* [Internet]. 2018 Jun;89:S173–82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/JPER.17-0721>
2. Care D, Suppl SS. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021. *Diabetes Care*. 2021;44(January):S15–33.
3. Dianna J Magliano (Co-chair), Edward J Boyko (Co-chair), Beverley Balkau, Noel Barengo, Elizabeth Barr, Abdul Basit, Dominika Bhata, Christian Bommer, Gillian Booth, Bertrand Cariou, Juliana Chan, Hongzhi Chen, Lei Chen, Tawanda Chivese, Dana Dabalea, Hem ZZ. *IDF Diabetes Atlas 2021* [Internet]. 10th editi. Vol. 102, *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2021. 1–136 p. Available from: www.diabetesatlas.org
4. Harding JL, Pavkov ME, Magliano DJ, Shaw JE, Gregg EW. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia*. 2019;62(1):3–16.
5. Luong A, Tawfik AN, Islamoglu H, Gobriel HS, Ali N, Ansari P, et al. Periodontitis and diabetes mellitus co-morbidity: A molecular dialogue. *J Oral Biosci*. 2021;63(4):360–9.
6. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol*. 2001;6(1):99–112.
7. Salvi GE, Carollo-Bittel B, Lang NP. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: Update on associations and risks. *J Clin Periodontol*. 2008;35(SUPPL. 8):398–409.
8. Kocher T, König J, Borgnakke WS, Pink C, Meisel P. Periodontal complications of hyperglycemia/diabetes mellitus: Epidemiologic complexity and clinical challenge. *Periodontol 2000*. 2018;78(1):59–97.
9. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: A two-way relationship. *Diabetologia*. 2012;55(1):21–31.
10. Baeza M, Morales A, Cisterna C, Cavalla F, Jara G, Isamitt Y, et al. Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci*. 2020;28:e20190248.
11. Sonnenschein SK, Meyle J. Local inflammatory reactions in patients with diabetes and periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015;69(1):221–54.

12. Loe H. Periodontal Disease: The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1993 Jan;16(1):329–34.
13. João Paulo STEFFENS, Mariana Fampa FOGACCI, Cristiano Roberto Grimaldi BARCELLOS, Cristina da S. Schreiber de OLIVEIRA, Fábio Vidal MARQUES, Joaquim CUSTÓDIO JR., et al. Manejo clínico da inter-relação diabetes e periodontite: diretrizes conjuntas da Sociedade Brasileira de Periodontologia (SOBRAPE) e da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Met... Periodontal Medicine View project Reactive oxygen species in metabolism. *Braz J Periodontol* [Internet]. 2022;32(1):90–113. Available from: <https://doi.org/10.14436/0103-9393.32.1.090-113.oar>
14. Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile W V. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol 2000* [Internet]. 2007 Feb;43(1):294–315. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0757.2006.00166.x>
15. Patil Vijayetha P; Gokhale, Neeraja; Acharya, Anirudh; Kangokar, Praveenchandra VS; P. Chronic Periodontitis in Type 2 Diabetes Mellitus: Oxidative Stress as a Common Factor in Periodontal Tissue Injury. *J Clin Diagn Res* [Internet]. 2016;10(4):BC12-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27190790>
16. Vincent Devapriya; Victor, Dhayanand John; Balasundaram, Aruna RR; A. Oxidative stress in chronic periodontitis patients with type II diabetes mellitus. *Eur J Dent* [Internet]. 2018;12(02):225–31. Available from: https://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.4103/ejd.ejd_244_17
17. Arana Ana María; Gómez-Moreno, Gerardo; Morales-Portillo, Cristóbal; Serrano-Olmedo, Isabel; de la Cuesta Mayor, M Carmen; Martín Hernández, Tomás C; M-F. Increased salivary oxidative stress parameters in patients with type 2 diabetes: Relation with periodontal disease. *Endocrinol diabetes y Nutr* [Internet]. 2017;64(5):258–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28495321>
18. Kumar Rekha; Kumar, Anil; Mahant, Sheefali; Nanda, Sanju S; R. Novel Carriers for Coenzyme Q10 Delivery. *Curr Drug Deliv* [Internet]. 2016;13(8):1184–204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26725722>
19. Carneiro Sczepanik FS, Grossi MLML, Casati MM, Goldberg M, Glogauer M, Fine N, et al. Periodontitis is an inflammatory disease of oxidative stress: We should treat it that way. *Periodontol 2000*. 2020 Oct;84(1):45–68.
20. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2015;97:55–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
21. Kanzaki H, Wada S, Narimiya T, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Itohiya K, et al.

- Pathways that regulate ROS scavenging enzymes, and their role in defense against tissue destruction in periodontitis. *Front Physiol.* 2017;8(MAY):1–8.
22. Correa FOB, Gonçalves D, Figueredo CMS, Bastos AS, Gustafsson A, Orrico SRP. Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. *J Clin Periodontol.* 2010;37(1):53–8.
 23. Artese HPC, Foz AM, Rabelo MDS, Gomes GH, Orlandi M, Suvan J, et al. Periodontal therapy and systemic inflammation in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *PLoS One.* 2015;10(5):1–14.
 24. Skurska A, Pietruska M, Paniczko-Dręzek A, Dolińska E, Zelazowska-Rutkowska B, Zak J, et al. Evaluation of the influence of ozonotherapy on the clinical parameters and MMP levels in patients with chronic and aggressive periodontitis. *Adv Med Sci.* 2010;55(2):297–307.
 25. Aimetti M. Nonsurgical periodontal treatment. *Int J Esthet Dent.* 2014;9(2):251–67.
 26. Alex B. Berezow and Richard P. Darveau. Microbial Shift and Periodontitis. *Periodontol 2000* [Internet]. 2011;55(1):36–47. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 27. Van Dyke TE. Shifting the paradigm from inhibitors of inflammation to resolvers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* [Internet]. 2020 Oct 20;91(S1):1–11. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/JPER.20-0088>
 28. Teughels W, Feres M, Oud V, Martín C, Matesanz P, Herrera D. Adjunctive effect of systemic antimicrobials in periodontitis therapy: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2020;47(S22):257–81.
 29. Pretzl B, Sälzer S, Ehmke B, Schlagenhaut U, Dannewitz B, Dommisch H, et al. Administration of systemic antibiotics during non-surgical periodontal therapy—a consensus report. *Clin Oral Investig.* 2019;23(7):3073–85.
 30. Sedghi LM, Bacino M, Kapila YL. Periodontal Disease: The Good, The Bad, and The Unknown. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11(December):1–26.
 31. Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontol 2000* [Internet]. 2020 Oct 25;84(1):14–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/prd.12331>
 32. Balta MG, Papathanasiou E, Blix IJ, Van Dyke TE. Host Modulation and Treatment of Periodontal Disease. *J Dent Res* [Internet]. 2021 Jul 3;100(8):798–809. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034521995157>

33. Bocci V. OZONE [Internet]. Springer. Dordrecht: Springer Netherlands; 2011. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-90-481-9234-2>
34. Ahmed J, Ahmed E, Seifija O, Agani Z, Hamiti V. Efficiency of gaseous ozone in reducing the development of dry socket following surgical third molar extraction. *Eur J Dent*. 2016;10(3):381–5.
35. Marconcini S, Giammarinaro E, Giampietro O, Giampietro C, Soder B, Genovesi R, et al. Oxidative stress and periodontal disease in diabetic patients: a 3-month pilot study. *Dent Oral Craniofacial Res*. 2017;3(5):1–5.
36. Delvecchio BR; EF; MC; IC; FRG; LS; ST; AG; SS; AS; M. The Effect of Gaseous Ozone Therapy in Conjunction with Periodontal Treatment on Glycated Hemoglobin Level in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Environ Res Public Heal* Vol 17, Iss 5467, p [Internet]. 2020;5467. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijerph17155467>
37. Velio Bocci, Emma Borrelli VT and IZ. The Ozone Paradox: Ozone Is a Strong Oxidant as Well as a Medical Drug. *Med Res Rev* [Internet]. 2009 Jun;29(4):646–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18605031>
38. Gupta G, Mansi B. Ozone therapy in periodontics. *J Med Life*. 2012;5(1):59–67.
39. Bakar ALA and O, Bakar ALA and O. Ozone in Dentistry. In: *Ozone in Nature and Practice* [Internet]. 218AD. p. 84. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/60693>
40. Tarrass F, Benjelloun M, Benjelloun O. Current understanding of ozone use for disinfecting hemodialysis water treatment systems. *Blood Purif*. 2010;30(1):64–70.
41. Naik S V., K R, Kohli S, Zohabhasan S, Bhatia S. Ozone- A Biological Therapy in Dentistry- Reality or Myth????? *Open Dent J*. 2016;10(1):196–206.
42. Srikanth A, Sathish M, Harsha AVS. Application of ozone in the treatment of periodontal disease. *J Pharm Bioallied Sci*. 2013;5(SUPPL.1):89–94.
43. Srinivasan SR, Amaechi BT. Ozone: A paradigm shift in dental therapy. *J Glob Oral Heal*. 2019;2(1):68–77.
44. Millar BJ, Hodson N. Assessment of the safety of two ozone delivery devices. *J Dent*. 2007;35(3):195–200.
45. Scientific Advisory Committee W. WFOT's Review on Evidence Based Ozone Therapy WFOT Scientific Advisory Committee 2015. 2015;(Version 1):1–117. Available from: <https://www.wfoot.org/wp-content/uploads/2016/01/WFOT-OZONE-2015-ENG.pdf>
46. Rice RG, Graham DM. U.S. FDA Regulatory Approval of Ozone as an

- Antimicrobial Agent – What Is Allowed and What Needs to Be Understood. *Ozone News* [Internet]. 2001;29:22–31. Available from: <http://www.technozone.in/img/pdf/FDA-e.pdf>
47. Scassellati C, Galoforo AC, Bonvicini C, Esposito C, Ricevuti G. Ozone: a natural bioactive molecule with antioxidant property as potential new strategy in aging and in neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev.* 2020;63.
 48. 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;13(February).
 49. Tricarico G, Rodrigues Orlandin J, Rocchetti V, Ambrosio CE, Travagli V. A critical evaluation of the use of ozone and its derivatives in dentistry. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(17):9071–93.
 50. International Scientific Committee of Ozone Therapy. MADRID DECLARATION ON OZONE THERAPY. 2020 p. 1–104.
 51. Prabha V, Barma RD, Singh R, Madan A. Ozone Technology in Food Processing: A Review. *Trends Biosci* [Internet]. 2015;8(August):4031–47. Available from: [https://krishi.icar.gov.in/jspui/bitstream/123456789/35178/1/01-2944 Ozone Review Paper.pdf](https://krishi.icar.gov.in/jspui/bitstream/123456789/35178/1/01-2944%20Ozone%20Review%20Paper.pdf)
 52. Khadre MA, Yousef AE, Kim JG. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *J Food Sci.* 2001;66(9):1242–52.
 53. R.S DV, Lakshmanan DR. Ozone and Its Role in Periodontal Therapy-A Review. *IOSR J Dent Med Sci.* 2014;13(1):107–10.
 54. Lendhey SS, Kale T, Seth T, Bhartiya G HA. Effect of subgingival application of ozone oil versus olive oil as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis: A clinical and microbiological study. *J Oral Res Rev.* 2020;12:63–9.
 55. Gandhi KK, Cappetta EG, Pavaskar R. Effectiveness of the adjunctive use of ozone and chlorhexidine in patients with chronic periodontitis. *BDJ Open* [Internet]. 2019;5(1):3–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41405-019-0025-9>
 56. Pascual A, Llorca I, Canut A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends Food Sci Technol.* 2007;18(SUPPL. 1):29–35.
 57. Talmaç AC, Çalışır M. Efficacy of gaseous ozone in smoking and non-smoking gingivitis patients. *Ir J Med Sci.* 2021;190(1):325–33.
 58. Tatyana Poznyak, Pamela Guerra Blanco, Arizbeth Pérez Martínez ICO and C-LSC. Ozone Dosage is the Key Factor of Its Effect in Biological Systems. In:

- Ozone in Nature and Practice [Internet]. 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76843%0A>
59. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Riv Ital di Ossigeno-Ozonoterapia*. 2006;5(2):93–104.
 60. León OS, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L, et al. Ozone oxidative preconditioning: A protection against cellular damage by free radicals. *Mediators Inflamm*. 1998;7(4):289–94.
 61. Lacerda AC, Grillo R, de Barros TEP, Martins CB, de Carvalho Luposeli F. Efficacy of biostimulatory ozone therapy: Case report and literature review. *J Cosmet Dermatol*. 2022;21(1):130–3.
 62. Vaillant JD, Fraga A, Díaz MT, Mallok A, Viebahn-Hänsler R, Fahmy Z, et al. Ozone oxidative postconditioning ameliorates joint damage and decreases pro-inflammatory cytokine levels and oxidative stress in PG/PS-induced arthritis in rats. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2013;714(1–3):318–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.07.034>
 63. Fuccio C, Luongo C, Capodanno P, Giordano C, Scafuro MA, Siniscalco D, et al. A single subcutaneous injection of ozone prevents allodynia and decreases the over-expression of pro-inflammatory caspases in the orbito-frontal cortex of neuropathic mice. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2009;603(1–3):42–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.11.060>
 64. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *J Dent*. 2008;36(2):104–16.
 65. 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;28:1–8.
 66. 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.
 67. Al Habashneh R, Alsalman W, Khader Y. Ozone as an adjunct to conventional nonsurgical therapy in chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *J Periodontal Res*. 2015;50(1):37–43.
 68. Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(5):435–40.
 69. Filippi A. The Influence Of Ozonised Water On The Epithelial Wound Healing Process In The Oral Cavity. *Clin Oral Surgery, Radiol Oral Med Univ Basel, Switzerland*. 2011;1(14).
 70. Kaneo Chiba, Miyagi(JP); Masayoshi Takahashi I. Patent Application Publication

(10) Pub . No . : Pub.No.:US207/018972A1. US207/018972A1. Japan; 2007.

