

*Leonardo Alan Delanora*

*Avaliação da Ozonioterapia no tratamento da  
Osteonecrose induzida por Zoledronato em ratas  
senis*

*Leonardo Alan Delanora*

*Avaliação da Ozonioterapia no tratamento da  
Osteonecrose induzida por Zoledronato em ratas  
senis*

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (Unesp), para obtenção do Grau de Mestre em Odontologia - Área de Concentração: *Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial*.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani  
Coorientador: Prof. Associado Edilson Ervolino

Araçatuba – SP  
2021

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

D337a Delanora, Leonardo Alan.  
Avaliação da ozonioterapia no tratamento da  
osteonecrose induzida por zoledronato em ratas senis /  
Leonardo Alan Delanora. . – Araçatuba, 2021  
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual  
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Leonardo Perez Faverani  
Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Osteonecrose 2. Ozônio 3. Antibioticoprofilaxia  
4. Difosfonatos I. T.

Black D7  
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

*Dedicatória*



*Dedico este trabalho...*

## *A minha família*

### *Aos meus pais*

Ao meu pai **Adair Sidnei**, que sempre me apoiou na minha construção como pessoa, como profissional e como um ser de bem. Que sempre fez questão de mostrar quais os princípios éticos a seguir e ser meu maior exemplo pra vida. Que me encheu a vida toda com os mais diversos conselhos, da melhor qualidade. Que sempre impulsionou os meus sonhos, mesmo que estes nos distanciasse fisicamente. Que sempre fez questão de me ligar e perguntar como eu estava, o que eu estava fazendo, e como iam as coisas. Aquele que nunca me deixou faltar nada. Meu muito obrigado.

A minha mãe **Rosalba**, que sempre escutou com atenção minhas preocupações. Que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou em todos os meus desafios. Que jamais deixou eu desistir daquilo que sempre quis, mas sempre manteve meus pés no chão. Que sempre foi um exemplo de perseverança e persistência e sempre foi meu maior exemplo. Por todo o carinho e amor que sempre estiveram presente. Meu muito obrigado.

### *Aos meus irmãos Bruno e Maria Fernanda*

**Bruno** o melhor irmão que alguém poderia pedir a Deus, que sempre me escutou, independente do assunto que fosse. Que cuidou e cuida de mim como um anjo da guarda. Que possui o coração mais puro que já conheci. Que faz questão de me contar como foi o dia dele, quais suas preocupações e assuntos que a gente precisa lidar. Só tenho agradecer a Deus por ter me abençoado com sua vida.

**Maria Fernanda** a minha antes pequena irmã que hoje em dia já é uma mulher crescida. Que cativa os outros com sua espontaneidade. Que a cada dia que passa apresenta uma evolução e uma maturidade gigantesca, a qual eu me orgulho demais. Agradeço por todos os momentos de confissão, de companherismo, de partilha, amor e carinho.

### *A minha namorada Nathália*

Meu **Amor** palavras não conseguem expressar a gratidão que eu tenho por ter você em minha vida. Que sempre me apoiou e acreditou em mim em todos os momentos, independente da situação. Que sempre foi o sorriso mais lindo, único capaz de transformar um dia péssimo e cansativo em um momento de alegria e paz. Que cativa com seu jeito de ser, com seus princípios jamais abalados, com sua inteligência extraordinária, e pelas suas infinitas outras qualidades. Que se preocupa comigo como ninguém e faz o possível e impossível para o nosso bem. Que continuemos sendo um o apoio do outro, fundamentados no respeito e no amor. Por todo amor e carinho, amo você.

# *Agradecimentos*



## *Agradecimentos Especiais*

### *A Deus*

Obrigado senhor por absolutamente tudo. Por jamais me abandonar em hora alguma. Por sempre me dar forças nas horas mais difíceis. Por aliviar minhas angústias que não foram poucas. Por proteger a mim e a minha família de infinitos males. Por ser aquele a quem eu sempre recorro nos momentos de dificuldade e aquele a que eu agradeço nos momentos de fartura e felicidade. Obrigado pela minha saúde e de minha família. Que seja feita a Vossa vontade.

### *Ao meu orientador Leonardo Perez Faverani*

Professor, gostaria de agradecer pela pessoa que o senhor é, pelo cuidado, carinho e atenção que tens com todos nós, seus alunos e orientados. Suas infinitas virtudes o fazem único, sua sensibilidade para o com outro, sua bondade que esbanja. Seus princípios sempre intactos, fazem do senhor um grande exemplo. Sempre faço questão de chamá-lo de professor, por mais formal que seja, reflete minha admiração pelo senhor, pela sua capacidade de ensinar, de desejar o melhor para seus alunos, por ver o que cada um tem de melhor. Fico feliz em tê-lo também como um grande amigo.

### *Ao meu coorientador Edilson Ervolino*

Professor, gostaria de agradecer por todo apoio e ajuda principalmente na elaboração e realização desse trabalho. O senhor me orientou e guiou em muitas dúvidas que surgiram durante todo esse trajeto. Portador de um conhecimento absurdo e reconhecido por isso. Sinto muito orgulho de compartilhar esse momento com o senhor.

## *Aos meus amigos*

**Daniel**, meu grande amigo de tanto tempo, por mais que distantes, sempre mantivemos as boas lembranças de infinitas histórias, uma pessoa leal, companheira, extrovertida, portador de uma visão de mundo sem igual. Sua inteligência é um destaque, que com certeza vai te levar a lugares excepcionais, confio no seu progresso e na pessoa de bem que você. Obrigado por me ajudar em momentos importantíssimos da minha vida. Tenho muito orgulho de ter sua amizade e de quem você.

**Raphael**, meu grande amigo de muito tempo, sua presença em todos os lugares sempre é uma festa, cativante como ninguém, por piores que sejam suas piadas, nossos momentos juntos sempre se traduzem em risadas, descontração e muita alegria. Devo dizer que me inspiro em você quando vejo sua dedicação, tanto no trabalho quanto com sua família, além de um excelente neto, és um excelente sobrinho e com certeza um excelente filho, tenho orgulho de você. Os valores que você carrega o tornam único e eu só consigo desejar milhares de coisas boas pra ti. Muito obrigado por tudo.

**Vinicius**, ao meu grande amigo, considerado um irmão, a época da graduação foi o suficiente para que eu conhecesse essa pessoa de caráter, determinação, inteligência e bom coração. Como já te disse antes, aprendi muito contigo, seu jeito de lidar com as situações, de tratar o próximo, de desejar o bem aos demais é uma qualidade incomparável. Tudo isso gera frutos e tenho certeza de que seu futuro será brilhante. A sua família que sempre me tratou como um filho e me acolheu em todos os momentos que precisei, meu muito obrigado. Todas as histórias, sofrimentos e alegrias foram muito bem vividas, sou eternamente grato pela sua parceria e conselhos, tenho muito orgulho de quem você é hoje e dos degraus que você visa alcançar.

**Carlos**, ao meu grande amigo, que por mais distante que tenhamos ficado, sempre torço por ti em todos os aspectos. Exemplo de determinação e dedicação, me inspiro muito em você. Portador de uma humildade e honestidade verdadeiras, se torna um amigo leal e alguém substancial na vida de qualquer um. Tenho muito orgulho de quem você é hoje e só tenho a agradecer por todos os momentos de parceria e cumplicidade.



## *Aos meus amigos da Pós-graduação*

Aos meus amigos que surgiram durante todo esse percurso.

A minha amiga **Kim**, a primeira pessoa que eu tive o prazer de conhecer nessa trajetória, que de cara já se tornou alguém especial. Que desde o início demonstrou uma bondade e um companheirismo sem igual. Tantas conversas e histórias contadas, tantas angústias e alegrias compartilhadas. Por sua maturidade gigantesca, sua independência marcante, sua determinação sem igual, seu senso justo do certo e errado, são todas características que fazem de você essa pessoa única. Muito obrigado por tudo, tenho certeza de que qualquer que seja seu caminho, sempre será brilhante.

Ao meu amigo **Vinicius**, que desde o início do mestrado formamos uma amizade muito verdadeira, minha dupla de show de talentos, sempre com os melhores conselhos, com uma visão de mundo ampla e com uma maturidade que impressiona. Obrigado por ser essa pessoa fenomenal.

Ao meu amigo **Tiago**, por todas as aplicações de medicações e procedimentos cirúrgicos nas nossas pesquisas, por ser essa pessoa sensacional, de bom coração, respeitoso e dedicado. Obrigado por tudo.

A minha amiga **Ana Flávia**, por todos bons momentos vividos durante a pós graduação, por ser essa pessoa carismática, bondosa, com uma consciência e humor sensacionais. Obrigado por fazer parte desse momento.

Ao meu amigo **Gustavo**, por todos os momentos de reflexão, de confissão e compartilhamento, sua amizade foi um grande achado durante esse período, alguém com o dom da oratória, extremamente inteligente, perspicaz e companheiro. Obrigado por tudo.

E aos demais amigos com quem tive a oportunidade de trabalhar ao longo desse período:  
**William, Lara, Tiburtino, Anderson, Mateus, Glauco. Eduardo, Eloise, João Matheus,  
Monique, Stefany, Victor, Natalia, Mariane, Jéssica, Marcos, Ítalo, Leo Perazza.**

## *Agradecimentos*

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP** e seus representantes, senhor diretor **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara**, do senhor vice-diretor **Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem** e do **Prof. Assoc. André Luiz Fraga Briso**, como coordenador do programa de pós-graduação em Odontologia. Por tornarem possível toda a pesquisa e o meu desenvolvimento no mestrado.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**. Pela bolsa concedida pelo Processo N° 2019/12331-8 e em vigência durante o período, que permitiu a realização da pesquisa de uma maneira digna e responsável.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/Brasil - Código de Financiamento 001**. Pela bolsa mestrado CAPES-DS concedida no início do período.

Ao **Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – FOA/UNESP**, com a representação do **Prof. Dr. Francisley Ávila de Souza**, como chefe de departamento e aos servidores **Marco Aurélio de Oliveira Ianner, Renato Gomes de Oliveira**, por todo suporte para a realização dessa pesquisa.

Ao **Departamento de Ciências Básicas – FOA/UNESP**, na pessoa da chefe de departamento **Profa. Tit. Doris Hissako Sumida** e a **Profa. Rita Cássia Menegati Dornelles**, por gentilmente ter aceitado o convite para compor a banca de julgamento dessa dissertação, e aos demais servidores, por todo suporte para a realização dessa pesquisa.

Ao **Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** e seus funcionários, **Camilo e João Batista**, responsáveis pelo suporte e apoio no desenvolvimento dessa pesquisa.

As demais sessões da **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, Biblioteca, Pós-Graduação, Esterilização, Limpeza entre outras, e seus servidores que sempre prestaram um atendimento impecável e indispensável.

A **Universidade Estadual de Maringá – UEM** e todos os meus antigos professores e servidores, em especial ao **Prof. Gustavo Jacobucci Farah**, por ser um grande exemplo durante todo o meu percurso de formação e ter participado de momentos importantíssimos, enfim, a todos os envolvidos nesse processo, por terem colaborado com a minha formação com o mais alto nível de competência, graças a vossas preciosas colaborações e ensinamentos.

Aos meus familiares, avó **Noemia**, avô **Victorino** (in memorian), avó **Mercedes**, avô **João** (in memorian), aos meus padrinhos e tios **Ana, Zé, Silmara, Gilmar, Vanessa, Edson, Simone, Edson, Aerto, Izulina, Márcio, Daiane, João Carlos, Irene, Claudio, Eto** e todos meus primos, por sempre formarem uma família unida, carinhosa, harmoniosa e amorosa.

A todos os demais colegas, de graduação e pós-graduação, que participaram e contribuíram de alguma forma no desenvolvimento desse trabalho.

Enfim, a todos os animais que serviram com suas vidas à ciência, possibilitando a execução dessa pesquisa. Meu infinito respeito.