71. Hayakumo S, Arakawa S, Takahashi M, Kondo K, Mano Y, Izumi Y. Effects of ozone nano-bubble water on periodontopathic bacteria and oral cells - In vitro studies. *Sci Technol Adv Mater*. 2014;15(5):1–7.
72. Leewananthawet A, Arakawa S, Okano T, Daitoku Kinoshita R, Ashida H, Izumi Y, et al. Ozone ultrafine bubble water induces the cellular signaling involved in oxidative stress responses in human periodontal ligament fibroblasts. *Sci Technol Adv Mater [Internet]*. 2019;20(1):589–98. Available from: <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1614980>
73. Anzolin A, Da Silveira-Kaross N, Bertol C. Ozonated oil in wound healing: What has already been proven? *Med Gas Res*. 2020;10(1):54–9.
74. Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: A review. *Mediators Inflamm*. 2010;2010.
75. Mehlman MA, Borek C. Toxicity and biochemical mechanisms of ozone. *Environ Res*. 1987;42(1):36–53.
76. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: The role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med*. 1995;19(6):935–41.
77. Moraschini V, Kischinhevsky ICC, Calasans-Maia MD, Shibli JA, Sartoretto SC, Figueredo CM, et al. Ineffectiveness of ozone therapy in nonsurgical periodontal treatment: a systematic review and metaanalysis of randomized clinical trials. *Clin Oral Investig*. 2020;24(6):1877–88.
78. Deepthi R, Bilichodmath S. Ozone therapy in periodontics: A meta-analysis. *Contemp Clin Dent [Internet]*. 2020;11(2):108–15. Available from: <http://www.contempclindent.org/text.asp?2020/11/2/108/291577>
79. Maurizio S, Tonetti NPL. Periodontal Risk Assessment (PRA) for Patients in Supportive Periodontal Therapy (SPT). *Oral Heal Prev Dent*. 2003;2(9–10):138–40.
80. Haas AN, Furlaneto F, Gaio EJ, Gomes SC, Palioto DB, Castilho RM, et al. New tendencies in non-surgical periodontal therapy. *Braz Oral Res*. 2021;35(Supplement):1–18.
81. Neeharika Soorgani RAHK, Yada S, Saxena S, Prasad L. Efficacy of ozone therapy as an adjunct to scaling and root planing: A clinical and microbiological study. *Int J Prev Clin Dent Res /*. 2019;6(1):14–6.
82. Indurkar MS, Verma R. Effect of ozonated oil and chlorhexidine gel on plaque induced gingivitis: A randomized control clinical trial. *J Indian Soc Periodontol*. 2016;20(1):32–5.

83. Issac A V., Mathew JJ, Ambooken M, Kachappilly AJ, Ajithkumar PK, Johny T, et al. Management of chronic periodontitis using subgingival irrigation of ozonized water: A clinical and microbiological study. *J Clin Diagnostic Res.* 2015;9(8):ZC29–33.
84. Katti SS, Chava VK. Effect of Ozonised water on Chronic Periodontitis - A Clinical Study. *J Int oral Heal JIOH* [Internet]. 2013;5(5):79–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324309><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3845289>
85. Skurska A, Pietruska M, Paniczko-Dręzek A, Dolińska E, Zelazowska-Rutkowska B, Zak J, et al. Evaluation of the influence of ozonotherapy on the clinical parameters and MMP levels in patients with chronic and aggressive periodontitis. *Adv Med Sci.* 2010;55(2):297–307.
86. Kaur A, Bhavikatti SK, Das SS, Khanna S, Jain M, Kaur A. Efficacy of Ozonised Water and 0.2% chlorhexidine gluconate in the management of chronic periodontitis when used as an irrigant in conjugation with Phase I Therapy. *J Contemp Dent Pract.* 2019;20(3):318–23.
87. Kshitish D, Laxman VK. The use of ozonated water and 0.2% chlorhexidine in the treatment of periodontitis patients: A clinical and microbiologic study. *Indian J Dent Res.* 2010;21(3):341–8.
88. Patel P V, Patel A, Kumar S, Holmes JC. Effect of subgingival application of topical ozonated olive oil in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled, double blind, clinical and microbiological study. *Minerva Stomatol.* 2012 Sep;61(9):381–98.
89. Colombo M, Gallo S, Garofoli A, Poggio C, Arciola CR, Scribante A. Ozone gel in chronic periodontal disease: A randomized clinical trial on the anti-inflammatory effects of ozone application. *Biology (Basel).* 2021;10(7):1–12.
90. Huth KC, Quirling M, Lenzke S, Paschos E, Kamereck K, Brand K, et al. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci.* 2011;119(3):204–10.
91. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and Inflammation HYPOXIA-INDUCED INFLAMMATION. *N Engl J Med* [Internet]. 2011;364(7):656–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21323543><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3930928><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3930928/pdf/nihms544226.pdf>
92. 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;28:1–8.
93. Pchepiorka R, Moreira MS, Lascane NA da S, Catalani LH, Allegrini S, de Lima NB, et al. Effect of ozone therapy on wound healing in the buccal mucosa of rats.

- Arch Oral Biol. 2020;119(March).
94. KINANE DF. Regulators of tissue destruction and homeostasis as diagnostic aids in periodontology. *Periodontol* 2000,. 2000;24:215–25.
 95. de Moraes EF de, Dantas AN, Pinheiro JC, Leite RB, Galvao Barboza CA, de Vasconcelos Gurgel BC, et al. Matrix metalloproteinase-8 analysis in patients with periodontal disease with prediabetes or type 2 diabetes mellitus: A systematic review. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2018;87(September 2017):43–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.12.008>
 96. Al-Majid A, Alassiri S, Rathnayake N, Tervahartiala T, Gieselmann DR, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 as an inflammatory and prevention biomarker in periodontal and peri-implant diseases. *Int J Dent*. 2018;2018.
 97. Nardi GM, Cesarano F, Papa G, Chiavistelli L, Ardan R, Jedlinski M, et al. Evaluation of salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) in periodontal patients undergoing non-surgical periodontal therapy and mouthwash based on ozonated olive oil: A randomized clinical trial. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(18):1–10.
 98. Souza Júnior AR, Pereira CS, Di Paolo GB, Machado FC, Carvalho T de A. Ozônio como coadjuvante na terapia periodontal cirúrgica e não cirúrgica: revisão integrativa da literatura. *Res Soc Dev*. 2021;10(13):e467101321603.
 99. Ameyaroy DK, Ramabhadran BK, Emmatty R, Paul TP, Jose P. Comparative evaluation of the effect of Ozone therapy and Photodynamic therapy in non-surgical management of Chronic periodontitis: A split mouth longitudinal study. *J Indian Soc Periodontol*. 2020;24(5):447–53.
 100. Ramirez-Peña AM, Sánchez-Pérez A, Campos-Aranda M, Hidalgo-Tallón FJ. Ozone in Patients with Periodontitis: A Clinical and Microbiological Study. *J Clin Med*. 2022;11(10):2946.
 101. Dhingra K, Vandana KL. Management of gingival inflammation in orthodontic patients with ozonated water irrigation--a pilot study. *Int J Dent Hyg*. 2011 Nov;9(4):296–302.
 102. Hayakumo S, Arakawa S, Mano Y, Izumi Y. Clinical and microbiological effects of ozone nano-bubble water irrigation as an adjunct to mechanical subgingival debridement in periodontitis patients in a randomized controlled trial. *Clin Oral Investig*. 2013;17(2):379–88.
 103. Kislitsyna A V, Volkov AG, Dikopova NZ, Akhmedbaeva SS, Shishmareva AL. [The experience with the application of ozone therapy for the treatment of periodontitis in musicians-instrumentalists]. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*. 2017;94(4):31–4.
 104. Marconcini Enrica ; Cosola, Saverio ; Oldoini, Giacomo ; Genovesi, Annamaria ;

- Covani, Ugo S; G. Effects of Non-Surgical Periodontal Treatment on Reactive Oxygen Metabolites and Glycemic Control in Diabetic Patients with Chronic Periodontitis. *Antioxidants* (Basel, Switzerland) [Internet]. 2021;10(7). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34208802>
105. Moreo G, Mucchi D, Carinci F. Efficacy ozone therapy in reducing oral infection of periodontal disease: a randomized clinical trial. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2020;34(4 Suppl. 1):31-36. SPECIAL ISSUE: OZONE THERAPY.
 106. Patel P V, Patel A, Kumar S, Holmes JC. Effect of subgingival application of topical ozonated olive oil in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled, double blind, clinical and microbiological study. *Minerva Stomatol* [Internet]. 2012 Sep 11;61(9):381–98. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/18/6619>
 107. Nicolini AC, Rotta I dos S, Langa GPJ, Friedrich SA, Arroyo-Bonilla DA, Wagner MC, et al. Efficacy of ozonated water mouthwash on early plaque formation and gingival inflammation: a randomized controlled crossover clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2021;25(3):1337–44.
 108. Pandya DJ, Manohar B, Mathur LK, Shankarapillai R. Comparative evaluation of two subgingival irrigating solutions in the management of periodontal disease: A clinicomicrobial study. *J Indian Soc Periodontol*. 2016;20(6):597–602.
 109. Piva A, Avantaggiato P, Candotto V, Pellati A, Moreo G. The use of ozone therapy for treatment of periodontal disease: a split-mouth, randomized, controlled clinical trial. Vol. 34, *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. Italy; 2020. p. 91-98. DENTAL SUPPLEMENT.
 110. Ranjith A, Niranjana JM, Baiju KV. Adjunctive benefit of ozonized water irrigation with mechanical debridement in the management of Stage III periodontitis: A randomized controlled clinical and biochemical study. *Int J Dent Hyg*. 2022;20(2):364–70.
 111. 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;19(2).
 112. Seydanur Dengizek E, Serkan D, Abubekir E, Bay KA, Onder O, Arife C. Evaluating clinical and laboratory effects of ozone in non-surgical periodontal treatment: A randomized controlled trial. *J Appl Oral Sci*. 2019;27:1–8.
 113. Tasdemir Z, Oskaybas MN, Alkan AB, Cakmak O. The effects of ozone therapy on periodontal therapy: A randomized placebo-controlled clinical trial. *Oral Dis*. 2019;25(4):1195–202.
 114. Tecco S, Nota A, D'Amicantonio T, Pittari L, Monti M, Polizzi E. Effects of an Ozonated Water Irrigator on the Plaque Index and Bleeding Index of Pregnant

- Women. *J Clin Med* [Internet]. 2022 Jul 15;11(14):4107. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/11/14/4107>
115. Uraz A, Karaduman B, Isler SÇ, Gönen S, Çetiner D. Ozone application as adjunctive therapy in chronic periodontitis: Clinical, microbiological and biochemical aspects. *J Dent Sci*. 2019;14(1):27–37.
 116. Vasthavi C, Babu H, Rangaraju V, Dasappa S, Jagadish L, Shivamurthy R. Evaluation of ozone as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinico-microbial study. *J Indian Soc Periodontol* [Internet]. 2020;24(1):42. Available from: <http://www.jisponline.com/text.asp?2020/24/1/42/269576>
 117. Yılmaz S, Algan S, GURSOY H, NOYAN U, KURU BE, KADIR T. Evaluation of the clinical and antimicrobial effects of the Er:YAG laser or topical gaseous ozone as adjuncts to initial periodontal therapy. *Photomed Laser Surg*. 2013 Jun;31(6):293–8.
 118. Eick S, Tigan M, Sculean A. Effect of ozone on periodontopathogenic species- an in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2012;16(2):537–44.
 119. Montevocchi M, Dorigo A, Cricca M, Checchi L. Comparison of the antibacterial activity of an ozonated oil with chlorhexidine digluconate and povidone-iodine. A disk diffusion test. *New Microbiol*. 2013;36(3):289–302.
 120. Pietrocola G, Ceci M, Preda F, Poggio C, Colombo M. Evaluation of the antibacterial activity of a new ozonized olive oil against oral and periodontal pathogens. *J Clin Exp Dent*. 2018;10(11):0–0.
 121. Zubachyk V, Ilchyshyn M. [THE USE OF OZONATED SEA BUCKTHORN OIL IN THE PREVENTION AND TREATMENT OF TOBACCO DEPENDENCE PERIODONTITIS IN THE EXPERIMENT]. *Likars'ka Sprav*. 2014 Dec;(12):91–4.
 122. Sanz M, Ceriello A, Buysschaert M, Chapple I, Demmer RT, Graziani F, et al. Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;137:231–41.
 123. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000* [Internet]. 2007 Jun;44(1):127–53. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0757.2006.00193.x>
 124. Stratton IM, Adler AI, Neil HAW, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): Prospective observational study. *Br Med J*. 2000;321(7258):405–12.

CAPÍTULO 2 – POTENCIAL CITOPROTETOR DA OZONIOTERAPIA ADJUVANTE AO TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO-CIRÚRGICO DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS

RESUMO

Periodontite e DM são duas doenças imunoinflamatórias que mantêm uma relação de via de mão dupla. DM provoca maior destruição dos tecidos periodontais enquanto a periodontite afeta negativamente o controle glicêmico. A ozonioterapia adjuvante ao TPNC pode ser útil no manejo do paciente com DM, mas ainda não há estudos que respaldem essa prática. Além do efeito antimicrobiano, o ozônio já se mostrou capaz de diminuir danos teciduais mediados por inflamação e estresse oxidativo em diversas doenças. Essa revisão aponta os possíveis mecanismos de ação do ozônio que podem ser benéficos no tratamento periodontal de paciente com diabetes. Modulação das vias Nrf2, NFkB, RANKL/OPG e níveis de MMP8 são efeitos citoprotetivos do ozônio que podem fazer do ozônio um poderoso aliado do TPNC e merecem ser melhor investigados.

Palavras-chave: diabetes mellitus; periodontite; ozonioterapia; ozônio; tratamento periodontal não-cirúrgico.

ABSTRACT

Periodontitis and DM are two immunoinflammatory diseases that maintain a two-way relationship. DM causes greater destruction of periodontal tissues while periodontitis negatively affects glycemic control. Adjuvant ozone therapy to TPNC may be useful in the management of patients with DM, but there are still no studies that support this practice. In addition to the antimicrobial effect, ozone has been shown to reduce tissue damage mediated by inflammation and oxidative stress in several diseases. This review points out the possible mechanisms of ozone action that may be beneficial in the periodontal treatment of patients with DM. Modulation of Nrf2, NFkB, RANKL/OPG pathways and MMP8 levels are cytoprotective effects of ozone that can make ozone a powerful ally of TPNC and deserve further investigation.

Keywords: diabetes mellitus; periodontitis; ozone therapy; ozone; non-surgical periodontal treatment.

2.1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) e periodontite são dois processos interrelacionados - o estado crônico de um ativa e mantém a progressão do outro. Embora a etiologia seja

diferente, vias patogênicas e de sinalização molecular semelhante são compartilhadas por ambas as condições [1].

Periodontite é uma doença inflamatória multifatorial crônica associada a biofilmes de placas disbióticas e caracterizada pela destruição progressiva do aparato de suporte do dente [2]. DM é uma condição crônica causada pela falha do organismo em produzir o hormônio insulina ou em efetivamente utilizar sua produção (resistência à insulina) [3]. A insulina é um hormônio produzido pelo pâncreas que permite que o corpo direcione a glicose da corrente sanguínea para as células e assim obter energia. Sem esse hormônio vital, a glicose se acumula na corrente sanguínea e pode resultar em complicações incapacitantes e com risco de vida [4].

Hipóxia; disfunção em fibroblastos e células epidérmicas; angiogênese e neovascularização prejudicadas; altos níveis de MMPs; danos causados por EROs e produtos finais de glicação avançada; neuropatia e vários níveis de diminuição da resistência imune hospedeira são fatores relacionados ao DM e que são responsáveis pela alta prevalência de periodontite nesse grupo de pacientes [6]. Indivíduos com DM apresentam risco três vezes maior de desenvolverem periodontite [7,8], além de maior gravidade e má resposta à terapia periodontal [9].

Os novos conhecimentos sobre a etiologia da periodontite, entre eles mecanismos imunológicos e genéticos, ampliaram a narrativa até então estabelecida sobre a sua progressão e gravidade. Novos paradigmas levaram à busca por modalidades de tratamento adjuvantes a fim de modular a resposta imunoinflamatória do hospedeiro [10].

O ozônio é um poderoso oxidante com atividade antimicrobiana e capacidade de atuar como um modulador imunológico e metabólico [11]. O efeito antimicrobiano do ozônio é resultado de dano direto à membrana plasmática por ozonólise ou devido aos efeitos oxidantes secundários que modificam o conteúdo intracelular. Esta ação prejudicial é seletiva para células microbianas, não danifica as células do corpo humano devido à sua capacidade antioxidante [12]. O efeito antimicrobiano do ozônio foi testado e comprovado por vários estudos em periodontia [13–20] e não será explorado nesta revisão.

Devido ao efeito combinado, antimicrobiano e bioregulador da imunidade celular e humoral [21], a ozonioterapia pode ser uma estratégia interessante no tratamento periodontal de pacientes com distúrbios imunoinflamatórios como o DM. No entanto, apenas dois estudos analisaram o efeito do ozônio como adjunto ao TPNC em pacientes com DM [22,23].

O objetivo desse estudo é discutir os efeitos imunomodulatórios do ozônio e seu potencial benefício como terapia adjunta no TPNC de pacientes com DM com a finalidade de orientar novos estudos para embasar a ozonioterapia na prática periodontal.

2.2 POTENCIAL EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO

A hiperglicemia induz inflamação sistêmica pelo aumento de marcadores inflamatórios como CRP, IL-6 e TNF- α . Esse último é um importante sinal de apoptose celular, captação óssea, secreção MMPs, expressão de moléculas de adesão intercelular e aumento da produção de IL-6 [1].

O aumento dos níveis de marcadores pró-inflamatórios leva à diminuição significativa da produção e resposta dos marcadores anti-inflamatórios, que no DM já estão diminuídos, principalmente IL-10 [24].

O estado hiperglicêmico também pode interferir na função de neutrófilos, causar diminuição da atividade quimiotática, fagocitose e capacidade bactericida, com consequente aumento da gravidade da infecção periodontal em pacientes com DM [24].

A exposição crônica a biofilmes bacterianos desencadeia o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e ativa uma cascata de resposta de células imunes, incluindo células B e T, via NF κ B. Além da ativação de osteoclastos, induzida por RANK-L, que resulta em perda óssea [1].

Outro fator que está associado à patogênese do DM e da periodontite é o estresse oxidativo. Caracterizado por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes

em favor dos oxidantes, o estresse oxidativo leva à interrupção da sinalização redox e da função fisiológica [25,26].

Nos últimos anos, tem havido um crescente corpo de evidências apontando para o papel das EROs no estabelecimento de um ambiente de estresse oxidativo subjacente à patogênese de uma ampla gama de condições inflamatórias crônicas, incluindo DM e periodontite [27,28].

As EROs desempenham um importante papel na sinalização celular, regulação gênica e defesa antimicrobiana. Uma superabundância de EROs leva ao aumento da carga oxidante, juntamente com redução da capacidade antioxidante, resultando em estresse oxidativo nos tecidos afetados, o que leva a alterações patológicas, como danos a biomoléculas e membranas celulares. Esse desafio oxidativo pode resultar em destruição dos tecidos periodontais, aumentando o risco de perda dentária à medida que suas estruturas de sustentação são destruídas [27].

A geração de EROs por células imunes em resposta a desafio bacteriano contribui para a patogênese das doenças periodontais. O estresse oxidativo desencadeia mecanismos pró-inflamatórios, interferindo na progressão do ciclo celular e induzindo alterações teciduais, principalmente osteoclastogênese [29].

O papel do estresse oxidativo no DM pode ser multifatorial em relação ao desenvolvimento da periodontite. As EROs são potentes ativadores fisiopatológicos latentes não-proteolíticos de MMP, e que também podem reagir com ácidos graxos poliinsaturados em membranas biológicas, levando ao aumento da peroxidação lipídica. Assim, o aumento da ativação pró-MMP combinado com o aumento da peroxidação lipídica pode contribuir para a alta suscetibilidade à destruição de tecido periodontal em pacientes com mau controle metabólico [30].

O ozônio é um gás com propriedades oxidantes capaz de ativar sensores celulares específicos que regulam positivamente o sistema antioxidante, induzindo a uma adaptação ao estresse oxidativo. Esse fenômeno pode ser descrito como uma indução da tolerância a EROs e é denominado "pré-condicionamento oxidativo" [31].

A exacerbação do estresse oxidativo sistêmico pode representar um mecanismo importante para o agravamento mútuo do DM e da periodontite [26]. Há uma ligação direta entre a presença de estresse oxidativo e a diminuição da absorção de glicose [32], evidência que sugere que o ozônio pode ter propriedades "antidiabéticas".

Alguns estudos sugerem que o ozônio é eficaz para o controle glicêmico. Entretanto, seu efeito sobre a glicemia quando a ozoniterapia é utilizada no TPNC ainda não está claro. Há apenas dois estudos sobre o tema, Delvecchio e colaboradores [22] compararam a eficácia do ozônio gasoso e aquoso em conjunto com TPNC na redução do nível de HbA1C em pacientes com DM2. Após 12 meses, embora tenha havido tendência de superioridade do ozônio em relação ao TPNC somente, não houve diferença significativa. Resultado semelhante foi encontrado por Marconcini e colaboradores [23], que compararam o ozônio entregue por dispositivo doméstico duas vezes ao dia com grupos que receberam CHX ou terapia com antioxidante. Não houve diferenças significativas entre os grupos na redução da HbA1C após 3 e 6 meses, mas houve uma melhora significativa no teste antioxidante salivar (SAT) em favor dos grupos de ozônio e antioxidantes.

2.2.1 Nrf2

Um dos principais mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo é a ativação do Nrf2, uma via de sinalização do elemento de resposta antioxidante. Nrf2 é considerado um fator mestre de transcrição que controla a expressão de genes cujos produtos protéicos estão envolvidos na desintoxicação e eliminação de oxidantes reativos e agentes eletrofílicos por meio de reações conjugais e aumento da capacidade antioxidante celular [33,34].

Em resposta ao estresse oxidativo, o Nrf2 citoplasmático é liberado, induzindo centenas de antioxidantes e enzimas desintoxicantes, o que leva à proteção contra a destruição dos tecidos periodontais. A expressão Nrf2 reduzida está fortemente correlacionada com a piora da destruição periodontal e danos oxidativos na periodontite relacionada ao DM. Periodontite e DM combinados agravam sinergicamente os danos oxidativos locais e sistêmicos, sugerindo que a regulação de

antioxidantes dependente de Nrf2 pode representar uma nova estratégia terapêutica para a periodontite [35].

Alguns estudos mostram que a ozonioterapia pode ativar o Nrf2 a partir de células mononucleares periféricas do sangue e células endoteliais em humanos saudáveis [36,37]. Por sua vez, Nrf2 aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e desintoxicantes. Esse efeito do ozônio mostrou ser dissociado do efeito do oxigênio, evidenciado pelos valores da amostra de controle, na qual o sangue foi tratado apenas com oxigênio [34].

O plasma sanguíneo ozonizado atua como um estresse oxidativo agudo e calculado, desencadeando a translocação nuclear de Nrf2 de maneira dose-dependente com subsequente indução de HO-1 e NQO1 (quinone oxidoreductase1) em células endoteliais humanas. Essa característica faz da terapia de ozônio uma boa abordagem complementar para um amplo espectro de doenças degenerativas, revertendo o estresse oxidativo crônico e provavelmente restaurando a homeostase redox [36].

Em estudo com pacientes portadores de esclerose múltipla, o ozônio promoveu uma redução do estresse oxidativo celular e redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. O efeito regulador do ozônio medicinal foi parcialmente associado à indução da fosforilação do Nrf2 [38].

2.2.2 NFkB

O NFkB é uma importante via metabólica ativada durante o processo inflamatório, essencial para diversas sinalizações da resposta inflamatória, função imunológica, apoptose e crescimento celular. Seus genes-alvo incluem os da COX-2, óxido nítrico sintase induzida (iNOS), várias citocinas inflamatórias e quimiotáticas, como TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 e IL-12, além de receptores de citocinas e adesão celular [39].

As proteínas do NFkB são consideradas vias prototípicas de sinalização pró-inflamatória. Por outro lado, as funções anti-apoptóticas do NFkB podem proteger contra inflamação, no caso da sobrevivência das células epiteliais e da integridade da

barreira mucosa. Dessa forma, a resposta inflamatória é mantida através da ativação leucocitária persistente [40].

A sinalização NFkB está entre uma cascata de fatores de transdução de sinal intracelular ativados pela interação RANKL-RANK e desempenha um papel central na diferenciação de osteoclastos, sendo implicada no mecanismo pelo qual IL-6 regula osteoclastogênese induzidas por RANKL [41].

EROs interagem com vias de sinalização NFkB em uma relação bidirecional. Genes dependentes de NFkB influenciam os níveis de EROs na célula e, por sua vez, os níveis de atividade NFkB também são regulados pelos níveis de EROs [42].

Tem sido sugerido que o NFkB modula as atividades de inflamassomas, que são ativados através do reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos em torno de locais de infecção. Portanto, a ativação descontrolada de NFkB induz inflamação e doenças crônicas. Várias abordagens terapêuticas foram introduzidas para bloquear a expressão de NFkB, mas os resultados mostram que a inibição de NFkB pode produzir efeitos colaterais. Por isso, compreender o mecanismo de ativação de NFkB em condições patológicas específicas da doença é crucial para projetar abordagens terapêuticas mais eficazes para o controle da inflamação [43].

O efeito anti-inflamatório e inibitório do ozônio aquoso no sistema NFkB foi investigado in vitro. A atividade de NFkB em células orais estimuladas por TNF foi inibida após a incubação em meio ozonizado. O mesmo ocorreu nos tecidos de ligamento periodontal de dentes periodontalmente comprometidos, evidenciando a capacidade anti-inflamatória e imunomoduladora do ozônio [44].

Em modelo animal, a ozonioterapia foi capaz de atenuar respostas inflamatórias em lesões psoriáticas por efeitos distintos. Pelo efeito antimicrobiano, ao inibir microrganismos colonizados na superfície das lesões, o ozônio reduz a produção de PAMPs e, portanto, diminui a ativação da via TLR2/NFkB. Outro efeito é a capacidade de ativação do sistema antioxidante Nrf2-ARE, que pode antagonizar respostas inflamatórias mediadas por NFkB. O último, diz respeito à melhora do

ambiente hipóxico das lesões cutâneas psoriáticas e consequente inibição das respostas inflamatórias induzidas por hipóxia [45].

2.2.3 Hsp 70

HSPs são uma grande família de proteínas com estrutura altamente conservada e que são expressas em condições estressantes na célula, impedindo a transformação de proteínas sob situações adversas. Essas proteínas desempenham um papel importante nos processos centrais da célula, atuando como aderentes moleculares a outras proteínas, têm efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Também auxiliam no dobramento e redobramento precoce de proteínas, protegendo o núcleo e a membrana lipídica da destruição e prevenindo a apoptose celular.

Todas as células vivas apresentam proteínas HSP, que são divididas em cinco classes principais. Uma delas é a HSP 70, o grupo mais sensível às mudanças de temperatura e que tem a estrutura mais conservada [46].

As HSPs podem atuar como estimulantes da resposta imune adaptativa por meio de sua capacidade de ligar peptídeos antigênicos. Durante o processamento de antígenos, elas sinalizam destruição tecidual e perigo para células inflamatórias e ajudam na imunovigilância, transportando peptídeos intracelulares para células imunes distantes [47].

Embora existam vários tipos de moléculas e células com funções imunológicas na saliva, o potencial efeito imunoativador da Hsp70 salivar é altamente importante. Devido a um alerta defensivo contínuo não específico, desempenha um papel na prevenção de infecções bacterianas e na manutenção da mucosa periodontal [48].

O nível de HSP70 nos fluidos sérico, bucal e gengival de pacientes com periodontite mostra-se significativamente aumentado em comparação com indivíduos saudáveis (49); e correlaciona-se com alterações dos parâmetros clínicos periodontais, enfatizando seu papel na patogênese da periodontite. O HSP70 age como um sinal de perigo para liberação de citocinas pró-inflamatórias de várias células imunes [46]. Por outro lado, os níveis de anticorpos anti-HSP70 no fluido crevicular são significativamente mais elevados em sítios de saúde quando comparados aos de

doença. Esses níveis também se mostram aumentados após a terapia periodontal inicial, sugerindo que o nível de anticorpos anti-HSP70 pode ser um indicador adequado do processo de controle da doença [50].

Em um estudo que analisou a variabilidade no agrupamento do gene da IL-1 e os níveis plasmáticos de IL-1 β em pacientes com periodontite, DM e uma combinação de ambas as doenças, o HSP70 foi capaz de aumentar os níveis de IL-1 β [46]. Outro estudo foi projetado para determinar se a resposta ao tratamento periodontal pode ser prevista pelos perfis de IgG para os parâmetros de especificidade *P. gingivalis*, HSP e GAD65. Os resultados indicam que a resposta do soro ao HSP70 humano pode ser protetora em pacientes com DM e periodontite [51].

Observou-se que a dose terapêutica de ozônio (0,84 μ mol/mL ou 40 μ g/mL de gás por mL de sangue) induziu Hsp-70 in vitro, bem como HO-1. Os dados bioquímicos são consistentes com a análise de Western blot e mostram que tanto o HO-1, quanto o Hsp-70 podem desempenhar papéis protetores importantes nas respostas adaptativas ao estresse oxidativo [52].