*Επίγραφε*



*“Que o teu orgulho e objetivo consistam em  
pôr no teu trabalho algo que se assemelhe a  
um milagre”*

*Leonardo Da Vinci*

DELANORA, L. A. **Avaliação da ozonioterapia no tratamento da osteonecrose induzida por zoledronato em ratas senis.** 2021. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

## RESUMO

A ozonioterapia vem se demonstrando uma ferramenta promissora na prevenção de infecções e no auxílio da reparação tecidual, conciliando com os desafios no tratamento da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (ONM-M), este projeto objetiva analisar os efeitos da ozonioterapia, em 55 ratas senis (18 meses), entre 300-350g, induzidas a osteonecrose via medicamentosa (Zoledronato 100µg/kg), após exodontia do primeiro molar inferior. Os animais foram divididos em 4 grupos equitativos (10 ratas por grupo), o primeiro grupo SAL, recebeu aplicações de soro fisiológico por 7 semanas, grupo SAL + OZ recebeu aplicações de soro fisiológico por 7 semanas e o tratamento com a ozonioterapia (0,7mg/kg) a cada 2 dias por 28 dias, o grupo ZOL recebeu aplicações de zoledronato (100µg/kg) por 7 semanas e por último o grupo ZOL + OZ recebeu também aplicações de zoledronato no mesmo protocolo e foi tratado com a ozonioterapia (0,7mg/kg) a cada 2 dias por 28 dias. Todas as ratas receberam a antibioticoterapia (Cristacilina® 0,1ml/kg por dia) iniciando 3 dias antes do procedimento de extração, se estendendo até 4 dias de pós-operatório, passaram pela extração do molar na terceira semana de experimento e foram submetidas a eutanásia na sétima semana de experimento. Após a eutanásia as mandíbulas foram ressecadas, reduzidas e preparadas para as análises microtomográficas (caracterização óssea do osso senil (MCT0) e após terapia com zoledronato (MCT1ZOL) contra seu par controle (MCT1SAL), parâmetros volumétricos (Bv, Bv.Tv, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp, Po.Tot) dos grupos experimentais), histométricas (porcentagem de osso neoformado e porcentagem de osso não vital) e imunohistoquímicas (expressão de TNFα, IL-1β, VEGF, OCN e TRAP). Os resultados da caracterização óssea não apresentaram diferença quando comparado os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ), possivelmente devido ao pouco tempo decorrido na terapia com zoledronato. Os demais resultados comparando os grupos experimentais mostrou com diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) uma característica de osso vítreo, denso, sem vitalidade, pobre em vascularização, com elevados valores para marcadores de inflamação, traduzindo isso em osteonecrose dos maxilares relacionada com a medicação, destoando principalmente do grupo controle SAL, que apresentou melhora na reparação alveolar e características de osso vital e vascularizado. A ozonioterapia (ZOL+OZ, SAL+OZ) apresentou valores significantes estatisticamente quando comparado ao grupo sem tratamento, traduzindo em melhora na vascularização do tecido

ósseo, em melhora reparacional do alvéolo, modulação da inflamação local e o aparecimento/manutenção de células osteoblásticas ativas ( $p < 0,05$ ). Mostrando-se uma terapia viável no controle/tratamento da osteonecrose dos maxilares relacionado com medicamentos.

**Palavras-chave:** Osteonecrose. Ozônio. Antibioticoprofilaxia. Bifosfonatos.



DELANORA, L. A. **Evaluation of ozone therapy in the treatment of zoledronate-induced osteonecrosis in senile rats**. 2021. 91 f. Dissertation (Master) - Faculty of Dentistry of Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

## ABSTRACT

Ozone therapy has been shown to be a promising tool in the prevention of infections and in the aid of tissue repair, reconciling with the challenges in the treatment of medication-induced jaw osteonecrosis (ONM-M), this project aims to analyze the effects of ozone therapy in 55 rats senile (18 months), between 300-350g, induced to osteonecrosis via medication (Zoledronate 100µg / kg), after extraction of the lower first molar. The animals were divided into 4 equitable groups (ten rats per group), the first SAL group, received saline applications for 7 weeks, SAL + OZ group received saline applications for 7 weeks and ozone therapy (0,7mg / kg) every 2 days for 28 days, the ZOL group received applications of zoledronate (100µg / kg) for 7 weeks and lastly the ZOL + OZ group also received applications of zoledronate in the same protocol and was treated with ozone therapy (0.7mg / kg) every 2 days for 28 days. All rats received antibiotic therapy (Cristacilina® 0.1ml / kg per day) starting 3 days before the extraction procedure, extending up to 4 days after the operation, underwent molar extraction in the third week of the experiment and were submitted to euthanasia in the seventh week of experiment. After euthanasia, the mandibles were resected, reduced and prepared for microtomographic analysis (bone characterization of senile bone (MCT0) and after therapy with zoledronate (MCT1ZOL) against its control pair (MCT1SAL), volumetric parameters (Bv, Bv.Tv, Tb .Th, Tb.N, Tb.Sp, Po.Tot) of the experimental groups), histometric (percentage of newly formed bone and percentage of non-vital bone) and immunohistochemistry (expression of TNFa, IL-1b, VEGF, OCN and TRAP) . The results of bone characterization did not show any difference when comparing the experimental groups ( $P > 0.05$ ), possibly due to the short time elapsed in zoledronate therapy. The other results comparing the experimental groups showed with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) a characteristic of vitreous bone, dense, without vitality, poor in vascularization, with high values for inflammation markers, translating this into a related jaw osteonecrosis with medication, disagreeing mainly with the SAL control group, which showed improvement in alveolar repair and characteristics of a vital and vascularized bone. Ozone therapy (ZOL + OZ, SAL + OZ) showed statistically significant values when compared to the untreated group, translating into an improvement in bone tissue vascularization, a reparational improvement of the alveolus, modulation of local inflammation and the appearance/maintenance of cells

active osteoblasts ( $P < 0.05$ ). Showing to be a viable therapy in the control/treatment of osteonecrosis of the jaws related to drugs.

**Keywords:** Osteonecrosis. Ozone. Antibiotic prophylaxis. Bisphosphonates.

*Listas*



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência do procedimento de instalação da ligadura. Animal anestesiado e estabilizado pronto para a realização do procedimento (A). Instalação da ligadura de algodão no 1° molar esquerdo com utilização de instrumentos adaptados para os animais (B). Ligadura em posição período anterior ao corte dos excessos do fio de algodão (B). Aspecto da periodontite induzida após 3 semanas da instalação da ligadura (D). **36**

Figura 2. Sequência do procedimento de extração do 1° molar esquerdo. Animal estabilizado e anestesiado pronto para a execução da exodontia (A). Aspecto da doença periodontal induzida antes da exodontia (B). Procedimento de extração dentária (C). Alvéolo após a extração do 1° molar esquerdo (D). **38**

Figura 3. Fluxograma do protocolo de tratamento dos animais e seus respectivos processos, evidenciando o período inicial dos grupos experimentais, com a ligadura de algodão no dia -1 do experimento, seguido da aplicação de solução salina/zoledronato por 7 semanas, com a extração dentária sendo realizada na 3ª semana e o início do protocolo com ozônio por 4 semanas até o momento da eutanásia, no final da sétima semana. **39**

Figura 4. Fluxograma do protocolo de caracterização óssea e da aplicação de zoledronato/solução salina por 3 semanas, com dois tempos de eutanásia diferentes, eutanásia grupo MCT0 no dia 0 e dos grupos MCT1SAL e MCT1ZOL no final da terceira semana. **39**

Figura 5. Representação gráfica da caracterização óssea comparativa entre os grupos MCT0, MCT1ZOL e MCT1SAL dos parâmetros microtomográficos: Bv.Tv (A), Tb.Th (B), Tb.N (C) e Tb.Sp (D). **46**

Figura 6. Representação gráfica da caracterização óssea comparativa entre os grupos MCT0, MCT1ZOL e MCT1SAL do parâmetro microtomográfico (Po.tot). **47**

Figura 7: Representação gráfica das médias e desvio padrão dos parâmetros volumétricos: Volume ósseo (Bv)-(A) e Porcentagem de porosidade total (Po.Tot)-(B), dos grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. Onde "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ, "H" representa diferença estatística entre ZOL e SAL, "¥" representa diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ, "α" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ, "£" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL e "¢" representa diferença estatística entre SAL e SAL+OZ. **48**

Figura 8: Representação gráfica das médias e desvio padrão dos parâmetros volumétricos: Espessura de trabeculado (Tb.Th), números de trabéculas (Tb.N) e espaçamento entre trabéculas (Tb.Sp), dos grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. **49**

Figura 9. Fotomicrografias representativas do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios (A,B,C,D) dos grupos experimentais SAL(A), ZOL(B), SAL+OZ(C) e ZOL+OZ(D). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo, ton, tecido ósseo não vital. Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm. **50**

Figura 10. Representação gráfica das médias e desvio padrão da porcentagem de osso neoformado em comparativo entre os grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. Onde "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ, "H" representa diferença estatística entre ZOL e SAL, "¥" representa diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ, "α" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ, "£" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL e "¢" representa diferença estatística entre SAL e SAL+OZ. **51**

Figura 11. Representação gráfica das médias e desvio padrão da porcentagem de osso não vital em comparativo entre os grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. Onde "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ, "H" representa diferença estatística entre ZOL e SAL, "¥" representa diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ, "α" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ, "£" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL e "¢" representa diferença estatística entre SAL e SAL+OZ. **52**

Figura 12. Imunomarcção para TNF $\alpha$  no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental e adjacências aos 28 dias pós-operatórios. (A,B,C,D) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TNF $\alpha$  no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL (A), SAL+OZ (B), ZOL (C), ZOL+OZ (D). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo. Contra-coloração: hematoxilina. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm. **53**

Figura 13. Imunomarcção para IL-1 $\beta$  no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental e adjacências aos 28 dias pós-operatórios. (A,B,C,D) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para IL-1 $\beta$  no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL (A), SAL+OZ (B), ZOL (C), ZOL+OZ (D). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo. Contra-coloração: hematoxilina. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm. **54**

Figura 14. Representação gráfica da expressão gênica por escores das proteínas TNF $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B) em comparativo entre os grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. Onde "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ, "H" representa diferença estatística entre ZOL e SAL, "¥" representa diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ, "α" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ, "£" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL e "¢" representa diferença estatística entre SAL e SAL+OZ. **55**

Figura 15. Imunomarcção para VEGF no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental e adjacências aos 28 dias pós-operatórios. (A,B,C,D) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para VEGF no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL (A), SAL+OZ (B), ZOL (C), ZOL+OZ (D). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo. Contra-coloração: hematoxilina. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25  $\mu$ m. **56**

Figura 16. Imunomarcção para OCN no sítio de extração dental e adjacências aos 28 dias pós-operatórios. (A,B,C,D) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OCN no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL (A), SAL+OZ (B), ZOL (C), ZOL+OZ (D). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo. Contra-coloração: hematoxilina. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25  $\mu$ m. **57**

Figura 17. Representação gráfica da expressão gênica por escores das proteínas VEGF (A) e OCN (B) em comparativo entre os grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. Onde "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ, "H" representa diferença estatística entre ZOL e SAL, "¥" representa diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ, "α" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ, "£" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL e "¢" representa diferença estatística entre SAL e SAL+OZ. **58**

Figura 18. Imunomarcção para TRAP no sítio de extração dental e adjacências aos 28 dias pós-operatórios. (A,B,C,D) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP-positivas (osteoclastos) no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL (A), SAL+OZ (B), ZOL (C), ZOL+OZ (D). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo; Seta, osteoclasto. Contra-coloração: hematoxilina. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25  $\mu$ m. **59**

Figura 19. Representação gráfica da expressão gênica por escores da proteína TRAP em comparativo entre os grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. Onde "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ, "H" representa diferença estatística

entre ZOL e SAL, "¥" representa diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ, "α" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ, "£" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL e "¢" representa diferença estatística entre SAL e SAL+OZ. **60**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAOMS Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial

AMI I Área microscópica de interesse 1

AMI II Área microscópica de interesse 2

Anti-IL-1 $\beta$  Anticorpo anti interleucina 1 beta

Anti-OCN Anticorpo anti osteocalcina

Anti-TNF $\alpha$  Anticorpo antifator de necrose tumoral alfa

Anti-TRAP Anticorpo anti Fosfatase ácida resistente ao tartarato

Anti-VEGF Anti-angiogênicos

ANOVA Análise de Variância

ARI Área radiográfica de interesse

ARRIVE Animal Research: Reporting in Vivo Experiments

BP(s) Bifosfonatos

Bv Volume ósseo

Bv.Tv Porcetagem de volume ósseo

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

COBEA Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

EDTA Ácido Etilenodiaminotetracético

FOA Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g Grama

HE Hematoxilina e eosina

IL-1 $\beta$  Interleucina 1 beta

mg Miligramas

mg/Kg Miligramas por quilo

MicroCT Microtomografia computadorizada

mL Mililitros

mm<sup>2</sup> Milímetros quadrado

MCT0 Microtomografia para caracterização óssea do osso senil (Tempo 0)

MCT1ZOL Microtomografia para caracterização óssea após terapia com zoledronato (Tempo 1)

MCT1SAL Microtomografia para caracterização óssea do grupo controle (Tempo 1)



MRONJ Osteonecrose dos maxilares relacionada aos bifosfonatos (inglês)