Em outro estudo in vitro, o tratamento com ozônio a 10 μ g/mL demonstrou induzir respostas celulares positivas e duradouras na organização do citoesqueleto e ativação mitocondrial, bem como na transcrição nuclear. Vale ressaltar que a exposição ao ozônio tem provado preservar as características ultraestruturais normais das organelas celulares. De fato, não foram observados sinais de degeneração e as alterações morfológicas que ocorrem nas mitocôndrias devem ser consideradas como consequência de alterações funcionais e não de danos às organelas [53].

Até onde se sabe, não há estudos que avaliam o efeito da terapia de ozônio adjuvante ao tratamento periodontal nos níveis de HSP70. No entanto, o ozônio foi capaz de aumentar o HSP70 no tratamento de outras condições, como lesões de isquemia/reperfusão [54,55].

2.3 POTENCIAL ANTI-HIPÓXICO E DE HOMEOSTASE ÓSSEA E TECIDUAL

A hipóxia (ou anoxemia) é uma condição na qual os tecidos e células do corpo são privados de suprimento adequado de oxigênio [56]. Hipóxia e inflamação

frequentemente ocorrem juntas em doenças inflamatórias crônicas, o que agrava seus efeitos (57).

Os tecidos de pacientes com DM são hipóxicos. No entanto, as respostas adaptativas à hipóxia são prejudicadas devido à desregulação da sinalização do fator 1 alfa induzível de hipóxia (HIF-1 α). Isso contribui para a progressão do DM e suas complicações [56]. Por outro lado, a hipóxia também é considerada um fator patogênico da periodontite, danos teciduais e edema em tecidos inflamados podem resultar em microcirculação prejudicada e redução da oferta de oxigênio [58].

A resposta adaptativa à insuficiência de oxigênio no tecido inflamado é o acúmulo e ativação do regulador transcricional mestre HIF-1 α . A imunoreatividade do HIF-1 α em amostras de tecidos de pacientes com periodontite foi mais intensa em comparação com gengivite e controles saudáveis [58], sugerindo que a periodontite pode ser potencialmente prevenida ou tratada por meio da modulação da expressão ou atividade do HIF-1 α [56].

O ozônio tem demonstrado capacidade de melhorar o transporte de oxigênio no sangue, o que resulta em alteração do metabolismo celular pela ativação de processos aeróbicos (glicólise, ciclo de Krebs, B-oxidação de ácidos graxos) e utilização de recursos energéticos. Além disso, o ozônio também previne a formação de agregados eritrocitários, ativa mecanismos de síntese proteica e aumenta o número de ribossomos e mitocôndrias nas células. Essas alterações em nível celular explicam o aumento da atividade funcional e o potencial de ozônio para regeneração tecidual e de órgãos [12].

O ozônio permite que o oxigênio se mova dentro dos tecidos mais facilmente pelo aumento da quantidade de 2,3-DPG em eritrócitos, bem como pelo aumento na liberação de óxido nítrico, que leva à vasodilatação e ao aumento do fluxo sanguíneo no tecido. O aumento de radicais livres de oxigênio, também provocado pelo ozônio, leva a uma mudança nos níveis de enzimas antioxidantes e na atividade do sistema imunológico, induzindo a produção de interferon, IL, TNF e fatores de crescimento em leucócitos e células endoteliais. Como resultado, a terapia de ozônio pode ser usada

para o tratamento de condições fisiopatológicas em que o processo inflamatório é intenso e o sistema imunológico é acionado [59].

Estudos in-vitro avaliaram os efeitos do ozônio em fibroblastos. A adição de 0,5 ppm de ozônio aumentou significativamente a produção de colágeno tipo 1 por fibroblastos gengivais humanos primários (HGFs) em 24 h, sugerindo que o uso clínico de ozônio facilitaria o equilíbrio positivo entre a manutenção e reparo do tecido periodontal mediado por HGF [60]. Em outro estudo, células do ligamento periodontal humano (hPDLFs) e células epiteliais gengivais humanas (Ca9-22) foram tratados com OUFBW. Os resultados mostraram que OUFBW gera EROs, que por sua vez ativam a via MAPK. O OUFBW também desencadeou a ativação de c-Fos, um componente principal da proteína ativadora do fator de transcrição 1 (AP-1), e também Nrf2. Os resultados da análise de RNA-seq revelaram que os numerosos genes envolvidos nas respostas ao estresse oxidativo ou na via de sinalização MAPK foram superregulados após o tratamento com OUFBW, destacando outros papéis biológicos do OUFBW no tratamento da periodontite, além de sua atividade bactericida [61].

2.3.1 RANKL/OPG

O equilíbrio entre a reabsorção óssea por osteoclastos e a formação óssea por osteoblastos determina o nível de massa óssea. RANKL, seu receptor RANK e o receptor chamariz osteoprotegerina (OPG) são moléculas-chave na regulação da diferenciação, recrutamento e função dos osteoclastos [62]. Volume ósseo trabecular reduzido, aumento da rotatividade óssea e maior perda óssea na doença periodontal estão associados a um maior número de células positivas para RANKL e OPG [57].

Níveis de RANKL aumentados têm sido relatados em situações de hipóxia em hPDLs [59]. A hipóxia pode afetar a expressão de RANKL e OPG em hPDLs, o que constitui um importante evento patogênico na reabsorção óssea alveolar [63].

A periodontite é uma doença osteoimune única, na qual o RANKL liga a resposta imune antibacteriana à destruição óssea. Existem poucas outras condições em que a infecção ocorre ao redor do osso além da periodontite [64].

O RANKL é identificado em linfócitos, células estromais e muitos outros tipos de células em tecidos periodontais com funções regulatórias diretas ou indiretas. Citocinas como $\text{il-1}\beta$ e $\text{TNF-}\alpha$ podem aumentar a expressão RANKL em células periodontais e aumentar a formação de osteoclastos [62].

Foram observados no fluido crevicular de pacientes com periodontite associada ao DM2 maior expressão de RANKL em comparação com pacientes sem DM [65]. Além disso, a razão RANKL/OPG em locais de periodontite não tratadas e tratadas podem ser influenciadas pelo mau controle glicêmico em indivíduos com DM2 [66]. Esses achados mostram que a reabsorção óssea periodontal pode ser mediada pelo estado glicêmico [65,66].

Descobrir o passo fundamental na expressão RANKL pode levar a uma nova visão sobre a patogênese periodontal e ao desenvolvimento de um novo alvo para a terapia periodontal. Por exemplo, podemos prevenir a reabsorção óssea periodontal moderando a função dos linfócitos ou alterando o nível de algumas citocinas, o que levaria à inibição da expressão de RANKL [62]. Novos alvos terapêuticos são interessantes especialmente em grupos de risco de colapso periodontal, como indivíduos com DM mal controlado [66].

Em um estudo de periodontite experimental em modelo animal, as aplicações de ozônio diminuíram células HIF-1- α positivas, evidenciando a capacidade anti-hipóxia, e contagem de células RANKL-positivas, sendo eficazes na redução da perda óssea alveolar [59].

A diminuição de células RANKL-positivas pode ser uma consequência do efeito antimicrobiano do ozônio. Isso porque uma das principais bactérias envolvidas na periodontite, *P. gingivalis*, também pode modular a expressão de RANKL/OPG nos tecidos periodontais, estimulando a osteoclastogênese e levando à reabsorção óssea alveolar [67].

2.3.2 MMP8

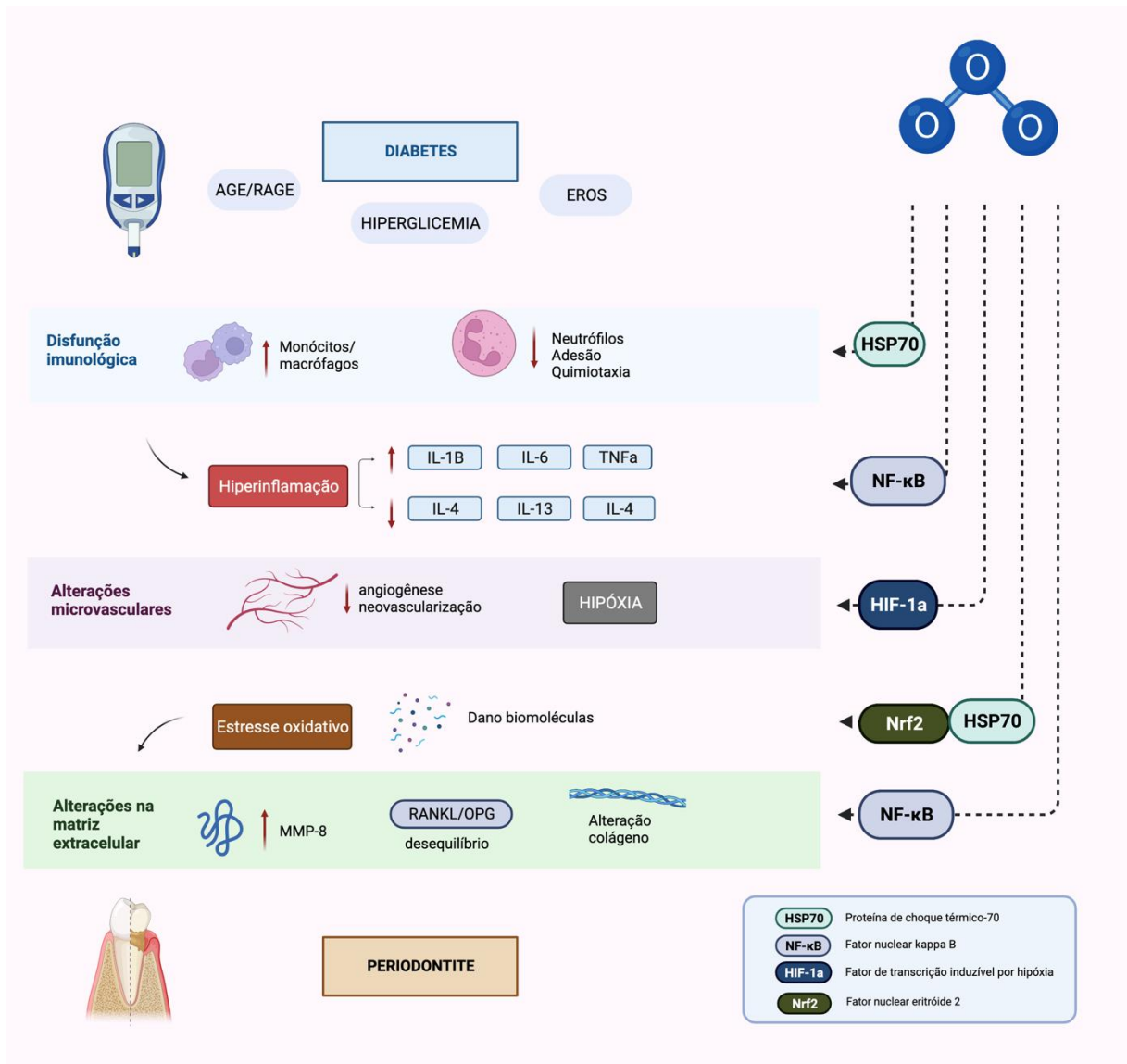
As MMPs são enzimas proteolíticas pertencentes à superfamília de proteases de zinco envolvidas na degradação fisiológica de proteínas na matriz extracelular e

membranas basais, sendo categorizadas em vários grupos. A MMP-8 pertence ao grupo de colagenases que exibe uma habilidade única de quebrar os colágenos tipos I e III, componentes da matriz extracelular periodontal. Portanto, a MMP-8 é considerada a principal colagenase na periodontite [68].

Os tecidos conjuntivos de indivíduos com DM podem manifestar alterações patológicas. A suprarregulação de citocinas (IL-1 e TNF- α) no tecido gengival e fluido crevicular induz um aumento da expressão de MMP no tecido periodontal, que por sua vez, combinado a diminuição na produção de colágeno por fibroblastos e de componentes da matriz óssea por osteoblastos, pode aumentar a destruição tecidual e a gravidade da periodontite [9,69–71]. Em estudo transversal, composto por 451 pacientes, foram encontrados níveis salivares elevados de MMP-8 entre pacientes com DM [72].

A capacidade do ozônio em diminuir o nível de MMP-8 foi testada com o uso assistido de enxaguante bucal à base de óleo ozonizado adjuvante ao TPNC e levou a uma redução significativa e mais rápida nas concentrações salivares de MMP-8, sendo mais eficaz do que TPNC apenas [46]. O mesmo resultado foi alcançado com a aplicação de ozônio gasoso combinado com TPNC em pacientes com periodontite agressiva [45].

Figura 1 - Representação esquemática do potencial efeito do ozônio sobre mecanismos envolvidos na periodontite associada ao DM.



2.4 CONCLUSÃO

Além dos conhecidos efeitos antimicrobianos, o ozônio também possui efeitos imunomoduladores ainda pouco explorados no tratamento da periodontite e que podem ser de grande valor para pacientes com DM. O ozônio tem apresentado efeitos positivos em diversos mecanismos moleculares e vias de sinalização que também estão envolvidos tanto na periodontite, quanto no DM. Isso indica um potencial

impacto local, por meio da citoproteção oferecida aos tecidos periodontais, bem como sistêmico, que pode representar melhor controle glicêmico nesse grupo de pacientes.

Assim, os efeitos imunomoduladores do ozônio devem ser melhor investigados, preferencialmente por meio de técnicas moleculares, para uma compreensão robusta de seu modo de atuação no tratamento periodontal de pacientes com DM. Esse entendimento permitirá o desenvolvimento de protocolos de tratamento personalizados e mais eficazes.