OCN Osteocalcina

O<sup>3</sup> Ozônio

ONMM Osteonecrose dos maxilares relacionada aos bifosfonatos

OZ Terapia de ozônio

PO Pós-operatório

Po.Tot Porcentagem de porosidade total

PONF Porcentagem de osso neoformado

PONV Porcentagem de osso não vital

PVPI Iodopovidona

SAL Solução salina 0,9%

TNF $\alpha$  Fator de necrose tumoral alfa

TRAP Fosfatase ácida resistente ao tartarato

Tb.N Número de trabéculas ósseas

Tb.Sp Separação trabecular ósseo

Tb.Th Espessura trabecular ósseo

tc Tecido conjuntivo

to Tecido ósseo

ton Tecido ósseo não vital

UNESP Universidade Estadual Paulista

VEGF Fator de crescimento do endotélio vascular

ZOL Zoledronato

$\mu\text{g}/\text{kg}$  Microgramas por quilo

$\mu\text{m}$  Micrometros

$^{\circ}\text{C}$  Grau Celsius

¶ Diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ

Ĥ Diferença estatística entre ZOL e SAL

¥ Diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ

⌘ Diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ

£ Diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL

¢ Diferença estatística entre SAL e SAL+OZ

# *Sumário*



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	28
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
3.1 Delineamento Experimental .....	34
<b>3.1.1 Animais</b> .....	34
<b>3.1.2 Período preparatório</b> .....	35
<b>3.1.3 Período de Indução da Osteonecrose</b> .....	36
<b>3.1.4 Período de antibioticoterapia</b> .....	37
<b>3.1.5 Anestesia</b> .....	37
<b>3.1.6 Exodontias</b> .....	37
<b>3.1.7 Ozonioterapia</b> .....	38
<b>3.1.8 Eutanásia</b> .....	38
3.2 Métodos de Análises .....	40
3.2.1 Análises e processamento dos tecidos calcificados .....	40
<b>3.2.1.1 Microtomografia computadorizada (MicroCT)</b> .....	40
3.2.2 Análise e processamento dos tecidos descalcificados .....	41
<b>3.2.2.1 Análise microscópica e área microscópica de interesse (AMI)</b> .....	41
<b>3.2.2.2 Análise histológica e histométrica</b> .....	42
<b>3.2.2.3 Análise imunoistoquímica</b> .....	42
3.3 Calibração do Examinador .....	43
3.4 Análise dos Dados .....	43
<b>4 RESULTADOS</b> .....	46
<b>4.1 Microtomografia computadorizada (MicroCT)</b> .....	46
<b>4.1.1 Análise da caracterização óssea</b> .....	46
<b>4.1.2 Análise dos parâmetros volumétricos dos grupos experimentais</b> .....	47
<b>4.2 Histologia e histometria</b> .....	49
<b>4.2.1 Histologia e características gerais microscópicas</b> .....	49
<b>4.2.2 Quantidade de osso neoformado</b> .....	51
<b>4.2.3 Quantidade tecido ósseo não vital</b> .....	52
<b>4.3 Imunoistoquímica</b> .....	52
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
<b>ANEXOS</b> .....	77

# *Introdução*



# 1 INTRODUÇÃO

Bifosfonatos (BPs) são drogas utilizadas para o combate de doenças osteopênicas, metástases ósseas, doença óssea de Paget, mielomas múltiplos e outras relacionadas ao tecido ósseo [1]. Com o avanço da tecnologia e os estudos na área da saúde e conseqüentemente o aumento da expectativa de vida da população, doenças relacionadas com a idade também vem incidindo em maior nível, como a osteoporose e osteopenias, dessa forma, elevando a utilização desses medicamentos (BPs) [2,3]. Os Bifosfonatos são ótimas ferramentas terapêuticas quanto ao controle e prevenção dessas doenças citadas, porém possuem o efeito adverso que acarreta na necrose óssea dos maxilares, denominado por osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (ONM-M) [2,3].

A Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial (AAOMS) define as características essenciais para o diagnóstico da ONM-M sendo: exposição óssea na região dos maxilares sem a reparação, por mais de 8 semanas, paciente em uso ou com registro passado de uso de medicamentos antirreabsortivos ou antiangiogênicos, sem histórico prévio de radioterapia na região maxilofacial [1]. Os sintomas são estagiados e podem evoluir do estado assintomático (estágio 0) a fraturas patológicas de mandíbula e acometimentos de espaços como os seios maxilares (estágio 3) [1,4,5]. A etiopatogenia ainda não foi totalmente esclarecida, algumas hipóteses são, inibição da reabsorção e remodelação óssea pelos osteoclóstos, inibição angiogênica, toxicidade celular advindo dos BPs, depressão do sistema imunológico, inflamações/infecções prévias decorrentes de microbiota específica residente [1,2,4,5].

A osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos afeta 1% a 12% dos pacientes em uso de antirreabsortivos com administração intravenosa, no caso dos administrados via oral a incidência existe em menor grau, de 0,001 a 0,01% [5,6]. Os bifosfonatos possuem a característica da sua concentração ser cumulativa nos tecidos com o uso contínuo, o que acarreta no aumento dos pacientes afetados pela condição para 21%, após o terceiro ano de uso [7]. A ONM-M afeta mais pessoas do gênero feminino e com idade avançada, possivelmente pois é nesse período que se desenvolvem problemas ósseos como a osteoporose, associados a alterações hormonais [1,4]. O maior sítio de ocorrência se detecta na parte posterior de mandíbula, entre primeiro molar e primeiro pré-molar[6]. A extração dentária tem se mostrado como agente traumático indutor para a ONM-M [1-3]. Novos

estudos indicam que a periodontite e/ou periapicopatias já instalada nesses dentes, seguido da sua extração, tendem a resultar em maior taxa de risco para a indução da doença [4-6].

Após o primeiro relato da ONM-M [8] diversos novos relatos surgiram, inclusive revisões sistemáticas e testes experimentais [5,6,8]. Porém até o momento sua etiopatogenia não foi completamente elucidada, o que se tem traduzido em grande dificuldade para estabelecer um protocolo de tratamento [1,6]. Nesse ponto os principais esforços vem sendo direcionados a prevenção, impedindo assim a instalação da doença nesses pacientes já comprometidos por outras comorbidades, porém a prevenção desses casos também se demonstrou grande desafio para toda a comunidade científica, onde diversas técnicas não são 100% eficientes [1-3].

Tendo isso em vista, a experimentação em animais se torna algo crucial para o desenvolvimento de novas técnicas, novos protocolos e futuros tratamentos e prevenções que possam ser aplicados nesses casos de osteonecrose induzidas por medicamentos [1,9,10]. Atualmente os tratamentos disponíveis variam de acordo com o estágio de progressão da doença, podendo ser conservadores, como uso de antimicrobianos por longos períodos, aplicação de laserterapia e câmeras hiperbáricas, até tratamentos mais agressivos, como por exemplo, debridamentos e curetagem óssea, até ressecções mutilantes dos maxilares [1,4-6].

O uso de antibióticos são ferramentas terapêuticas de extrema importância nesses casos, já estabelecido seu uso como alternativa de protocolo terapêutico para a ONM-M pela AAOMS em seu Position Paper1. Em revisões sistemáticas obtiveram respostas positivas quando o estadiamento da doença se encontrava em fase inicial [3]. Van den Wyngaert et al. [3] e Scoletta et al. [2] comprovaram que o uso das medicações levou a cura de 50% dos tecidos moles acometidos pela ONM-M [2,3]. Entretanto, ainda se faz necessário melhorar a resposta reparacional do tecido ósseo e o tecido mole de recobrimento nessas situações.

É nesse universo de possibilidades que o tratamento com ozônio (O<sup>3</sup>) vem se destacando. Esse que se apresenta normalmente como gás, nas condições normais de temperatura e pressão, em sua estrutura cíclica, composta por três átomos de oxigênio, sua utilização vem sendo empregada de diferentes formas, como insuflação gasosa, em constituições oleosas ou dissolvido em soluções [11]. Relacionado com a melhora do metabolismo, resposta tecidual e circulação sanguínea, possui dentre suas características, melhora no carreamento do oxigênio sanguíneo, regulação e modulação de enzimas antioxidantes e células do sistema imunológico. Atua estimulando a angiogênese, formação de

fatores de crescimento e fibroblastos [12,13]. Além disso o ozônio possui a capacidade de inativar bactérias, vírus e fungos, sendo excelente desintoxicante e agindo até mesmo como analgésico [12].

Pesquisas em animais vêm confirmando a ozonioterapia como opção terapêutica eficiente, auxiliando no reparo do tecido ósseo, porém mais estudos precisam ser realizados especialmente em situações críticas como a ONM-M [9,10]. Experimentos recentes envolvendo reparação de alvéolos pós extração e terapias com ozônio tem demonstrado respostas positivas quanto a reparação óssea, justificada pelo aumento da formação do trabeculado ósseo nos grupos tratados com ozônio em comparação aos grupos controles, melhora na proliferação celular, demonstrado pelo maior número de fibroblastos e seus precursores nos grupos que receberam a ozonioterapia, além de avanços nos aspectos reparacionais de tecidos moles, que une todos os demais benefícios, somados ao poder antimicrobiano do ozônio, acelerando assim o período cicatricial [10-13].

As vias de aplicação referente a ozonioterapia se dividem em sistêmica ou local (in situ) [10,14] onde a aplicação local se caracteriza pela deposição da substância oleosa composta por  $O^3$  diretamente no local afetado pela doença, o que pode ter sua eficiência comprometida devido a presença de placa bacteriana espessa ou secreção purulenta, dificultando sua ação local, além dos efeitos deletérios que podem acometer os pulmões e demais sistemas [10,11], quando inalados frequentemente, processo recorrente no momento em que o ozônio passa da sua forma em gel (acondicionado em  $< 4^\circ C$ ) para a oleosa ( $> 4^\circ C$ ), ficando mais volátil, seguindo o mesmo processo da insuflação gasosa da ozonioterapia local, que traz os mesmos malefícios anteriores citados [10]. Já a aplicação sistêmica, se caracteriza pela administração intraperitoneal ou endovenosa da solução ou gás contendo o  $O^3$ , dessa maneira não predispondo o organismo aos efeitos indesejáveis citados. Segundo estudos, a aplicação sistêmica, apontam maior penetração/recuperação óssea e tecidual quando comparado com outras vias de administração [14], justificados pela diminuição do stress oxidativo, estimulação da microcirculação e imunomodulação. Porém, poucos resultados foram publicados até o momento.

Diante do que foi exposto, o estudo da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos ainda carece de novas terapias e suas comprovações por meios científicos [10,15,16], portanto este trabalho teve como intenção explorar os efeitos da ozonioterapia em ratas senis com osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos, procurando estabelecer um possível protocolo terapêutico para futuros testes clínicos em humanos.



*Objetivos*



## **2 OBJETIVOS**

O objetivo desse trabalho foi de avaliar os desdobramentos implicados na reparação óssea alveolar e tecidual pós extração dentária de ratas senis, em uso de zoledronato, sob a terapia com ozônio.

A hipótese nula do trabalho foi que tanto o grupo sem a ozonioterapia (ZOL) quanto o grupo tratado com ozônio (ZOL+OZO) não demonstrariam diferenças comparativas no reparo ósseo e tecidual.



## *Material e Métodos*

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Delineamento Experimental

Essa pesquisa seguiu todos os preceitos e princípios éticos para a experimentação animal, regulamentados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os protocolos experimentais foram enviados e aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pelo número de protocolo FOA n° 00498-2019.

#### 3.1.1 Animais

O projeto contou com 55 ratas (*Rattus norvegicus albinus Wistar*) senis, de 18 meses, pesando entre 300-350g, advindos do Biotério Central do *Campus* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, dessas, 40 ratas, foram formados 4 grupos (SAL; ZOL; SAL+OZ; ZOL+OZ). Sendo Grupo 1 (SAL), com 10 ratas que receberam 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%, (solução salina) intraperitoneal, a cada 3 dias, por 7 semanas, simulando os procedimentos com o zoledronato, o qual representou o grupo controle negativo; o Grupo 2 (ZOL) com 10 ratas, no qual foi induzido a osteonecrose com a aplicação de zoledronato 100 ug/kg, a cada 3 dias por 7 semanas (controle positivo); o Grupo 3 (SAL+OZ) com 10 ratas que receberam solução salina intraperitoneal a cada 3 dias por 7 semanas mais a ozonioterapia intraperitoneal na dose de 0,7 mg/kg a cada 2 dias por 4 semanas; e o Grupo 4 (ZOL+OZ) com 10 ratas que foram induzidas a osteonecrose com o zoledronato no mesmo protocolo já citado, somado a ozonioterapia também seguindo o mesmo modelo de aplicação a cada 2 dias por 4 semanas. Tais doses e o plano de tratamento medicamentoso consistiram em adaptação para as ratas, do protocolo empregado atualmente para a terapia oncológica em humanos [15-17].

Para a caracterização da arquitetura do tecido ósseo, 15 ratas foram destinadas especificamente para a análise em microtomografia computadorizada (MicroCT). Cinco ratas foram submetidas à eutanásia logo após o período de ambientalização, correspondente a 15 dias após a chegada desses animais no biotério do departamento, que foi estabelecido como dia 0, para investigar as características do osso mandibular na região posterior, no período da senescência (MCT0). Cinco ratas receberam a indução da osteonecrose com zoledronato por 3 semanas (MCT1ZOL) e as 5 demais ratas receberam aplicação de solução salina, também por

3 semanas (MCT1SAL), essas 10 ratas (MCT1ZOL e MCT1SAL) foram submetidas à eutanásia, no final da 3ª semana, como ilustrado na Figura 4, para avaliação em MicroCT da arquitetura do osso no dado momento e com essas terapias prévias.

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, em gaiolas plásticas adequadas para a espécie, em ambiente com temperatura estável ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todo o experimento e água *ad libitum*.

### **3.1.2 Período preparatório**

Cronologicamente, vide Figura 5, a intervenção iniciou no dia -1 com a instalação da ligadura de fio de algodão (Algodão trançado #24, Corrente Coats®, SP, Brasil), em torno do 1º molar esquerdo dos animais, tendo como objetivo auxiliar no momento da extração desse dente, devido a progressão da doença periodontal, que resulta em diminuição do osso intra e inter radicular do dente em questão, facilitando a técnica para extração dentária, evitando a fratura apical das raízes radiculares e as técnicas invasivas para a remoção dessas mesmas. Além da doença periodontal ser fator predisponente para a indução da osteonecrose [15,17-19].

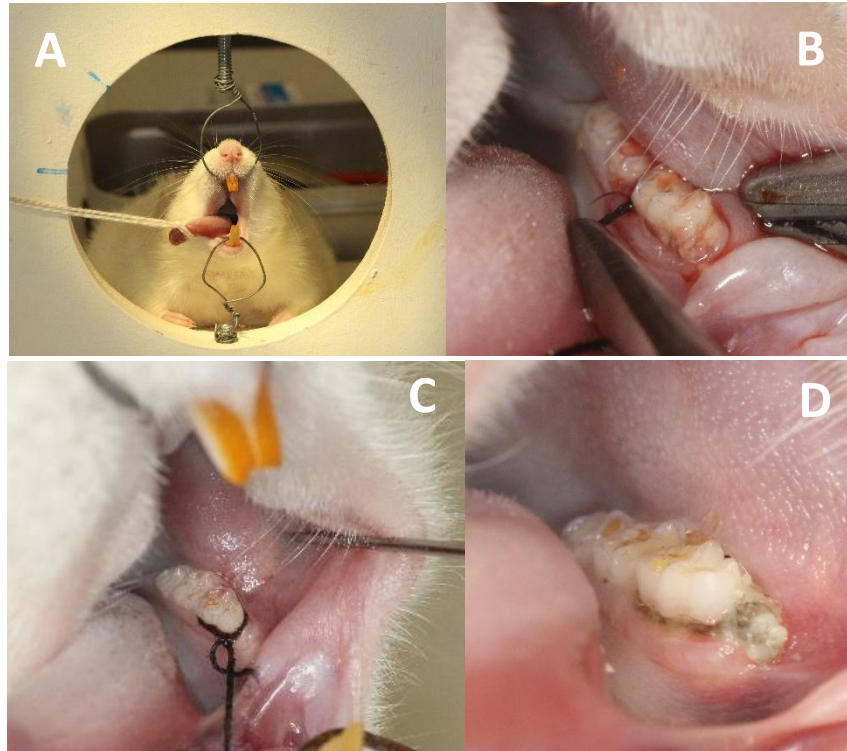


Figura 1. Sequência do procedimento de instalação da ligadura. Animal anestesiado e estabilizado pronto para a realização do procedimento (A). Instalação da ligadura de algodão no 1° molar esquerdo com utilização de instrumentos adaptados para os animais (B). Ligadura em posição período anterior ao corte dos excessos do fio de algodão (B). Aspecto da periodontite induzida após 3 semanas da instalação da ligadura (D).

### 3.1.3 Período de Indução da Osteonecrose

No dia 0 se iniciou o protocolo de indução da Osteonecrose, em que as ratas expostas ao medicamento, correspondente ao grupo ZOL (apenas aplicação de zoledronato) e ZOL+OZ (aplicação de zoledronato associado a ozonioterapia), receberam o zoledronato na dose de 100µg/kg diluídos em 0,45 ml de solução salina, por via intraperitoneal, em SERINGA BD SLIP INSULINA de 1ml, descartável, com agulha de calibre 13mm x 0,38mm, a cada 03 dias por 7 semanas, até a eutanásia. Os animais que não foram expostos ao medicamento, correspondente ao grupo SAL (aplicação de solução salina apenas) e grupo SAL+OZ (aplicação de solução salina associado a ozonioterapia), receberam 0,45 ml de solução salina, também intraperitoneal, com o mesmo modelo de seringa e agulha, para mimetizar o estresse do manejo dos animais do grupo teste [10,14-16].

### **3.1.4 Período de antibioticoterapia**

Na terceira semana de indução, 3 dias antes da extração do molar, os animais receberam a antibioticoterapia profilática, em que o antibiótico utilizado foi a Penicilina G Potássica, 0,1 ml/kg por dia, administrada via intraperitoneal, (Cristacilina® (benzilpenicilina potássica) 1.000.000UI, Novafarma indústria farmacêutica Ltda®, Anápolis-GO BR) na dose de 0,1 mL/kg ao dia por 7 dias. Finalizando a sua administração 4 dias após a extração [20,21].

### **3.1.5 Anestesia**

Todos os procedimentos (ligadura de algodão, extração dentária e eutanásia) que poderiam causar algum desconforto ou dor nos animais foram realizados sob anestesia geral, utilizando Quetamina (70 mg/kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e Xilazina (10 mg/kg, Rompum® Bayer, RS, Brasil), via intraperitoneal [15-17].

### **3.1.6 Exodontias**

Após 3 semanas do início da medicação, as ratas foram anestesiadas, (Quetamina e Xilazina) posicionadas na mesa de operação, removida a ligadura de algodão, feita a antisepsia bucal com PVPI 10% (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), realizada a sindesmotomia dos tecidos adjacentes ao dente, luxação e por fim, extraído o primeiro molar inferior esquerdo, utilizando materiais cirúrgicos odontológicos adaptados aos animais. Todos as ratas dos grupos (SAL; SAL+OZ; ZOL e ZOL+OZ) foram submetidas a esse procedimento [15].



Figura 2. Sequência do procedimento de extração do 1° molar esquerdo. Animal estabilizado e anestesiado pronto para a execução da exodontia (A). Aspecto da doença periodontal induzida antes da exodontia (B). Procedimento de extração dentária (C). Alvéolo após a extração do 1° molar esquerdo (D).

### 3.1.7 Ozonioterapia

Após a exodontia, as ratas pertencentes aos grupos SAL+OZ e ZOL+OZ receberam a terapia com Ozônio, no qual foi utilizado o aparelho fornecido pela empresa OZONE&LIFE INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SISTEMAS LTDA (São José dos Campos – SP), aplicado via intraperitoneal em concentração de 0,7mg/kg em seringa descartável de 30 ml com agulha de calibre 25mm x 0,07mm, nos períodos: Pós operatório (PO) imediato 0°, 2° dia, 4° dia, 6° dia, 8° dia, 10° dia, 12° dia, 14° dia, 16° dia, 18° dia, 20° dia, 22° dia, 24° dia, 26° dia e 28° dia [10].

### 3.1.8 Eutanásia

O grupo MCT0 foi submetido a eutanásia, no dia 0, após a ambientação. O grupo MCT1ZOL e MCT1SAL foram submetidos a eutanásia no dia de número 21 (terceira semana, Figura 4). E os grupos SAL; ZOL; SAL+OZ; ZOL+OZ foram submetidos após 28 dias da

extração dos dentes dos tais grupos (totalizando 7 semanas, Figura 3). As eutanásias seguiram o seguinte protocolo para todos os grupos: As ratas foram anestesiadas e submetidas à eutanásia por perfusão cardíaca com 100 ml de solução salina acrescido com 0,1% de heparina e 800ml de formaldeído 4% (Sigma Chemical®, St. Louis, MO, USA) em tampão fosfato-salino (PBS - Sigma Chemical®) 0.1 M, 4 °C, pH 7.4. As hemimandíbulas (do lado esquerdo) foram cuidadosamente dissecadas e pós-fixadas por 24 horas em paraformaldeido 4% [16,17,21].

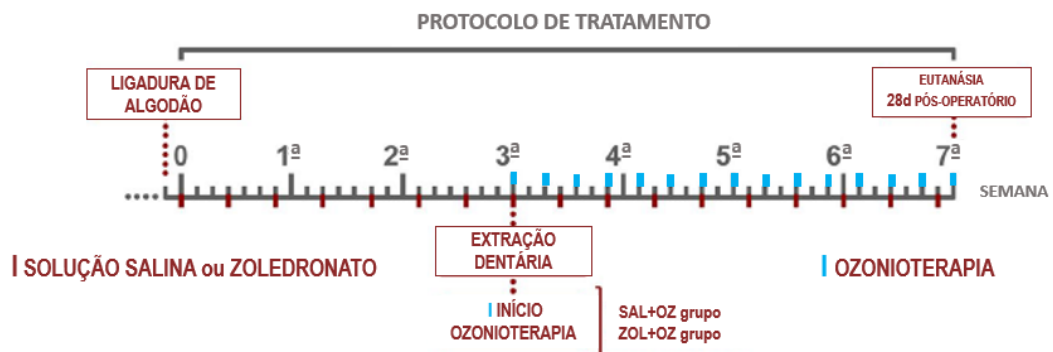


Figura 3. Fluxograma do protocolo de tratamento dos animais e seus respectivos processos, evidenciando o período inicial dos grupos experimentais, com a ligadura de algodão no dia -1 do experimento, seguido da aplicação de solução salina/zoledronato por 7 semanas, com a extração dentária sendo realizada na 3ª semana e o início do protocolo com ozônio por 4 semanas até o momento da eutanásia, no final da sétima semana.

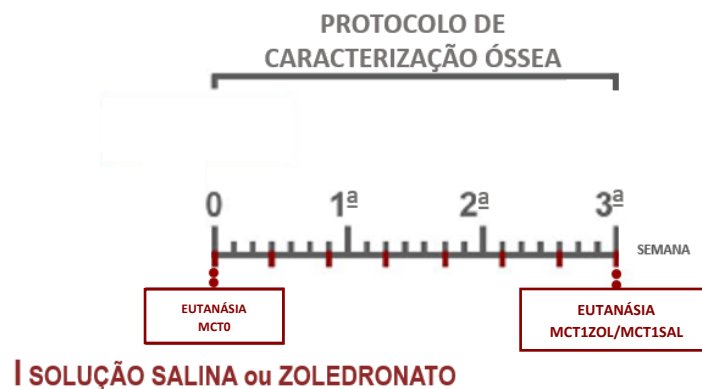


Figura 4. Fluxograma do protocolo de caracterização óssea e da aplicação de zoledronato/solução salina por 3 semanas, com dois tempos de eutanásia diferentes, eutanásia grupo MCT0 no dia 0 e dos grupos MCT1SAL e MCT1ZOL no final da terceira semana.



## **3.2 Métodos de Análises**

### **3.2.1 Análises e processamento dos tecidos calcificados**

#### **3.2.1.1 Microtomografia computadorizada (MicroCT)**

Para a análise tridimensional estrutural do tecido ósseo, os animais pertencentes aos grupos MCT0; MCT1ZOL; MCT1SAL e posterior SAL; ZOL; SAL+OZ; ZOL+OZ, tiveram as mandíbulas removidas do fixador e lavadas por 12 horas em água corrente, a fim de remover qualquer resíduo do fixador. Sequencialmente foram armazenadas em álcool 70% para transporte até o local de análise, primeiramente foram submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 9 µm de espessura (90Kv e 111µA), com filtro de Alumínio e passo de rotação de 0,05 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0) [21,22].

No software DataViewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida a área radiográfica de interesse (ARI), a qual é delimitada por uma área de 4 mm<sup>3</sup> que inclui a porção do local de extração dentária anteriormente ocupada pelas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior esquerdo e tecidos adjacentes. O software CTAn analisou e mediu a imagem de acordo com a escalas de cinza. Após o ajuste e remoção dos tons de cinza da área correspondente do alvéolo, o threshold utilizado na análise foi de 40-160 tons de cinza, que possibilitou a obtenção do volume de osso presente/formado no interior dos alvéolos [21,22].

Os parâmetros analisados foram referentes à quantidade do tecido ósseo (BV= volume ósseo; BV.TV= porcentagem do volume ósseo) e qualidade do tecido ósseo (Tb.Th=

espessura do trabeculado ósseo, Tb.SP= separação das trabéculas ósseas, Tb.N= número das trabéculas e (Po.tot) = porcentagem de porosidade total) [21,22].