2.5 REFERÊNCIAS

1. Luong A, Tawfik AN, Islamoglu H, Gobriel HS, Ali N, Ansari P, et al. Periodontitis and diabetes mellitus co-morbidity: A molecular dialogue. *J Oral Biosci.* 2021;63(4):360–9.
2. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;45(December 2017):S162–70.
3. Dianna J Magliano (Co-chair), Edward J Boyko (Co-chair), Beverley Balkau, Noel Barengo, Elizabeth Barr, Abdul Basit, Dominika Bhata, Christian Bommer, Gillian Booth, Bertrand Cariou, Juliana Chan, Hongzhi Chen, Lei Chen, Tawanda Chivese, Dana Dabalea, Hem ZZ. *IDF Diabetes Atlas 2021 [Internet]. 10th editi. Vol. 102, Diabetes Research and Clinical Practice. 2021. 1–136 p. Available from: www.diabetesatlas.org*
4. Tc S, Needleman I, Sh W, Ej M. Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. *Cochrane Collect.* 2010;(5):1–52.
5. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol.* 2001;6(1):99–112.
6. Genco RJ, Borgnakke WS. Diabetes as a potential risk for periodontitis:

- association studies. *Periodontol 2000*. 2020;83(1):40–5.
7. Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*. 1997;14(1):173–201.
 8. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000* [Internet]. 2007 Jun;44(1):127–53. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0757.2006.00193.x>
 9. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997;14(1):216–48.
 10. Zidar A, Kristl J, Kocbek P, Zupančič Š. Treatment challenges and delivery systems in immunomodulation and probiotic therapies for periodontitis. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2021;18(9):1229–44. Available from: <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1908260>
 11. Deepthi R, Bilichodmath S. Ozone therapy in periodontics: A meta-analysis. *Contemp Clin Dent* [Internet]. 2020;11(2):108–15. Available from: <http://www.contempclindent.org/text.asp?2020/11/2/108/291577>
 12. Seidler V, Linetskiy I, Hubálková H, Stanková H, Smucler R, Mazánek J. Ozone and its usage in general medicine and dentistry. A review article. *Prague Med Rep*. 2008;109(1):5–13.
 13. Neeharika Soorgani RAHK, Yada S, Saxena S, Prasad L. Efficacy of ozone therapy as an adjunct to scaling and root planing: A clinical and microbiological study. *Int J Prev Clin Dent Res* /. 2019;6(1):14–6.
 14. Hayakumo S, Arakawa S, Takahashi M, Kondo K, Mano Y, Izumi Y. Effects of ozone nano-bubble water on periodontopathic bacteria and oral cells - In vitro studies. *Sci Technol Adv Mater*. 2014;15(5):1–7.
 15. Ramirez-Peña AM, Sánchez-Pérez A, Campos-Aranda M, Hidalgo-Tallón FJ. Ozone in Patients with Periodontitis: A Clinical and Microbiological Study. *J Clin*

- Med. 2022;11(10):2946.
16. Eick S, Tigan M, Sculean A. Effect of ozone on periodontopathogenic species- an in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2012;16(2):537–44.
 17. Kshitish D, Laxman VK. The use of ozonated water and 0.2% chlorhexidine in the treatment of periodontitis patients: A clinical and microbiologic study. *Indian J Dent Res*. 2010;21(3):341–8.
 18. Hayes K. Ozone: The revolution in dentistry. *Br Dent J*. 2005;199(5):307–307.
 19. Huth KC, Quirling M, Lenzke S, Paschos E, Kamereck K, Brand K, et al. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci*. 2011;119(3):204–10.
 20. Vasthavi C, Babu H, Rangaraju V, Dasappa S, Jagadish L, Shivamurthy R. Evaluation of ozone as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinico-microbial study. *J Indian Soc Periodontol* [Internet]. 2020;24(1):42. Available from: <http://www.jisponline.com/text.asp?2020/24/1/42/269576>
 21. Bakar ALA and O, Bakar ALA and O. Ozone in Dentistry. In: *Ozone in Nature and Practice* [Internet]. 218AD. p. 84. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/60693>
 22. Delvecchio BR; EF; MC; IC; FRG; LS; ST; AG; SS; AS; M, Rapone Elisabetta ; Corsalini, Massimo ; Converti, Ilaria ; Grassi, Felice Roberto ; Santacroce, Luigi ; Topi, Skender ; Gnoni, Antonio ; Scacco, Salvatore ; Scarano, Antonio ; Delvecchio, Maurizio B; F. The Effect of Gaseous Ozone Therapy in Conjunction with Periodontal Treatment on Glycated Hemoglobin Level in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus: An Unmasked Randomized Controlled Trial. *Int J Environ Res Public Heal* Vol 17, Iss 5467, p [Internet]. 2020;5467(15). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32751340>
 23. Marconcini Enrica ; Cosola, Saverio ; Oldoini, Giacomo ; Genovesi, Annamaria ;

- Covani, Ugo S; G. Effects of Non-Surgical Periodontal Treatment on Reactive Oxygen Metabolites and Glycemic Control in Diabetic Patients with Chronic Periodontitis. *Antioxidants* (Basel, Switzerland) [Internet]. 2021;10(7). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34208802>
24. Purnamasari D, Khumaedi AI, Soeroso Y, Marhamah S. The influence of diabetes and or periodontitis on inflammation and adiponectin level. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2019;13(3):2176–82.
 25. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants Redox Signal*. 2015;23(14):1144–70.
 26. Li X, Sun X, Zhang X, Mao Y, Ji Y, Shi L, et al. Enhanced Oxidative Damage and Nrf2 Downregulation Contribute to the Aggravation of Periodontitis by Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:9421019.
 27. Sczepanik Márcio Lima; Casati, Márcio; Goldberg, Michael; Glogauer, Michael; Fine, Noah; Tenenbaum, Howard C FSC; G. Periodontitis is an inflammatory disease of oxidative stress: We should treat it that way. *Periodontol 2000* [Internet]. 2020;84(1):45–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32844417>
 28. P. B, H.N. N, M. B. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontol 2000* [Internet]. 2014;64(1):139–53. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L612854783%0Ahttp://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00455.x>
 29. Cuevas-Tena M, Bermúdez JD, Silvestre R, Alegría A, Lagarda MJ. Impact of colonic fermentation on sterols after the intake of a plant sterol-enriched beverage: a randomized, double-blind crossover trial. *Clin Nutr* [Internet]. 2019;38(4):1549-1560. Available from: <https://www.cochranelibrary.com/central/doi/10.1002/central/CN-02116885/full>

30. Collin HL, Sorsa T, Meurman JH, Niskanen L, Salo T, Rönkä H, et al. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res.* 2000;35(5):259–65.
31. León OS, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L, et al. Ozone oxidative preconditioning: A protection against cellular damage by free radicals. *Mediators Inflamm.* 1998;7(4):289–94.
32. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol.* 2005;523(1–3):151–61.
33. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2009;284(20):13291–5.
34. Re L, Martínez-Sánchez G, Bordicchia M, Malcangi G, Pocognoli A, Angel Morales-Segura M, et al. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result. *Eur J Pharmacol [Internet].* 2014;742:158–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.08.029>
35. Li X, Sun X, Zhang X, Mao Y, Ji Y, Shi L, et al. Enhanced Oxidative Damage and Nrf2 Downregulation Contribute to the Aggravation of Periodontitis by Diabetes Mellitus. Kouretas D, editor. *Oxid Med Cell Longev [Internet].* 2018;2018:9421019. Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/9421019>
36. Pecorelli A, Bocci V, Acquaviva A, Belmonte G, Gardi C, Virgili F, et al. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol [Internet].* 2013;267(1):30–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.12.001>
37. Re L, Rutledge DK, Erario A, Baeza-Noci J, Travagli V, Menendez S, et al. Correcting Misinformation about the Science and Practice of Evidence-Based, Safe and Effective Ozone Therapy. *J Emerg Med.* 2021;61(6):799–800.

38. Delgado-Roche L, Riera-Romo M, Mesta F, Hernández-Matos Y, Barrios JM, Martínez-Sánchez G, et al. Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2017;811(June):148–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.06.017>
39. Hahn GF, Oliveira JR De, Bock PM. O papel do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (nrf2) no diabetes mellitus. *Clin Biomed Res* [Internet]. 2017;2:203–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.4322/2357-9730.73884>
40. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):1–10.
41. Feng W, Liu H, Luo T, Liu D, Du J, Sun J, et al. Combination of IL-6 and sIL-6R differentially regulate varying levels of RANKL-induced osteoclastogenesis through NF-κB, ERK and JNK signaling pathways. *Sci Rep*. 2017;7(August 2016):1–11.
42. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res* [Internet]. 2011;21(1):103–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2010.178>
43. Kunnumakkara AB, Shabnam B, Girisa S, Harsha C, Banik K, Devi TB, et al. Inflammation, nf-kb, and chronic diseases: How are they linked? *Crit Rev Immunol*. 2020;40(1):1–39.
44. Huth KC, Saugel B, Jakob FM, Cappello C, Quirling M, Paschos E, et al. Effect of aqueous ozone on the NFKB system. *J Dent Res*. 2007;86(5):451–6.
45. Zeng J, Lei L, Zeng Q, Yao Y, Wu Y, Li Q, et al. Ozone therapy attenuates NF-KB-mediated local inflammatory response and activation of th17 cells in treatment for psoriasis. *Int J Biol Sci*. 2020;16(11):1833–45.
46. Motahari P, Solmaz Pourzare Mehrbani, Jabbarvand H. Evaluation of Salivary Level of Heat Shock Protein 70 in Patients with Chronic Periodontitis. *J Dent*

- Shiraz Univ Med Sci. 2021;22(3):175–9.
47. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, Theriault JR. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3689–94.
 48. Fábíán TK, Fejérdy P, Nguyen MT, Sőti C, Csermely P. Potential immunological functions of salivary Hsp70 in mucosal and periodontal defense mechanisms. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007;55(2):91–8.
 49. Tsybikov NN, Baranov S V, Kuznik BI, Malezhik LP, Isakova N V. [Serum, oral and gingival fluid levels of heat shock protein-70, cytokines and their autoantibodies by periodontal disease]. *Stomatologia.* 2014;93(1):16–8.
 50. Takai H, Furuse N, Ogata Y. Anti-heat shock protein 70 levels in gingival crevicular fluid of japanese patients with chronic periodontitis. *J Oral Sci.* 2020;62(3):281–4.
 51. Sims TJ, Ake-Lernmark, Mancl LA, Schifferle RE, Page RC, Persson GR. Serum IgG to heat shock proteins and *Porphyromonas gingivalis* antigens in diabetic patients with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002;29(6):551–62.
 52. Bocci V, Aldinucci C, Mosci F, Carraro F, Valacchi G. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators Inflamm.* 2007;2007.
 53. Costanzo M, Cisterna B, Vella A, Cestari T, Covi V, Tabaracci G, et al. Low ozone concentrations stimulate cytoskeletal organization, mitochondrial activity and nuclear transcription. *Eur J Histochem [Internet].* 2015 Apr 21;59(2):129–36. Available from: <https://www.ejh.it/index.php/ejh/article/view/2515>
 54. Yu S, Guo H, Luo Y, Chen H. Ozone protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury: Regulating the heat shock protein 70 (HSP70) expression through activating the JAK2/STAT3 Pathway. *Bioengineered [Internet].* 2021;12(1):6606–16. Available from: <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1974760>

55. Tao Z, Zutai Jiang, Li L, Lanlan Wang, Li L, Weixin Zhong, et al. Ozone-oxidative-preconditioning alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via PKC-ERK1/2 pathway. :1–5. Available from: <https://www.researchsquare.com/article/rs-18929/v1>
56. Catrina SB, Zheng X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. *Diabetologia*. 2021;64(4):709–16.
57. Bayer Alinca S, Sağlam E, Zengin Celik T, Hacisalihoglu P, Doğan MA. Is low level laser therapy or ozone therapy more effective for bone healing? Understanding the mechanisms of HIF-1 α , RANKL and OPG. *Biotech Histochem* [Internet]. 2020;95(8):597–604. Available from: <https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1743360>
58. Afacan B, Öztürk VÖ, Paşalı Ç, Bozkurt E, Köse T, Emingil G. Gingival crevicular fluid and salivary HIF-1 α , VEGF, and TNF- α levels in periodontal health and disease. *J Periodontol*. 2019;90(7):788–97.
59. Sağlam 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;28:1–8.
60. Yasuhiro Imamura YM, Isao Tamura KM. The Effect of Ozone on Collagen Type-1 and Inflammatory Cytokine Production in Human Gingival Fibroblasts. *Dentistry* [Internet]. 2015;5(10). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/the-effect-of-ozone-on-collagen-type1-and-inflammatory-cytokine-production-in-human-gingival-fibroblasts-2161-1122-1000339.php?aid=60499>
61. Leewananthawet A, Arakawa S, Okano T, Daitoku Kinoshita R, Ashida H, Izumi Y, et al. Ozone ultrafine bubble water induces the cellular signaling involved in oxidative stress responses in human periodontal ligament fibroblasts. *Sci Technol Adv Mater* [Internet]. 2019;20(1):589–98. Available from: <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1614980>

62. Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F, Xiao Y. RANKL expression in periodontal disease: Where does RANKL Come from? *Biomed Res Int.* 2014;2014.
63. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediators Inflamm.* 2000;9(6):271–6.
64. Tsukasaki M. RANKL and osteoimmunology in periodontitis. *J Bone Miner Metab* [Internet]. 2021;39(1):82–90. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01165-3>
65. Vieira Ribeiro F, de Mendonça AC, Santos VR, Bastos MF, Figueiredo LC, Duarte PM. Cytokines and Bone-Related Factors in Systemically Healthy Patients With Chronic Periodontitis and Patients With Type 2 Diabetes and Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* 2011;82(8):1187–96.
66. Santos VR, Lima JA, Gonçalves TED, Bastos MF, Figueiredo LC, Shibli JA, et al. Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand/Osteoprotegerin Ratio in Sites of Chronic Periodontitis of Subjects With Poorly and Well-Controlled Type 2 Diabetes. *J Periodontol.* 2010;81(10):1455–65.
67. Wara-aswapati N, Surarit R, Chayasodom A, Boch JA, Pitiphat W. RANKL Upregulation Associated With Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* . *J Periodontol.* 2007;78(6):1062–9.
68. Zhang L, Li X, Yan H, Huang L. Salivary matrix metalloproteinase (MMP)-8 as a biomarker for periodontitis. *Med (United States).* 2018;97(3):1–6.
69. Skurska A, Pietruska M, Paniczko-Dręzek A, Dolińska E, Zelazowska-Rutkowska B, Zak J, et al. Evaluation of the influence of ozonotherapy on the clinical parameters and MMP levels in patients with chronic and aggressive periodontitis. *Adv Med Sci.* 2010;55(2):297–307.
70. Nardi GM, Cesarano F, Papa G, Chiavistelli L, Ardan R, Jedlinski M, et al. Evaluation of salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) in periodontal patients

- undergoing non-surgical periodontal therapy and mouthwash based on ozonated olive oil: A randomized clinical trial. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(18):1–10.
71. Balci Yuce H, Karatas, Tulu F, Altan A, Gevrek F. Effect of diabetes on collagen metabolism and hypoxia in human gingival tissue: a stereological, histopathological, and immunohistochemical study. *Biotech Histochem* [Internet]. 2019;94(1):65–73. Available from: <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1508745>
72. Rathnayake N, Åkerman S, Klinge B, Lundegren N, Jansson H, Tryselius Y, et al. Salivary Biomarkers for Detection of Systemic Diseases. *PLoS One*. 2013;8(4).

CAPÍTULO 3 - OZONIOTERAPIA ADJUVANTE AO TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2: RELATO DE CASOS

RESUMO

Introdução: Considerando o importante papel da resposta inflamatória do hospedeiro na patogênese da periodontite associada ao DM, diferentes tratamentos moduladores dessa resposta têm sido propostos como adjuvantes ao TPNC. Nesse sentido, a ozonioterapia, por seu efeito antimicrobiano e imunomodulador, pode ser uma importante ferramenta, com potenciais efeitos locais e sistêmicos.