### **3.2.2 Análise e processamento dos tecidos descalcificados**

Logo após a MicroCT, as peças retornaram para o fixador a fim de completarem 72 horas de fixação, após isso, foram submetidas novamente ao banho de água corrente por 12 horas e partiram para a descalcificação em ácido etilenodiamino tetra-acético 10% (EDTA) por 8 semanas. Após a descalcificação, a região correspondente ao alvéolo e estruturas adjacentes da extração foram separadas. Assim, as peças seguiram para a desidratação em sequência de álcoois (70 a 100%). Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 4 µm de espessura e a confecção das lâminas. Foram coletadas, de lingual para vestibular, as secções histológicas da porção do alvéolo dental e tecidos adjacentes a serem analisados. As lâminas pares após a microtomia foram destinadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) [15,16].

#### **3.2.2.1 Análise microscópica e área microscópica de interesse (AMI)**

As análises microscópicas foram realizadas por um histologista certificado, cego aos tratamentos. Para a análise histológica/histométrica, foram avaliados três cortes histológicos localizados na porção vestibular, média e lingual do local da extração dentária. Sendo que um corte histológico da porção média do local de extração foi utilizado para a análise imunoistoquímica. A área de interesse foi dividida em duas: AMI (I) e a AMI (II) que foram determinadas de acordo com a análise microscópica realizada. A AMI (I) consiste em uma área de 4 mm x 4 mm que inclui a porção do local da extração dentária anteriormente ocupada pelas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior esquerdo e tecidos adjacentes. Seu limite distal é composto de uma linha situada paralelamente à dentina coronária e à superfície radicular do segundo molar inferior esquerdo, estendendo-se 4mm mesialmente. Seu limite coronário é composto de uma linha paralela ao limite da margem cemento-gengival do segundo molar inferior esquerdo, estendendo-se 4mm apicalmente [17]. O AMI (II) consistiu em duas áreas de 250 × 250 µm, situadas no tecido conjuntivo que recobre o local da extração dentária. O limite das áreas foi determinado por uma linha localizada no centro do tecido conjuntivo, perpendicular ao longo eixo dos dentes e que divide esse tecido em sua direção

coronoapical. Duas outras linhas foram utilizadas, uma paralela à porção central do local de extração dentária anteriormente ocupada pela raiz mesial e outra paralela à porção central do local de extração dentária anteriormente ocupada pela raiz distal do primeiro molar. A intersecção dessas linhas determina o centro das duas áreas analisadas [15].

### 3.2.2.2 Análise histológica e histométrica

A análise histológica com as características gerais dos tecidos e histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PONF) foram realizadas através de fotomicrografias da área do alvéolo do dente extraído e tecidos adjacentes, que foram capturadas com o auxílio de um software de análise de imagem (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). A área ocupada pela PONF foi estabelecida e expressa em  $\mu\text{m}^2$  como média  $\pm$  desvio padrão em cada grupo experimental. Na região de Interesse AMI (I), as imagens foram capturadas utilizando uma câmera digital (AxioCam® Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada a um microscópio de luz (AxioLab®) e conectada a um microcomputador. A quantificação da porcentagem de tecido ósseo neoformado e a porcentagem de tecido ósseo não vital foram calculados utilizando o software de análise de imagens (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss). A PONV representa uma região onde mais de dez lacunas de osteócitos vizinhos apresentaram-se vazias ou contendo restos de osteócitos necróticos [15,16,17].

### 3.2.2.3 Análise imunoistoquímica

Para as reações imunoistoquímicas, a recuperação antigênica foi feita imergindo as lâminas histológicas em solução tampão (Diva Decloaker; Biocare Medical, Concord, CA, EUA) em câmara pressurizada (Decloaking Câmara; Biocare Medical) a 95 ° C por 10 min. Os cortes foram lavados com solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (pH 7,4) no final de cada etapa da reação imunoistoquímica. Os cortes histológicos foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% por 1 hora e em albumina de soro bovino a 1% por 12 horas para bloquear a atividade endógena da peroxidase e os receptores inespecíficos, respectivamente.[20]

Para análise imunoistoquímica, as secções histológicas ímpares foram submetidas à técnica da imunoperoxidase indireta empregando-se os seguintes anticorpos primários: **anti-TNF $\alpha$**  do rato gerado em cabra (SC-1348, Santa Cruz Biotechnology®), **anti-IL-1 $\beta$**  do rato

gerado em cabra (SC-1252, Santa Cruz Biotechnology®), **anti-VEGF** do rato gerado em camundongo (SC-7269, Santa Cruz Biotechnology®), **anti-OCN** do rato gerado em cabra (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology®) e **anti-TRAP** do rato gerado em cabra (SC-30833, Santa Cruz Biotechnology®).[15]

Os anticorpos primários foram diluídos em tampão fosfato solução salina com 0,1% de Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) e colocados em câmara úmida por 24 h. As secções histológicas foram incubadas com anticorpo secundário por 2 h e posteriormente tratados com estreptavidina-peroxidase conjugado por 1 h (Universal Dako Kit marcado com estreptavidina-biotina; Dako Laboratories, Carpinteria, CA, EUA). A reação foi desenvolvida usando o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetracloridrato (cromogênio DAB kit; Dako Laboratories) e contracorada com hematoxilina de Harris. O controle negativo se deu de amostras submetidas ao referido procedimento, mas sem os anticorpos primários.[20]

As imagens foram coletadas do tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental nas secções histológicas imunomarcadas com **VEGF**, **anti-TNF $\alpha$**  e **anti-IL-1 $\beta$** ; e do tecido ósseo neoformado nas secções histológicas imunomarcadas com **VEGF**, **OCN** e **TRAP**. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Axiovision 4.8.2) foram realizadas as mensurações da área ocupada por tecido epitelial e conjuntivo sobre os alvéolos dentais, e da área ocupada por tecido ósseo no sítio de extração dental. Em cada uma destas secções histológicas foram atribuídos escores de 0 a 3, sendo 0 = ausência total de marcação, 1 = leve marcação, 2 = marcação moderada e 3 = marcação intensa. Tais valores foram expressos por mm<sup>2</sup> sob a forma de mediana  $\pm$  limite superior e limite inferior.[16]

### 3.3 Calibração do Examinador

Anteriormente as mensurações propostas para a histometria, imunoistoquímica e MicroCT. O avaliador foi submetido a um teste prévio do nível de compatibilidade entre mensurações. Onde foram realizadas as mensurações propostas no estudo de 12 animais randomizados, em duplicata com um intervalo de 1 semana entre elas. Para análise da correlação, o coeficiente de Pearson apresentou excelente grau de correlação (0,94) juntamente com o teste-t pareado onde não foi obtido diferença estatística significativa entre as mensurações ( $p > 0.05$ ).

### 3.4 Análise dos Dados

Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos obtidos através da histometria (PONF, PONV), morfometria tridimensional pela microtomografia (BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N e Po.Tot) e para os parâmetros semiquantitativos da análise da imunoistoquímica, foram abordadas as diferenças entre os grupos experimentais (SAL; ZOL; SAL+OZ; ZOL+OZ; (MCT0; MCT1ZOL e MCT1SAL)). Todos os dados foram submetidos à curva de normalidade – teste de Shapiro-Wilk. O nível de significância foi estabelecido em 0,05 para todos os testes. Os valores paramétricos (MicroCT e histometria) passaram pelo teste ANOVA Dois Fatores e ANOVA Um Fator, respectivamente, e quando apresentaram diferença significativa, foram realizadas as comparações múltiplas pelo pós-teste Student-Newman-Keuls. Para os parâmetros não paramétricos (imunoistoquímica) foi utilizado o teste ANOVA On Rank/Kruskal-Wallis e quando notado diferença estatística significativa foi utilizado o pós-teste de Student-Newman-Keuls. O programa estatístico utilizado foi o SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA).

# *Resultados*



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Microtomografia computadorizada (MicroCT)

#### 4.1.1 Análise da caracterização óssea

No quesito caracterização óssea dos animais para o presente estudo, após a padronização das amostras por meio dos softwares NRecon, DataViewer e CTAnalyser, foi possível obter os parâmetros de Bv.Tv (porcentagem de volume ósseo), onde tanto o grupo inicial (MCT0) quanto os grupos após a administração de zoledronato (MCT1ZOL) ou solução salina (MCT1SAL) apresentaram valores muito próximos, não apresentando diferença estatística entre as médias ( $p>0,05$ ). Como pode ser visualizado na Figura 5 - (A).

Nos parâmetros referentes a qualidade do tecido ósseo, (Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp) novamente os valores apresentaram valores bastante homogêneos e semelhantes, em comparação entre os três grupos analisados. Sem diferença estatística relevante. Figura 5 (B,C,D).

Por fim, no parâmetro de porosidade total (Po.Tot) das áreas de interesse analisadas os grupos MCT0, MCT1ZOL e MCT1SAL não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si ( $p>0,05$ ). Figura 6.

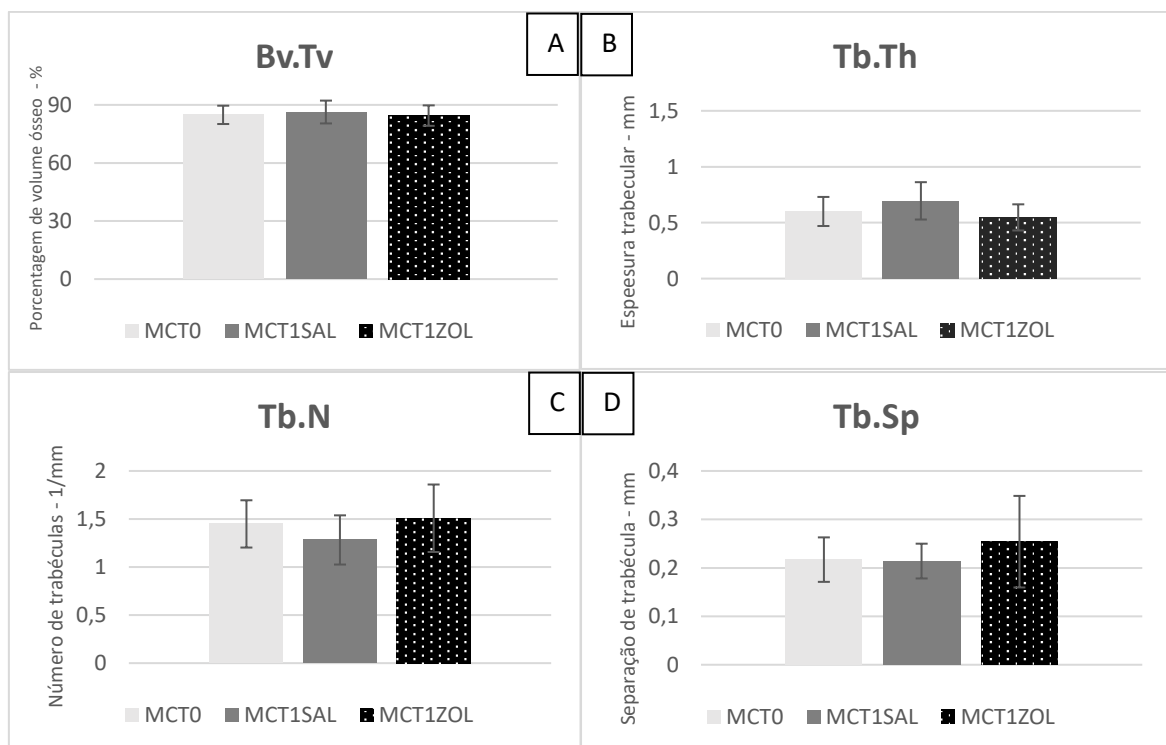


Figura 5. Representação gráfica da caracterização óssea comparativa entre os grupos MCT0, MCT1ZOL e MCT1SAL dos parâmetros microtomográficos: Bv.Tv (A), Tb.Th (B), Tb.N (C) e Tb.Sp (D).

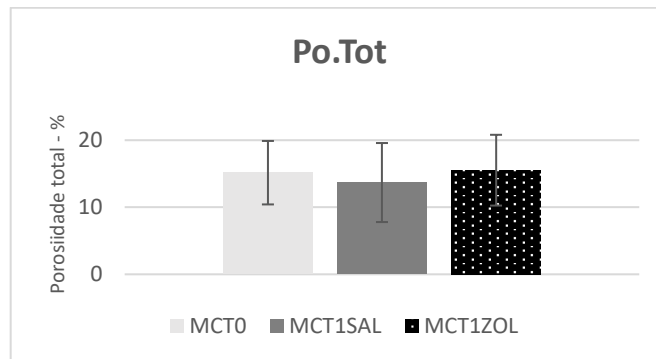


Figura 6. Representação gráfica da caracterização óssea comparativa entre os grupos MCT0, MCT1ZOL e MCT1SAL do parâmetro microtomográfico (Po.tot).

#### 4.1.2 Análise dos parâmetros volumétricos dos grupos experimentais

Quanto aos parâmetros ósseos referente aos grupos experimentais, seguindo a mesma padronização das imagens coletadas e processamento pelos softwares de análise foi possível obter os valores médios do volume ósseo total da área de interesse (Bv), em comparação dos grupos SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ, onde foi possível verificar valores inferiores para o grupo SAL, destoando do grupo ZOL, que apresentou o maior volume, esses dois grupos apresentando diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), o grupo SAL+OZ apresentou os menores valores, destoando de todos os demais grupos, apresentando portanto menor volume ósseo, com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Um dado relevante é o apresentado pelo grupo ZOL+OZ, que apresentou média inferior à do grupo ZOL, com diferença estatística relevante ( $p < 0,05$ ), que em contra partida obteve valores semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ), como podem ser vistos na Figura 7 - (A).