Tratamento: A proposta desse relato de série de casos foi utilizar um protocolo nunca antes testado, que reúne as três formas de uso do ozônio (água, gás e óleo), aplicadas em cinco sessões adjuvante ao TPNC em indivíduos com DM2. O tratamento combinado foi testado em sete indivíduos. Parâmetros periodontais (IPV, SS, PS e NIC) e sistêmicos (CRP e HbA1c) foram avaliados.

Conclusão: O protocolo sugerido apresentou melhores resultados, tanto nos parâmetros periodontais como sistêmicos, quando comparado a estudos anteriores que avaliaram o TPNC como monoterapia. O protocolo sugerido deve ser replicado em futuros ensaios clínicos com maior amostragem, para confirmar a eficácia da ozonioterapia como aliada ao tratamento da periodontite associada ao DM2.

Palavras-chave: ozônio, periodontite, diabetes mellitus tipo 2, tratamento periodontal não-cirúrgico, relato de casos

ABSTRACT

Introduction: Considering the important role of the host inflammatory response in the pathogenesis of diabetes associated to periodontitis, different treatments that modulate this response have been proposed as adjuncts to non-surgical periodontal therapy. Due to antimicrobial and immunomodulatory effect of ozone therapy, it can be an important tool, with potential local and systemic effects.

Treatment: The purpose of this case series was to use a never-before-tested protocol, which brings together the three forms of ozone use (water, gas and oil), applied in five adjuvant sessions to NCPT in individuals with DM2. The combined treatment was tested in seven subjects. Periodontal (visual plaque index, bleeding on probing, depth on probing and clinical attachment level) and systemic (C-reactive protein and glycated hemoglobin) parameters were evaluated.

Conclusion: The suggested protocol showed better results, both in periodontal and systemic parameters, when compared to previous studies that evaluated NCPT as monotherapy. The suggested protocol should be replicated in future clinical trials with

a larger sample, to confirm the effectiveness of ozone therapy as an ally in the treatment of periodontitis associated with type 2 diabetes mellitus.

Keywords: ozone, periodontitis, type 2 diabetes mellitus, non-surgical periodontal treatment, case reports.

3.1 INTRODUÇÃO

O TPNC é a base para tratar as doenças periodontais, consiste na remoção mecânica e redução microbiana das superfícies do dente [1]. Porém, quando essa doença bucal está associada a alterações sistêmicas, como o DM, os resultados do TPNC podem ser afetados [2]. Embora a periodontite esteja associada a uma microbiota disbiótica, o principal determinante do dano tecidual é a resposta imune inflamatória do hospedeiro ao desafio microbiano [3]. Nesse sentido, a combinação do debridamento mecânico com estratégias que modulam os aspectos destrutivos da resposta inflamatória do hospedeiro tem sido proposta para se alcançar melhores resultados clínicos [4].

O ozônio é um oxidante poderoso com atividade antimicrobiana e capacidade de agir como um modulador imunológico e metabólico do hospedeiro [5]. Seu mecanismo de ação é baseado na produção de radicais livres que levam a um estresse oxidativo agudo, mas controlado, nas células humanas, resultando na modulação da resposta antioxidante e do metabolismo do oxigênio e energia celular, o que promove respostas biológicas positivas [6]. Essas características representam uma abordagem muito interessante no tratamento da periodontite associada ao DM, entretanto, apenas dois estudos avaliaram seus efeitos [7,8]. São necessários mais ensaios clínicos bem delineados para a melhor compreensão do papel do ozônio no tratamento dessa doença combinada. Sendo assim, o objetivo desse relato de casos foi propor um protocolo ainda não testado, unindo as três formas de aplicação do ozônio adjuvantes ao TPNC para ser replicado e confirmado em futuros estudos.

3.2 Metodologia

Esse relato de casos foi composto por 7 indivíduos portadores de DM2, 2 homens e 5 mulheres, com idades entre 54 e 64 anos (idade média - 58 anos). Os participantes do estudo deveriam apresentar diagnóstico de periodontite Estágio III ou

IV segundo a classificação das doenças e condições periodontais e peri-implantares de 2018 (perda de inserção interproximal de 5 mm ou mais no pior sítio ou perda óssea radiográfica se estendendo à metade ou ao terço apical da raiz) [9]; ter no mínimo 12 dentes remanescentes e pelo menos 6 sítios com PS e CAL \geq 5mm com SS; pelo menos um sítio com PS e CAL \geq 6mm; DM2 diagnosticado há mais de 2 anos e HbA1c \geq 6,5%. Foram excluídos tabagistas (o indivíduo foi considerado não fumante se tivesse parado de fumar há mais de cinco anos), gestantes, lactantes, pacientes que realizaram tratamento periodontal há menos de 6 meses; que utilizaram medicamentos antimicrobianos ou imunomoduladores nos últimos 3 meses; que apresentaram alterações sistêmicas (além do DM2) que interfiram na condição periodontal, como HIV, desordens imunológicas, obesidade mórbida (IMC \geq 40) ou baixo peso (IMC \leq 18,5).

O estudo foi realizado de janeiro a setembro de 2022, teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília (UnB): CAAE: 51018821.2.0000.0030 e seguiu as diretrizes do CARE (CASe REport) [10]. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes do tratamento. Os pacientes foram questionados, antes do tratamento e a cada consulta de acompanhamento, sobre as estratégias de controle do diabetes, como medicações (tipo, dose e posologia), dieta, prática e frequência de exercícios físicos. Eventos adversos e tolerabilidade ao tratamento também foram investigados a cada consulta.

Foram avaliados IPV (índice de placa visível), SS, PS e NIC de 6 sítios por dente (vestibular, méso-vestibular, disto-vestibular, lingual, méso-lingual e disto-lingual) com o auxílio de uma sonda periodontal Carolina do Norte (HU-FRIEDY). O exame clínico periodontal foi realizado antes, 30 e 90 dias após o tratamento.

As radiografias periapicais e interproximais foram realizadas antes do tratamento na clínica radiológica FENELON, que adotou todas as medidas de biossegurança (uso de luvas, gorros, máscaras e aventais, material esterilizado ou descartável, etc) exigidas para o atendimento odontológico bem como a utilização de medidas de radioproteção (filmes sensíveis, aventais de chumbo nos pacientes e biombo de chumbo para proteção dos pesquisadores) que minimizam os efeitos adversos oriundos da utilização de radiação ionizante para fins de diagnóstico.

Para a realização da análise microbiológica, foram coletadas amostras dos 4 sítios com maiores valores de PS. Após raspagem supragengival, secagem e isolamento relativo da área com gaze, a placa subgengival foi coletada com um único movimentoápico-coronário utilizando curetas mini-five (hu-friedy). A cureta foi agitada fortemente em um tubo de eppendorff contendo 150ul de RNA later. As amostras foram armazenadas em freezer a -80 até serem avaliadas.

Até este momento, foram avaliadas apenas as amostras de dois pacientes em diferentes tempos. A técnica utilizada foi PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real, com o kit ParodontoScreen da DNA-TECHNOLOGY (Moscou, Rússia) e o termociclador da mesma marca (Figura 5), que quantificou os principais patógenos periodontais, dos complexos vermelho (*P. gingivalis*, *T. denticola* *T. forsythia*) e laranja (*P. intermedia*) proposto por Socransky [13]. Além de *Candida Albicans* e *A. actinomycetecomitans*, que não foram detectadas nas amostras avaliadas.

Exames laboratoriais, hemograma completo, HbA1c e CRP, foram realizados antes, 30 e 90 após o tratamento no laboratório SABIN de medicina diagnóstica.

3.3 INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA

A TPNC foi realizada em 3 sessões, uma sessão a cada 3 ou 4 dias. Na primeira sessão foi realizada aplicação de evidenciador de placa (ANGELUS), instrução de higiene bucal, controle de placa (com taças de borracha e pasta profilática), além de raspagem supra gengival com ultra-som, curetas McCall 13-14/17-18 e cureta Finlândia WS 14/15 (MILLENNIUM). Os pacientes receberam uma escova (SENSODYNE limpeza profunda) e foram orientados quanto à técnica de escovação (stillman modificada) e uso de fio dental. Os pacientes com indicação de uso de escova interdental (presença de espaços interproximais aumentados e próteses) receberam escova interdental (ORAL-B). As instruções de higiene foram reforçadas a cada sessão do tratamento. Na segunda e terceira sessões foram realizadas respectivamente, raspagem subgengival superior e inferior dos sítios com PS \geq a 5 mm, realizadas sob anestesia local, utilizando curetas Gracey 5/6, 11/12 e 13/14 (HU-FRIEDY) e curetas mini-five de mesma numeração (HU-FRIEDY) para bolsas estreitas e profundas.

Utilizando o gerador de ozônio (PHILOZON MEDPLUS MX - registro Anvisa 80472910001) (Figura 1), a ozonioterapia foi realizada em 5 sessões (2 a 3 vezes por semana). O ozônio foi utilizado nas suas 3 formas de aplicação, água (Figura 2), gás (Figura 3) e óleo (Figura 4). A água foi gerada na coluna de vidro (Figura 1) para ozonização (PHILOZON), conectada ao gerador de ozônio calibrado para 60 µg/ml por 5 minutos, atingindo uma concentração final de 12 µg/ml.

Durante todo o procedimento do TPNC foi utilizada irrigação com água ozonizada em substituição à água da seringa tríplex para lavagem de debris. Após a raspagem e utilizando ponta de irrigação endodôntica, foram aplicados 20ml de água ozonizada nas bolsas com PS \geq 5 mm, em seguida 20 ml de gás ozonizado (30 µg/ml) e para finalizar, óleo ozonizado (600 meq/kg). O gás e o óleo também foram aplicados em toda a extensão da bolsa periodontal com uma agulha romba. A aplicação do gás foi realizada com o aspirador posicionado junto à ponta de aplicação para evitar ser aspirado pelo paciente.

O exame clínico periodontal, o TPNC e ozonioterapia foram conduzidos por apenas um operador experiente, especialista em periodontia (EGA).



Figura 1 Gerador de ozônio e coluna de água.



Figura 4 Aplicação de óleo ozonizado.



Figura 2- Aplicação de água ozonizada.



Figura 3 Aplicação de ozônio gasoso.

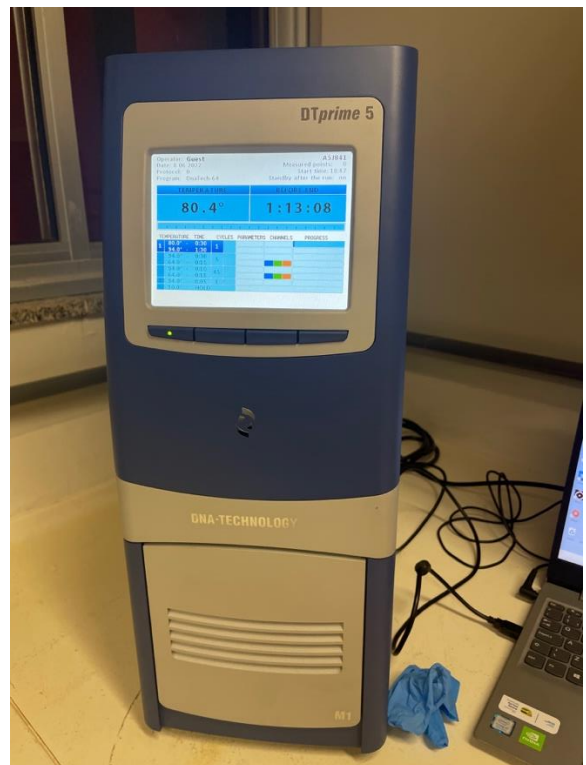


Figura 5 Termocilador DNA- TECNOLOGY

3.4 ACOMPANHAMENTO E RESULTADOS

Todos os 7 pacientes foram acompanhados 30 dias após o tratamento. Desses, 6 também foram avaliados após 90 dias, 1 ainda não completou 90 dias do tratamento, ele será avaliado em outubro/2022.

Os participantes aderiram e colaboraram com o tratamento, apresentando melhora da higienização, evidenciada pelo IPV. Todos os exames laboratoriais foram realizados no mesmo laboratório e nos exatos momentos solicitados.

Não foram relatados eventos adversos, mas 3 pacientes, ao serem questionados sobre a tolerabilidade do tratamento, se queixaram de sensibilidade dentinária no momento da aplicação da água ozonizada. Seguindo a orientação do fabricante do gerador de ozônio (PHILOZON) e da “Declaração de Madrid sobre terapia de ozônio” [11], a água bidestilada a ser ozonizada foi mantida em baixas temperaturas (entre 8 e 10 graus) para manter as propriedades do ozônio após ozonização. Talvez isso não seja necessário se a água for utilizada imediatamente após a ozonização, como foi o caso.

3.4.1 Resultados clínicos e bioquímicos

A Tabela 1 apresenta os parâmetros periodontais (média total e média dos sítios com PS inicial ≥ 5 mm), CRP (mg/L) e HbA1c (%), que foram registrados no início do tratamento (7 pacientes), 30 dias após (7 pacientes) e 90 dias após (6 pacientes).

Todos os pacientes apresentaram melhora nos parâmetros periodontais em todas as avaliações. Dos 7, apenas 2 pacientes ainda não atingiram o endpoint do tratamento (≤ 4 bolsas com PS ≥ 5 mm) [12] após 90 dias. Isso pode ser justificado pela presença de lesões de furca e/ou terceiros molares mal posicionados, situações que necessitam de tratamento cirúrgico adicional.

Tabela 1 Média dos parâmetros periodontais, bioquímicos e resultado após 30 e 90 dias.

	Início (7 pacientes)	Dia 30 (7 pacientes)	Dia 90 (6 pacientes)	Resultado 30 dias	Resultado 90 dias
Número sítios ≥ 5mm	14,71	6,29	5,00	-57,28%	-63,92%
IP total	54,86%	15,86%	11,00%	-71,09%	-75,48%
IP sítios ≥5mm no início	73,96%	30,81%	21,45%	-58,33%	-64,05%
SS	50,00%	9,29%	7,67%	-81,43%	-82,23%
SS sítios ≥5mm no início	91,40%	31,29%	9,67%	-65,77%	-87,46%
PS média total	3,34	2,69	2,68	-0,66	-0,29
PS média sítios ≥5mm no início	5,94	4,23	3,92	-1,71	-1,31
NIC média total	3,56	3,01	3,00	-0,54	-0,14
NIC média sítios ≥5mm no início	6,31	4,77	4,23	-1,55	-1,04
CRP	6,48	3,14	2,93	-9,61	-3,41
HbA1c %	10,47	10,40	9,37	-0,07	-0,65

3.4.2 Resultado do piloto microbiológico

Como apresentado na Tabela 2, houve redução considerável na quantidade de periodontopatógenos 30 dias após o tratamento (sítio 1); o sítio onde foi reavaliado 90 dias após (sítio 2), notamos redução mais modesta; enquanto no terceiro sítio, comparando amostras 30 dias e 90 dias após o tratamento, notamos ligeiro aumento na quantidade de patógenos periodontais.