No parâmetro porosidade total (Po.Tot) em comparação dos grupos experimentais, o menor valor de média foi correspondente ao grupo ZOL, se destoando de todos os demais grupos, que apresentaram porosidade maior em comparação. Fator que chama atenção também é a comparação entre grupo ZOL e ZOL+OZ, onde o grupo associado a ozonioterapia apresentou aumento na porosidade do osso, sem diferença estatística ( $p = 0,07$ ). As médias e desvio padrão podem ser observadas na Figura 7 - (B).



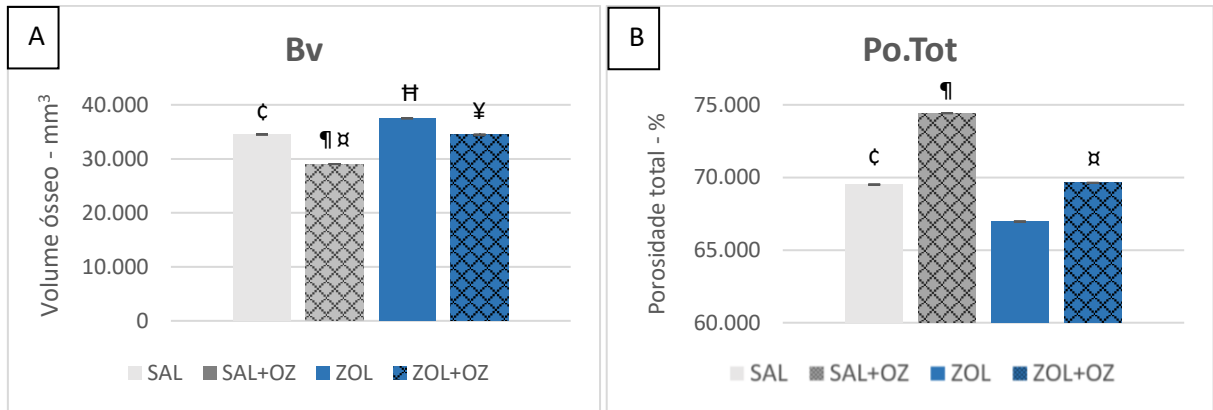


Figura 7: Representação gráfica das médias e desvio padrão dos parâmetros volumétricos: Volume ósseo (Bv)-(A) e Porcentagem de porosidade total (Po.Tot)-(B), dos grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. Onde "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ, "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL, "¥" representa diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ, "¶" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ, "ç" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL e "ç" representa diferença estatística entre SAL e SAL+OZ.

Nos parâmetros referêntes a qualidade óssea: Espessura de trabeculado (Tb.Th), números de trabéculas (Tb.N) e espaçamento entre trabéculas (Tb.Sp). Foi possível verificar os valores semelhantes entre os grupos, sem diferenças estatísticas relevantes ( $p > 0,05$ ), as médias apresentaram tendências que seguiram os outros parâmetros já apresentados, onde indicam osso mais denso para o grupo tratado com o zoledronato, grupo ZOL e ZOL+OZ, e menos denso para os grupos que receberam solução salina (SAL e SAL+OZ). As médias e desvio padrão podem ser vistos na Figura 8.

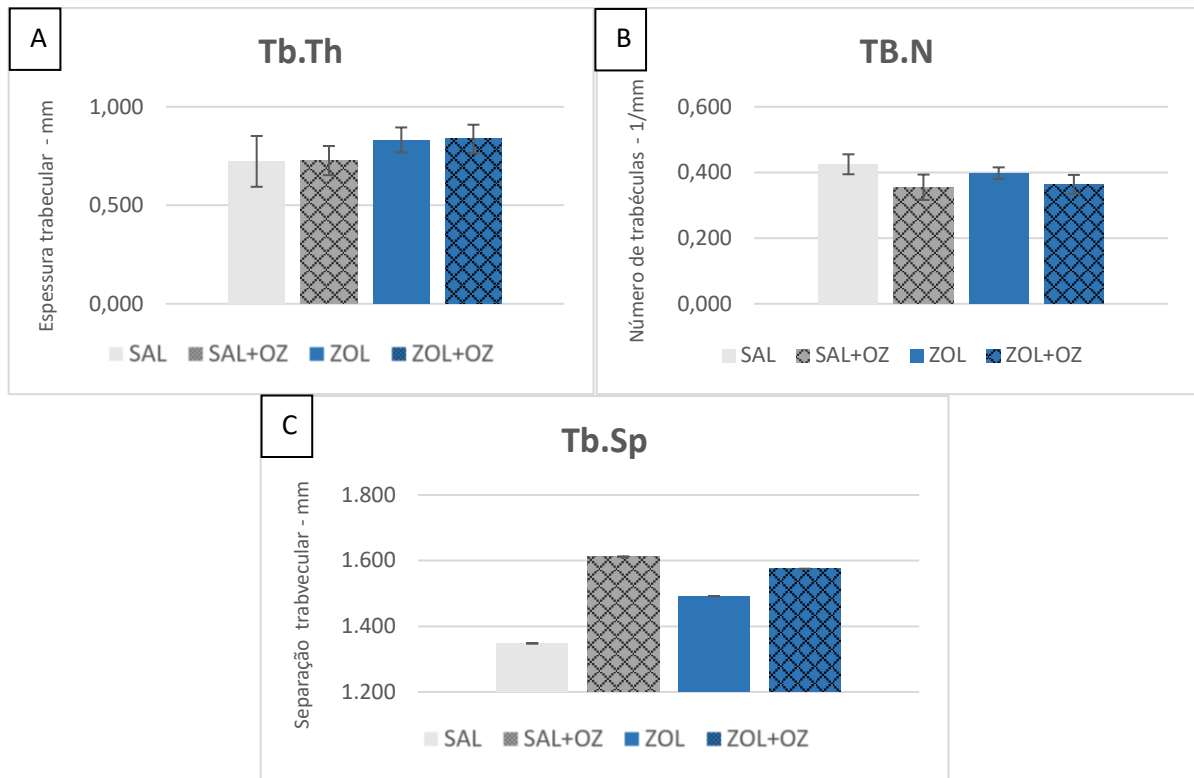


Figura 8: Representação gráfica das médias e desvio padrão dos parâmetros volumétricos: Espessura de trabeculado (Tb.Th), números de trabéculas (Tb.N) e espaçamento entre trabéculas (Tb.Sp), dos grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ.

## 4.2 Histologia e histometria

### 4.2.1 Histologia e características gerais microscópicas

Quanto aos aspectos histológicos referente a região de alvéolo do 1º molar a presença de tecido ósseo vital nos grupos SAL e SAL+OZ ficou evidente nas secções histológicas em grande qualidade, seguido do grupo ZOL+OZ, que mesmo apresentando algumas lacunas vazias na matriz óssea, é notório a quantidade de células da linhagem osteoblástica, como osteócitos imersos na matriz óssea já mineralizada e osteoblastos na região adjacente do tecido ósseo(to), justapostos ao tecido conjuntivo(tc) carregado de células, evidenciando o dinamismo dos tecidos. E por fim, fica evidente a diferença entre o grupo ZOL para com os demais, onde é visível diversas lacunas vazias, característica típica do tecido ósseo não vital (ton) em abundância. Figura 9.

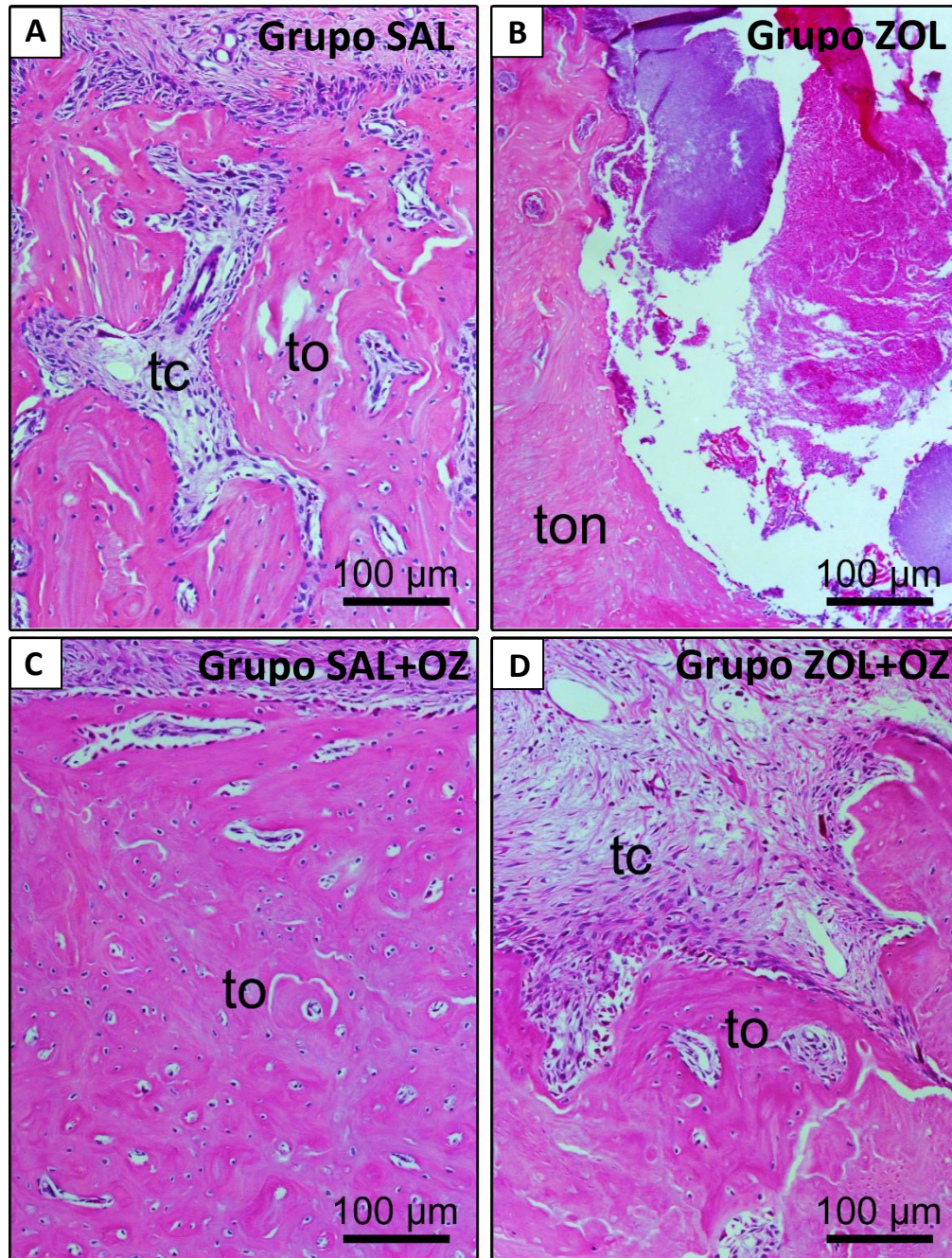


Figura 9. Fotomicrografias representativas do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios (A,B,C,D) dos grupos experimentais SAL(A), ZOL(B), SAL+OZ(C) e ZOL+OZ(D). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo, ton, tecido ósseo não vital. Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm.

#### 4.2.2 Quantidade de osso neoformado

Na análise histométrica, após a coloração em hematoxilina e eosina foi possível realizar as medidas quantitativas quanto a porcentagem de osso neoformado nas áreas de interesse. Com isso obtivemos as maiores porcentagens de osso neoformado nas regiões de alvéolo para o grupo SAL+OZ seguido do grupo SAL, em sequência do grupo ZOL+OZ e por fim do grupo ZOL. Quanto as diferenças estatísticas o grupo ZOL com seus menores valores, apontou diferença estatística para com todos os demais grupos ( $p < 0,01$ ). Quanto ao grupo ZOL+OZ, a sua média também diferiu dos grupos SAL ( $p < 0,05$ ) e SAL+OZ ( $p = 0,01$ ), com diferença estatística significativa. Já o grupo SAL e SAL+OZ não apresentaram diferença estatística. O gráfico representativo das médias e desvio padrão pode ser visualizado na Figura 10.