Tabela 2 Resultado microbiológico paciente 1

	Inicial	30 dias
<i>P. gingivalis</i>	1,6	0
<i>P. intermedia</i>	6,6	4,7
<i>T. forsythia</i>	7,4	1,5
<i>T. denticola</i>	7,9	5,3
Dados clínicos (PS, SS)	5mm SS+	5mm SS+

Tabela 3 Resultado microbiológico paciente 2

	Sítio 1		Sítio 2	
	Inicial	90 dias	30 dias	90 dias
<i>P. gingivalis</i>	0	2,6	4,0	5,0
<i>P. intermedia</i>	6,3	5,1	3,7	4,2
<i>T. forsythia</i>	7,3	6,3	4,0	4,2
<i>T. denticola</i>	7,3	6,1	3,1	4,1
Dados clínicos (PS, SS)	6 mm, SS+	6 mm, SS-	5 mm SS+	3 mm SS-

3.5 DISCUSSÃO

O protocolo de ozonioterapia sugerido nesse estudo se baseou em achados de estudos anteriores. Os dois únicos trabalhos que avaliaram a ozonioterapia juntamente com TPNC de pacientes com periodontite associada ao DM, mostraram resultados clínicos satisfatórios, mas sem significância estatística nos parâmetros clínicos e na HbA1c quando comparado ao TPNC como monoterapia. Delvecchio e colaboradores [14] utilizaram 3 aplicações (uma a cada dois dias) de ozônio nas formas água e gás, enquanto Marconcini e colaboradores [8] testaram o uso doméstico de um dispositivo de entrega de ozônio gás domiciliar duas vezes ao dia. No intuito de otimizar a ação do ozônio, o protocolo desse estudo propõe mais aplicações (5 sessões) e inclui a aplicação do óleo ozonizado, que foi apontado como sendo capaz de reduzir o nível de MMP-8 [15].

Nenhum dos estudos supracitados avaliou o efeito do ozônio sobre marcadores inflamatórios, como a CRP, que é um reagente de fase aguda produzida pelo fígado em resposta a citocinas pró-inflamatórias, especialmente a IL-6. A CRP é um marcador inflamatório preditor independente de doenças cardiovasculares e seu nível está associado a maior risco de mortalidade em adultos com DM [16].

Estudos randomizados de longa duração avaliando tratamento periodontal e marcadores inflamatórios em indivíduos com DM são escassos. Isso pode estar relacionado à dificuldade em recrutar pacientes que preencham os critérios de inclusão; necessidade de manter as medicações durante o período de acompanhamento e necessidade de controle de índice de massa corporal (IMC) [17].

Duas meta-análises avaliaram o efeito do TPNC nos níveis de CRP em pacientes com DM e apontaram redução de 1,28.mg/L [17] e 1,89mg/L [18]. Esses resultados são inferiores ao obtido nesse presente estudo, que mostrou redução média de 3,41 mg/L após 90 dias, suportando a hipótese de que o efeito anti-inflamatório o ozônio pode potencializar a diminuição de marcadores inflamatórios séricos.

Em relação ao impacto do TPNC aliado à ozonioterapia sobre a HbA1c, houve uma diminuição média de 0,65 pontos percentuais, resultado ligeiramente superior ou

semelhante a algumas meta-análises que avaliaram o TPNC como monoterapia [8,15,18–21]. Esses estudos mostraram uma diminuição de HbA1c que variou de 0,29 a 0,65 pontos percentuais. Seria interessante que em estudos com amostra maior, a avaliação da HbA1c fosse realizada por subgrupos, considerando os diferentes estágios ou gravidade da periodontite e do DM.

No piloto microbiológico, foi observado um aumento dos microorganismos entre os dias 30 e 90 após o tratamento. Essa observação sugere a hipótese de efeito antimicrobiano imediato do ozônio não se manter ao longo do tempo no ambiente subgingival. O que é corroborado pela instabilidade característica da molécula de ozônio e pela resiliência do microbioma bucal. O termo resiliência é a capacidade de um sistema resistir a mudanças, uma comunidade microbiana associada à doença exibe dificuldade em retornar a uma microbiota associada à saúde [22]. Apesar disso, os resultados clínicos seguiram apresentando melhora, possivelmente pela capacidade bioestimuladora do ozônio. Sendo assim, do ponto de vista microbiano, é possível que melhores resultados sejam obtidos com a continuidade de aplicação em determinados intervalos de tempo, como um coadjuvante da terapia periodontal de suporte.

Quando comparamos nossos resultados clínicos aos de um estudo que avaliou o efeito de antibióticos (amoxicilina e metronidazol) associados ao TPNC em pacientes DM2 [23], notamos que os resultados do grupo controle desse estudo (sem antibiótico) foram inferiores aos nossos resultados obtidos com ozônio adjuvante, mas inferiores ao grupo teste (com antibiótico). Não existe nenhum trabalho que compare diretamente antibióticos e ozonioterapia adjuvantes ao TPNC. Essa comparação seria muito interessante pois ainda que os resultados da ozonioterapia sejam semelhantes ou ligeiramente inferiores ao uso de antibióticos, considerando os efeitos adversos dos antibióticos, principalmente em relação ao risco de resistência microbiana [24], a ozonioterapia pode ser uma alternativa válida.

3.6 CONCLUSÕES

Os resultados positivos obtidos nesse estudo piloto sugerem que o protocolo de ozonioterapia proposto, 5 sessões (uma a cada 3 ou 4 dias), utilizando as três

formas de aplicação do ozônio (água, gás e óleo), pode ser adequado para ser replicado em futuros estudos com objetivo de confirmar a eficácia da ozonioterapia adjuvante à terapia periodontal em pacientes com DM2.

3.7 REFERÊNCIAS

1. Krishna R, De Stefano JA. Ultrasonic vs. hand instrumentation in periodontal therapy: Clinical outcomes. *Periodontol 2000*. 2016;71(1):113–27.
2. Paper P. Position Paper Guidelines for Periodontal Therapy. *J Periodontol* [Internet]. 2001 Nov;72(11):1624–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1902/jop.2001.72.11.1624>
3. Donos N, Calciolari E, Brusselaers N, Goldoni M, Bostanci N, Belibasakis GN. The adjunctive use of host modulators in non-surgical periodontal therapy. A systematic review of randomized, placebo-controlled clinical studies. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2020 Jul 27;47(S22):199–238. Available from: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L635292069&from=export>
4. Balta MG, Papathanasiou E, Blix IJ, Van Dyke TE. Host Modulation and Treatment of Periodontal Disease. *J Dent Res* [Internet]. 2021 Jul 3;100(8):798–809. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034521995157>
5. Deepthi R, Bilichodmath S. Ozone therapy in periodontics: A meta-analysis. *Contemp Clin Dent* [Internet]. 2020;11(2):108–15. Available from: <http://www.contempclindent.org/text.asp?2020/11/2/108/291577>
6. Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(5):435–40.
7. Delvecchio BR; EF; MC; IC; FRG; LS; ST; AG; SS; AS; M. The Effect of Gaseous Ozone Therapy in Conjunction with Periodontal Treatment on Glycated

- Hemoglobin Level in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Environ Res Public Heal* Vol 17, Iss 5467, p [Internet]. 2020;5467. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijerph17155467>
8. Marconcini Enrica ; Cosola, Saverio ; Oldoini, Giacomo ; Genovesi, Annamaria ; Covani, Ugo S; G. Effects of Non-Surgical Periodontal Treatment on Reactive Oxygen Metabolites and Glycemic Control in Diabetic Patients with Chronic Periodontitis. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2021;10(7). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34208802>
 9. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* [Internet]. 2018 Jun;89:S173–82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/JPER.17-0721>
 10. Gagnier JJ, Kienle G, Altman DG, Moher D, Sox H, Riley D, et al. The CARE guidelines: Consensus-based clinical case reporting guideline development. *BMJ Case Rep*. 2013;2(5):38–43.
 11. International Scientific Committee of Ozone Therapy. MADRID DECLARATION ON OZONE THERAPY. 2020 p. 1–104.
 12. Feres M, Retamal-Valdes B, Favari M, Duarte P, Shibli J, Soares GMS, et al. Proposal of a Clinical Endpoint for Periodontal Trials: The Treat-to-Target Approach. *J Int Acad Periodontol* [Internet]. 2020;22(2):41–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32224549>
 13. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134–44.
 14. Delvecchio BR; EF; MC; IC; FRG; LS; ST; AG; SS; AS; M, Rapone Elisabetta ; Corsalini, Massimo ; Converti, Ilaria ; Grassi, Felice Roberto ; Santacroce, Luigi ; Topi, Skender ; Gnoni, Antonio ; Scacco, Salvatore ; Scarano, Antonio ; Delvecchio, Maurizio B; F. The Effect of Gaseous Ozone Therapy in Conjunction

- with Periodontal Treatment on Glycated Hemoglobin Level in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus: An Unmasked Randomized Controlled Trial. *Int J Environ Res Public Heal* Vol 17, Iss 5467, p [Internet]. 2020;5467(15). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32751340>
15. Nardi GM, Cesarano F, Papa G, Chiavistelli L, Ardan R, Jedlinski M, et al. Evaluation of salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) in periodontal patients undergoing non-surgical periodontal therapy and mouthwash based on ozonated olive oil: A randomized clinical trial. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(18):1–10.
 16. Akinboboye O, Williams JS, Garacci E, Egede LE. The relationship between C-Reactive protein and mortality in adults with diabetes: Influences of demographic characteristics, lifestyle behaviors, and medications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2022;32(1):176–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2021.09.022>
 17. Artese HPC, Foz AM, Rabelo MDS, Gomes GH, Orlandi M, Suvan J, et al. Periodontal therapy and systemic inflammation in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(5):1–14.
 18. Baeza M, Morales A, Cisterna C, Cavalla F, Jara G, Isamitt Y, et al. Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci*. 2020;28:e20190248.
 19. Simpson TC, Weldon JC, Worthington H V, Needleman I, Wild SH, Moles DR, et al. Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2015 Nov 6;2018(3). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD004714.pub3>
 20. Sgolastra F, Severino M, Pietropaoli D, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of Periodontal Treatment to Improve Metabolic Control in Patients With Chronic Periodontitis and Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *J Periodontol*. 2013;84(7):958–73.

21. Engebretson S, Kocher T. Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2013;40(SUPPL. 14).
22. Wade WG. Resilience of the oral microbiome. Vol. 86, *Periodontology* 2000. 2021. p. 113–22.
23. Miranda TS, Feres M, Perez-Chaparro PJ, Faveri M, Figueiredo LC, Tamashiro NS, et al. Metronidazole and amoxicillin as adjuncts to scaling and root planing for the treatment of type 2 diabetic subjects with periodontitis: 1-year outcomes of a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2014;41(9):890–9.
24. Pretzl B, Sälzer S, Ehmke B, Schlagenhaut U, Dannewitz B, Dommisch H, et al. Administration of systemic antibiotics during non-surgical periodontal therapy—a consensus report. *Clin Oral Investig.* 2019;23(7):3073–85.
25. Cao R, Li Q, Wu Q, Yao M, Chen Y, Zhou H. Effect of non-surgical periodontal therapy on glycemic control of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and Bayesian network meta-analysis. *BMC Oral Health* [Internet]. 2019 Dec 6;19(1):176. Available from: <https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12903-019-0829-y>

CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

4.1 DISCUSSÃO GERAL

Atualmente estima-se que 537 milhões de adultos com idade entre 20 e 79 anos em todo o mundo (10,5% de todos os adultos nessa faixa etária) tenham DM. Até 2030, 643 milhões, e até 2045, 783 milhões de adultos com idades entre 20 e 79 anos são projetados para viver com DM. Assim, enquanto se estima que a população mundial cresça 20% neste período, estima-se que o número de pessoas com DM aumente 46% [3]. Conseqüentemente, também está havendo o aumento da incidência de complicações dessa doença metabólica [4], entre elas, a periodontite.

O DM é um desafio para a clínica periodontal, pois além de representar maior risco e gravidade da periodontite [122], está associado a piores resultados da terapia periodontal e maior dificuldade de controle da saúde periodontal ao longo do tempo. É importante destacar que o cirurgião-dentista deve estar preparado para o manejo adequado desse paciente, que envolve a interação com o médico endocrinologista, conhecimento dos parâmetros de glicemia, compreensão dos agentes farmacológicos usados e capacidade de manejar eventos de hipoglicemia caso ocorram no consultório. Além disso, o paciente deve ser educado sobre as inter-relações entre a saúde periodontal e o controle glicêmico, com ênfase nos impactos sistêmicos da infecção periodontal [123].

A compreensão de que a resposta do hospedeiro é o principal determinante da doença periodontal em pacientes com DM é crucial para a condução clínica desses pacientes, que estarão cada dia mais presentes nos consultórios odontológicos. Nesses casos, a disbiose é resultado principalmente do estado hiperinflamatório do indivíduo [27]. Sendo assim, para o sucesso do tratamento e manutenção da saúde periodontal a longo prazo, é importante levar em consideração estratégias terapêuticas para otimizar a resposta inflamatória do hospedeiro.

Vale ressaltar que o efeito do tratamento periodontal sobre o controle glicêmico, mesmo que pequeno, pode representar um importante impacto sobre o risco de

eventos e complicações em pacientes com DM2. É sabido que uma redução de um por cento na HbA1c está associada a reduções de 14% no risco de infarto do miocárdio, 21% para mortes relacionadas ao diabetes e 37% para complicações microvasculares [124]. Dessa forma, todo o esforço para se potencializar essa diminuição é válida.

4.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora os avanços científicos das últimas décadas permitiram uma melhor compreensão dos efeitos benéficos do ozônio, os mecanismos envolvidos na sua ação sobre os tecidos periodontais alterados, sobretudo em pacientes com DM, ainda não foram elucidados. O presente estudo evidenciou os principais potenciais efeitos do ozônio que podem contribuir para homeostase óssea e tecidual além de benefícios relacionados à saúde geral. Por esses múltiplos efeitos, merece ser explorado em futuros estudos.