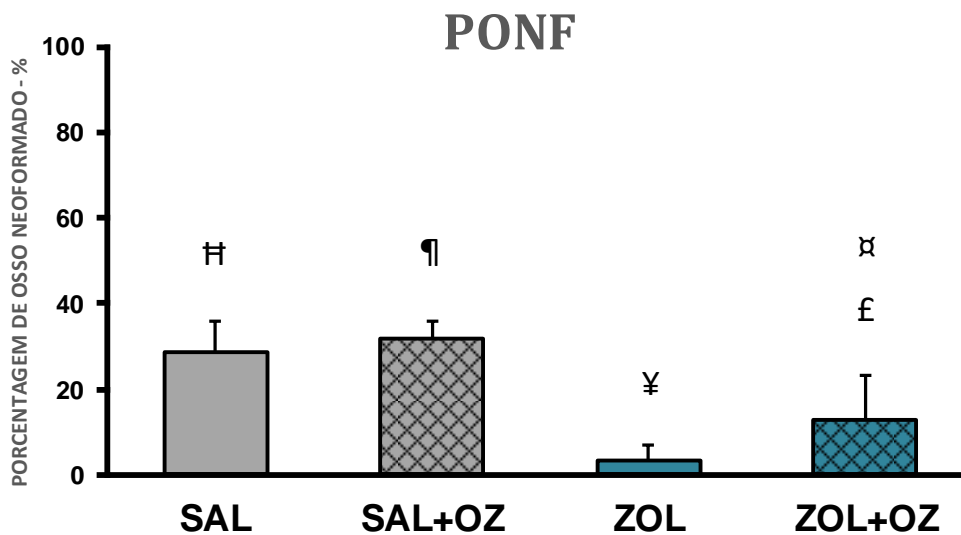


Figura 10. Representação gráfica das médias e desvio padrão da porcentagem de osso neoformado em comparativo entre os grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. Abreviações e símbolos: PONF: Porcentagem de osso neoformado. Onde "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ, "∩" representa diferença estatística entre ZOL e SAL, "¥" representa diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ, "⊘" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ, "£" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL e "∩" representa diferença estatística entre SAL e SAL+OZ.

### 4.2.3 Quantidade tecido ósseo não vital

Na análise da porcentagem de osso não vital na região do alvéolo para os grupos experimentais, foi possível observar a maior quantidade de tecido ósseo não vital para o grupo ZOL, com diferença significativa para o grupo ZOL ( $p<0,05$ ), SAL e SAL+OZ ( $p<0,01$ ). Ponto importante a ser salientado aqui é a quantidade de osso não vital encontrado no grupo ZOL+OZ, que apresentou diferença estatística significativa ao grupo ZOL, como já mencionado e com os demais grupos SAL e SAL+OZ também ( $p<0,05$ ). As médias e desvio padrão podem ser visualizados na Figura 11.

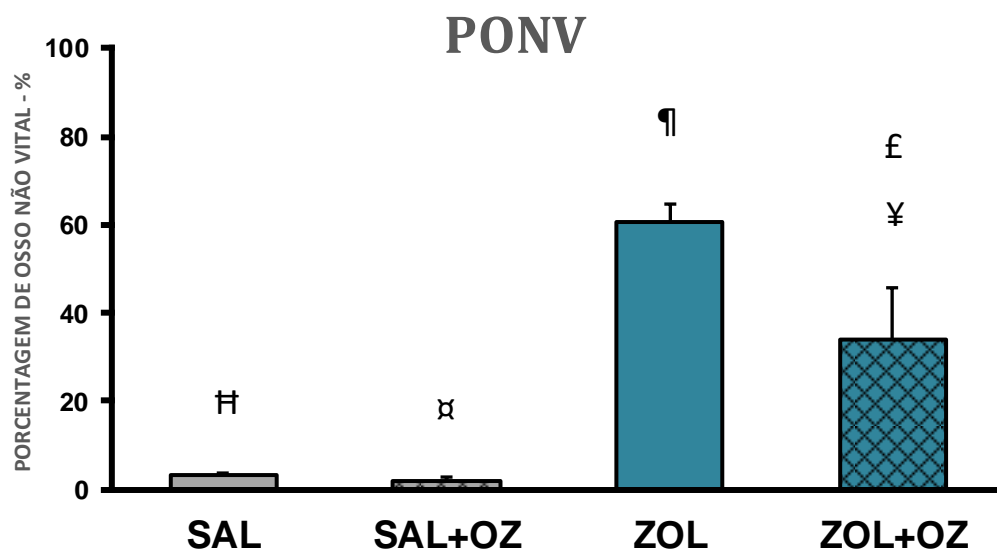


Figura 11. Representação gráfica das médias e desvio padrão da porcentagem de osso não vital em comparativo entre os grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. Onde "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ, "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL, "¥" representa diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ, "α" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ, "£" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL e "φ" representa diferença estatística entre SAL e SAL+OZ.

### 4.3 Imunoistoquímica

Após a realização da imunoistoquímica as lâminas foram fotomicrografadas e mensuradas quanto a expressão gênica de cada proteína. Para a expressão de **TNFα** e **IL-1β** nos respectivos grupos SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ, foi possível verificar escores mais elevados para os grupos ZOL e ZOL+OZ, notável nas fotomicrografias representativas com a elevada imunomarcagem para células e componentes inflamatórios, onde tanto o grupo ZOL,

quanto o grupo ZOL+OZ, apresentaram diferença estatística para com os grupos SAL e SAL+OZ ( $p < 0,05$ ). As fotomicrografias representativas podem ser vistas na Figura 12 ( $\text{TNF}\alpha$ ) e Figura 13 ( $\text{IL-1}\beta$ ). As medianas e as diferenças estatísticas estão apresentadas na Figura 14.

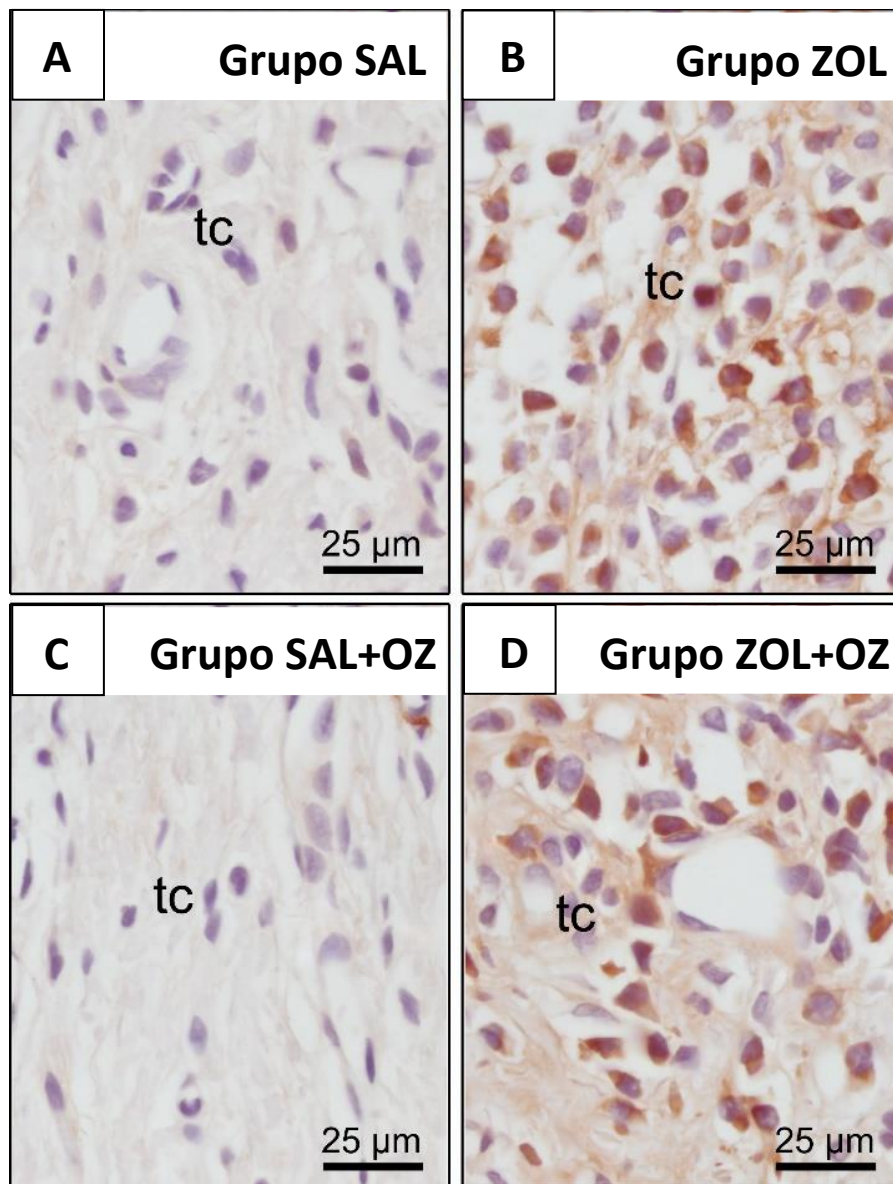


Figura 12. Imunomarcção para  $\text{TNF}\alpha$  no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental e adjacências aos 28 dias pós-operatórios. (A,B,C,D) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para  $\text{TNF}\alpha$  no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL (A), SAL+OZ (B), ZOL (C), ZOL+OZ (D). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo. Contra-coloração: hematoxilina. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25  $\mu\text{m}$ .

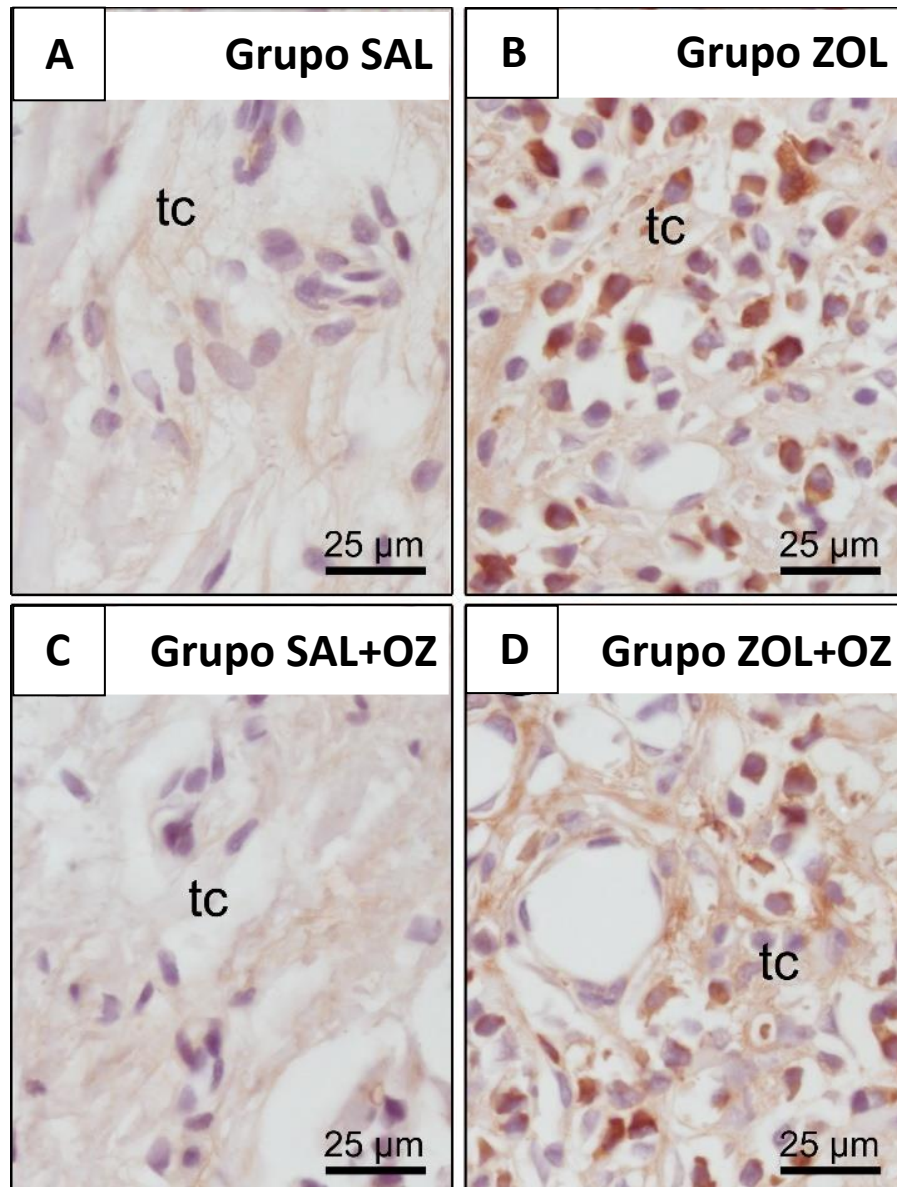


Figura 13. Imunomarcação para **IL-1 $\beta$**  no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental e adjacências aos 28 dias pós-operatórios. (**A,B,C,D**) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcação para IL-1 $\beta$  no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL (**A**), SAL+OZ (**B**), ZOL (**C**), ZOL+OZ (**D**). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo. Contra-colora o: hematoxilina. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25  $\mu$ m.