É importante que os novos ensaios clínicos apresentem tamanhos amostrais suficientes para que seja possível avaliar as diversas covariáveis confundidoras e modificadoras do resultado do tratamento periodontal. Outro ponto diz respeito a se buscar homogeneidade nos estudos, para que seja possível fazer comparações. Também deve-se levar em consideração o efeito da terapia nos diversos estágios da periodontite e do DM, como por exemplo, separando resultados em sítios com profundidade rasa, intermediária e profunda pois alterações médias de boca toda podem mascarar melhoras clínicas nessas regiões. Assim a amostra precisa ter um escopo que permita ser dividida em subgrupos, sem perder o poder dos estudos.

As tecnologias OMICS, como possibilidade de identificação e a caracterização de possíveis genes, proteínas e moléculas envolvidas na ação do ozônio nos tecidos periodontais de pacientes com DM, podem ser chaves para esclarecer o papel regulador do ozônio no microambiente imunológico periodontal e assim possibilitar o desenvolvimento de abordagens direcionadas e individualizadas, como preconizado pelo conceito atual de “odontologia personalizada”.

4.3 CONCLUSÕES

A partir da análise das evidências sobre a ozonioterapia, é possível concluir que, além do já comprovado efeito antimicrobiano, o ozônio tem diversas características biomoduladoras que podem ser de grande valor na terapia periodontal de pacientes com DM.

Os potenciais benefícios do ozônio que foram identificados e revisados por esse trabalho são: efeito antioxidante e anti-inflamatório, principalmente via Nrf2 e NFkB; efeito anti-hipóxico devido à ativação de processos aeróbicos e via modulação HIF-1- α ; além de contribuição para homeostase óssea e tecidual, pela diminuição de células RANK-L positivas e enzimas proteolíticas MMP-8.

No estudo clínico piloto aqui apresentado, o ozônio se mostrou efetivo no tratamento da periodontite associada ao DM, tendo um impacto positivo nos resultados clínicos periodontais e nos níveis de CRP e HbA1c, sugerindo que o ozônio quando utilizado no tratamento periodontal também pode contribuir para controle do DM. Além disso, há vantagens de ser uma terapia minimamente invasiva, econômica, bem tolerada pelos pacientes e sem o risco de provocar resistência bacteriana.

Os resultados apontam que o novo protocolo aqui proposto é adequado para ser reproduzido e testado em ensaios clínicos futuros, que são necessários para confirmar a capacidade do ozônio em ser um diferencial no tratamento da periodontite associada ao DM sob o ponto de vista local e geral, com conseqüentemente melhora da qualidade de vida desses pacientes.

CAPÍTULO 5 – PRESS RELEASE

A Periodontite é uma condição inflamatória caracterizada pela destruição do aparato de suporte do dente e que, se não tratada, pode levar à perda de dentes. A degradação periodontal é desencadeada pela placa bacteriana, mas sua progressão e gravidade é dependente de fatores hereditários, sistêmicos e ambientais. Por isso indivíduos com alterações imunoinflamatórias, como o DM, apresentam risco maior de desenvolver periodontite, que por outro lado dificulta a absorção de insulina, podendo causar uma descompensação glicêmica nos portadores de DM.

O tratamento da periodontite é baseado na remoção de cálculo (tártaro) e placa bacteriana por meio do procedimento de raspagem e alisamento da raiz do dente. Muitas vezes esse procedimento não é suficiente para se alcançar saúde periodontal, seja pela dificuldade na descontaminação completa do dente, seja pela resposta ineficiente do organismo em controlar a infecção periodontal. Sendo assim, alguns tratamentos adjuvantes são estudados para melhorar os resultados da terapia periodontal.

O ozônio é um gás que apresenta propriedades antimicrobianas e produz efeitos imunomoduladores, o pode representar uma ferramenta poderosa para pacientes com periodontite associada ao DM. Nesse sentido, após uma revisão da literatura sobre o potencial biomodolador do ozônio, principalmente seus efeitos antioxidante, anti-inflamatório e antihipóxico, foi proposto um protocolo novo de ozonioterapia adjuvante ao tratamento da periodontite associada ao DM. O protocolo foi testado em sete pacientes e os resultados obtidos foram superiores quando comparados a outros estudos que utilizaram apenas o tratamento periodontal convencional. A superioridade foi em relação aos parâmetros de saúde periodontal e saúde sistêmica (avaliada pelos exames de CRP e HbA1c).

Sedo assim, se confirmado por outros estudos, o protocolo de tratamento proposto nesse estudo poderá contribuir para a manutenção da saúde bucal e melhor controle do DM nesses pacientes.

ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DA OZONIOTERAPIA ADJUVANTE À TERAPIA PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICA NOS PARÂMETROS CLÍNICOS, MICROBIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE ASSOCIADA OU NÃO AO DIABETES MELLITUS TIPO 2 - ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO CONTROLADO

Pesquisador: ELISA GRILLO ARAUJO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51018821.2.0000.0030

Instituição Proponente: Departamento de Odontologia - Faculdade de Ciências da Saúde - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.947.595

Apresentação do Projeto:

Pelo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1772022.pdf", postado em 12/08/2021:

"Resumo:

A Periodontite (DP) é uma doença crônica multifatorial caracterizada por uma disbiose da microbiota oral e por eventos pró-inflamatórios envolvendo células e mediadores do sistema imune inato e adaptativo. O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de desordens sistêmicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante de defeito na secreção da insulina, na ação da insulina ou em ambos. A hiperglicemia crônica no diabetes está associada a alterações em vários órgãos e também está relacionada a maior risco e severidade de Periodontite. Há fortes evidências de uma associação bidirecional entre a DP e DM. Por um lado, o DM é um fator modificador da DP e por outro a DP é uma complicação do DM. A terapia não-cirúrgica de raspagem/alisamento radicular (RAR) é o tratamento "padrão ouro" da DP. Contudo a RAR pode não eliminar completamente bolsas residuais e bactérias periodontopatógenas, representando um fator de risco preditor de progressão de doença e aumento de perda de inserção. A ozonioterapia tem sido estudada como tratamento adjuvante à RAR, apresentando resultados conflitantes. Além dos efeitos locais da ozonioterapia, representados por melhores resultados da terapia periodontal, os pacientes com DM tipo 2 também podem se beneficiar dos potenciais efeitos sistêmicos da ozonioterapia. Esse

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade de Brasília

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa **O EFEITO DA OZONIOTERAPIA ADJUVANTE À TERAPIA PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICA NOS PARÂMETROS CLÍNICOS, MICROBIOLÓGICO E IMUNOLÓGICO EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE ASSOCIADA AO DIABETES MELLITUS TIPO 2**, sob a responsabilidade da pesquisadora **Elisa Grillo Araújo**.

O objetivo desta pesquisa é avaliar o efeito da ozonioterapia associada ao tratamento da periodontite (inflamação da gengiva) visando obter melhores resultados da tratamento periodontal e também possíveis efeitos sistêmicos, como melhora do controle do Diabetes.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação será se submeter ao tratamento periodontal não-cirúrgico, que é o procedimento de remoção de placa bacteriana e cálculo (tártaro), realizado por meio de raspagens e polimento do dente. Esta terapia será associada ou não à ozonioterapia, que é a aplicação do gás ozônio com potencial antimicrobiano e modulador do sistema imunológico.

O (a) senhor (a) poderá ser alocado (a) no grupo que será submetido ao tratamento não cirúrgico associado à ozonioterapia (grupo teste) ou no grupo que receberá apenas o tratamento padrão, ou seja, apenas o tratamento periodontal não-cirúrgico (grupo controle). A alocação será realizada por randomização, ou seja, cada paciente terá chances iguais de pertencer a um grupo ou outro.

No final da pesquisa, caso o grupo teste apresente melhores resultados, os pacientes do grupo controle terão acesso ao tratamento com ozonioterapia.

A pesquisa terá duração de aproximadamente 7 meses, com consultas semanais ou quinzenais nos três primeiros meses e mensais do terceiro ao sexto mês. O tratamento será realizado na clínica odontológica do HUB.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são:

- Complicações relacionadas à coleta de sangue. Para minimizar estes riscos, a coleta será realizada por profissionais habilitados e experientes, cumprindo as normas de higiene e utilizando dispositivos adequados ao procedimento.
- Anestesia: hematoma, dor, parestesia, aceleração batimento cardíaco, reações psicossomáticas e alérgicas. Para minimizar os riscos relacionados à anestesia, a injeção do anestésico será realizada de forma lenta evitando atingir nervos e vasos e serão utilizadas doses adequadas de anestésico de baixíssimo potencial alérgico (Cloridrato de Lidocaina 2%).
- Hipersensibilidade dentinária temporária após terapia de raspagem. Para minimizar esse risco será evitada a sobre instrumentação da superfície radicular. E caso ocorra, a equipe da pesquisará será responsável por tratamento com dessensibilizantes.
- Toxicidade relacionada ao ozônio: Se inalado, o gás ozônio pode ser causar irritação no trato respiratório superior e causar tosse, rinite, cefaléia. Esse risco será minimizado pois o gás será contido em seringa para aplicação local intrabuca. Além disso, o gás será usado em baixas concentrações e serão tomados os devidos cuidados no manuseio para não ser inalado.

Rubricas



Universidade de Brasília

Benefícios da sua participação são:

- Além do tratamento da inflamação da gengiva (periodontite), receber outros tratamentos conforme necessidade (tratamento de cárie, canal e mau-hálito).
- Melhora dos sinais clínicos da doença periodontal (sangramento e profundidade a sondagem).
- Diminuir progressão da doença periodontal.
- Evitar perda de dentes.
- Diminuir o número de periodontopatógenos (bactérias) na microbiota bucal.
- Possíveis efeitos sistêmicos do tratamento periodontal e da ozonioterapia, com redução do estresse oxidativo sistêmico e melhora do controle glicêmico.

O(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Caso necessite comparecer a sessões exclusivamente para a pesquisa, o (a) senhor(a) receberá ressarcimento do transporte.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, o(a) senhor(a) deverá buscar ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília - Unb, podendo ser publicados posteriormente em revistas ou periódicos odontológicos. Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: ELISA GRILLO ARAÚJO, 98424-7764 / 3711-1818, disponível inclusive para ligação a cobrar, ou email: elisagrillo@gmail.com

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3107-1947 ou do e-mail cepfs@unb.br ou cepfsunb@gmail.com, horário de atendimento de 10:00hs às 12:00hs e de 13:30hs às 15:30hs, de segunda a sexta-feira. O CEP/FS se localiza na Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o(a) Senhor(a).

Data: _____

Nome e assinatura do Participante de Pesquisa

Elisa Grillo Araújo

ANEXO C - RESULTADO COMPLETO DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA POR PCR

MS_13_0 Parodont

A2	Totall bacterial DNA IC	31.5 30.7	4.0 4.2	+
B2	Actinobacillus actinomycetemcomitans IC	- 31.5	- 4.0	-
C2	Porphyromorans gingivalis IC	39.4 31.0	1.6 4.1	+
D2	Prevotella intermedia IC	22.4 31.0	6.6 4.1	+
E2	Tannerella forsythensis IC Marker	20.0 30.9 ...	7.4 4.1 -	+
F2	Treponema denticola IC	18.3 30.9	7.9 4.1	+
G2	Candida albicans IC	- 31.0	- 4.1	-
H2	SIC IC	19.2 31.0	7.6 4.1	+

MS_13_30 Parodont

A3	Totall bacterial DNA IC	31.5 30.5	4.0 4.3	+
B3	Actinobacillus actinomycetemcomitans IC	- 31.3	- 4.0	-
C3	Porphyromorans gingivalis IC	- 31.0	- 4.1	-
D3	Prevotella intermedia IC	29.1 30.2	4.7 4.4	+
E3	Tannerella forsythensis IC Marker	39.8 31.5 ...	1.5 4.0 -	+
F3	Treponema denticola IC	26.9 29.4	5.3 4.6	+
G3	Candida albicans IC	- 31.2	- 4.1	-
H3	SIC IC	21.7 31.2	6.9 4.1	+

MS_28_0 Parodont

A4	Totall bacterial DNA IC	33.2 30.9	3.5 4.1	+
B4	Actinobacillus actinomycetemcomitans IC	- 30.8	- 4.2	-
C4	Porphyromorans gingivalis IC	- 31.0	- 4.1	-
D4	Prevotella intermedia IC	23.5 30.6	6.3 4.2	+
E4	Tannerella forsythensis IC Marker	20.3 30.9 ...	7.3 4.1 -	+
F4	Treponema denticola IC	20.3 31.6	7.3 3.9	+
G4	Candida albicans IC	- 31.2	- 4.1	-
H4	SIC IC	19.7 -	7.4 -	+

MS_28_90 Parodont

A5	Totall bacterial DNA IC	35.0 31.2	2.9 4.1	+
B5	Actinobacillus actinomycetemcomitans IC	- 30.9	- 4.1	-
C5	Porphyromorans gingivalis IC	36.3 31.2	2.6 4.1	+
D5	Prevotella intermedia IC	27.8 30.4	5.1 4.3	+
E5	Tannerella forsythensis IC Marker	23.5 30.6 ...	6.3 4.2 -	+
F5	Treponema denticola IC	24.1 30.3	6.1 4.3	+
G5	Candida albicans IC	- 31.3	- 4.0	-
H5	SIC IC	21.5 30.9	6.9 4.1	+

E_16_30 Parodont

A7	Totall bacterial DNA IC	34.6 31.5	3.1 4.0	+
B7	Actinobacillus actinomycetemcomitans IC	- 31.2	- 4.1	-
C7	Porphyromorans gingivalis IC	31.3 30.7	4.0 4.2	+
D7	Prevotella intermedia IC	32.3 31.1	3.7 4.1	+
E7	Tannerella forsythensis IC Marker	31.5 31.0 ...	4.0 4.1 -	+
F7	Treponema denticola IC	34.6 31.6	3.1 3.9	+
G7	Candida albicans IC	- 31.4	- 4.0	-
H7	SIC IC	24.9 30.8	5.9 4.2	+

E_16_90 Parodont

A8	Totall bacterial DNA IC	- 32.3	- 3.7	-
B8	Actinobacillus actinomycetemcomitans IC	- 32.3	- 3.7	-
C8	Porphyromorans gingivalis IC	28.1 -	5.0 -	+
D8	Prevotella intermedia IC	30.8 31.3	4.2 4.0	+
E8	Tannerella forsythensis IC Marker	30.7 32.0 ...	4.2 3.8 -	+
F8	Treponema denticola IC	31.1 31.3	4.1 4.0	+
G8	Candida albicans IC	- 33.1	- 3.5	-
H8	SIC IC	24.0 -	6.2 -	+