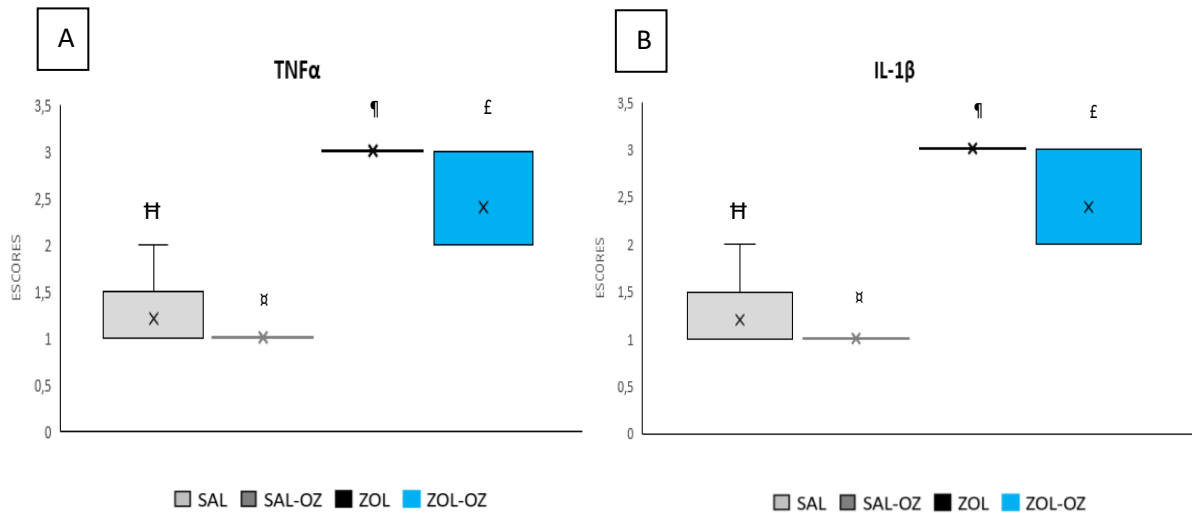


Figura 14. Representação gráfica da expressão gênica por escores das proteínas TNF $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B) em comparativo entre os grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. Onde "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ, "£" representa diferença estatística entre ZOL e SAL, "¤" representa diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ, "¤" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ, "¤" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL e "¤" representa diferença estatística entre SAL e SAL+OZ.

Para a expressão de **VEGF** e **OCN** foi possível verificar os menores escores para o grupo ZOL, visivelmente notado nas lâminas com a baixa imunomarcção das células endoteliais (Figura 15) e células osteoblásticas (Figura 16), com diferença estatística significativa para com os demais grupos, inclusive para o grupo ZOL+OZ ( $p < 0,05$ ), tanto para expressão de **VEGF** (A) quanto para **OCN** (B). As fotomicrografias representativas das expressões podem ser vistas nas Figuras 15 (VEGF) e Figura 16 (OCN). As medianas e diferenças estatísticas estão representadas na Figura 17.



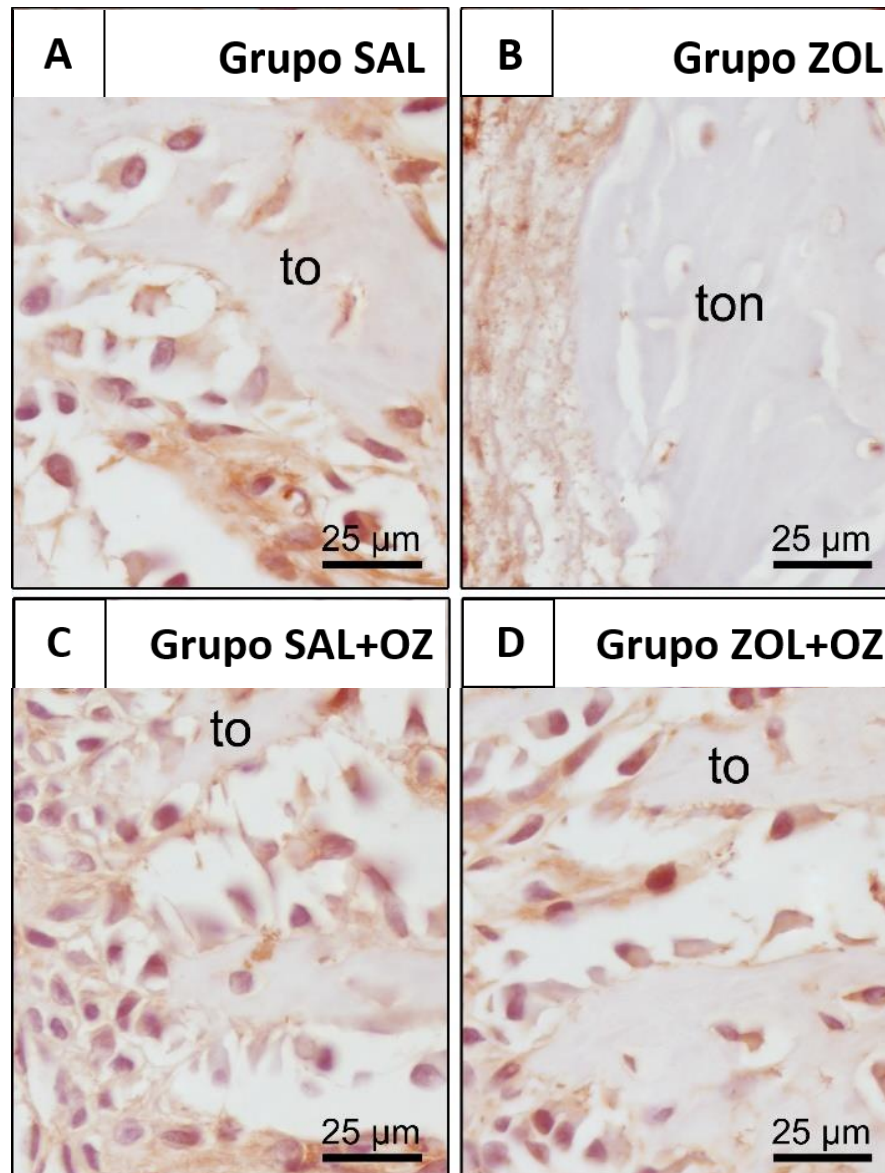


Figura 15. Imunomarcaco para **VEGF** no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extrao dental e adjacências aos 28 dias pós-operatórios. **(A,B,C,D)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcaco para VEGF no sítio de extrao dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL **(A)**, SAL+OZ **(B)**, ZOL **(C)**, ZOL+OZ **(D)**. Abreviaes e símbolos: tc, tecido conjuntivo. Contra-colorao: hematoxilina. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25  $\mu$ m.

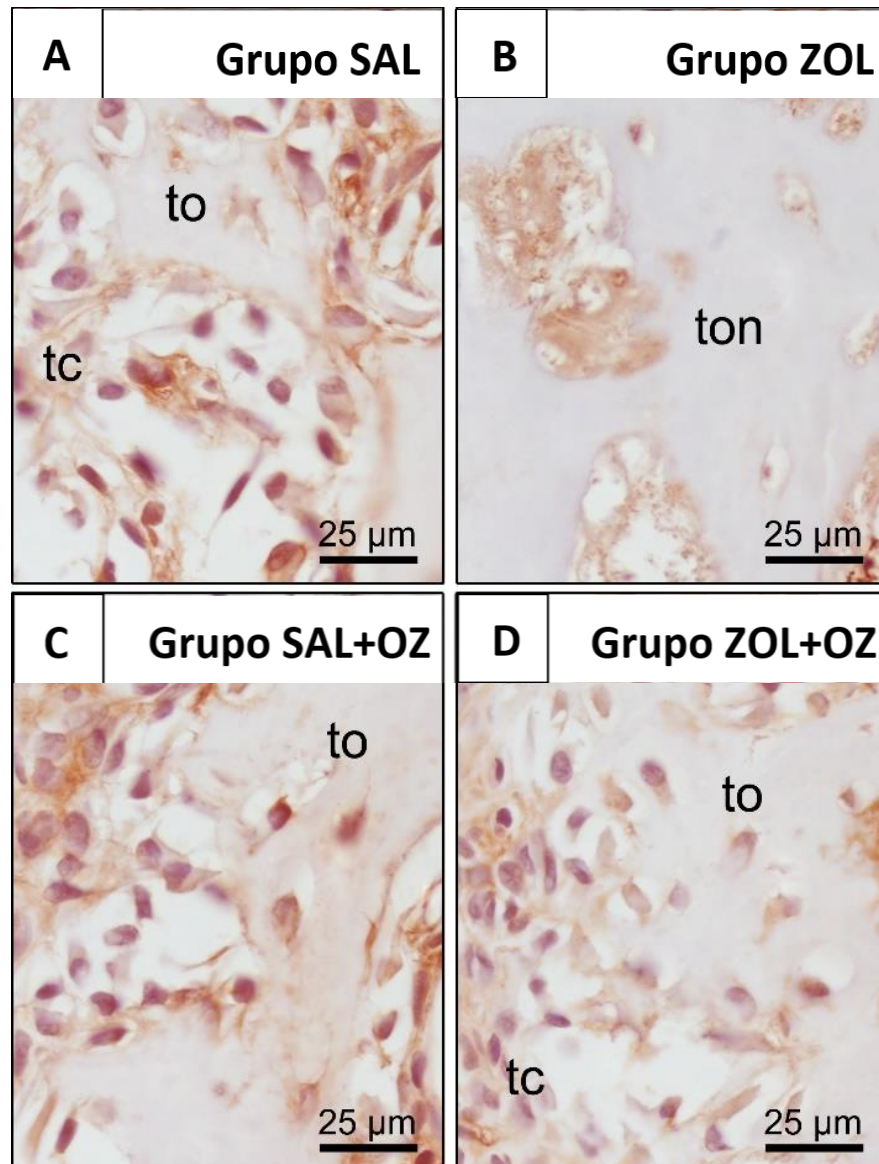


Figura 16. Imunomarcção para **OCN** no sítio de extração dental e adjacências aos 28 dias pós-operatórios. **(A,B,C,D)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para **OCN** no sítio de extração dental aos 28 dias pós- operatórios em **SAL (A)**, **SAL+OZ (B)**, **ZOL (C)**, **ZOL+OZ (D)**. Abreviações e símbolos: **tc**, tecido conjuntivo. Contra-coloração: hematoxilina. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.

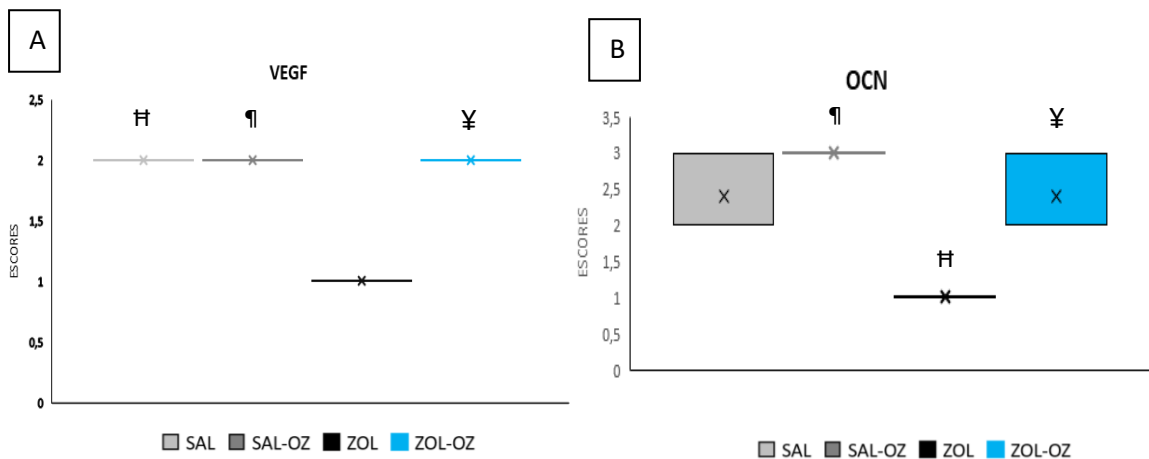


Figura 17. Representação gráfica da expressão gênica por escores das proteínas VEGF (A) e OCN (B) em comparativo entre os grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. Onde "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ, "H" representa diferença estatística entre ZOL e SAL, "¥" representa diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ, "¤" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ, "£" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL e "¢" representa diferença estatística entre SAL e SAL+OZ.

Por fim, na análise da expressão gênica de **TRAP**, quando compara os grupos experimentais, foi possível observar no tecido, maior quantia de osteoclastos marcados nos grupos controle (SAL e SAL+OZ) Do contrário foi obtido os menores escores para os grupos com tratamento de bifosfonatos (ZOL e ZOL+OZ), que tiveram a expressão gênica e portanto a sua marcação reduzida, os quais apresentaram diferença estatística, quando comparados aos grupos sem a utilização do zoledronato (SAL e SAL+OZ) ( $p < 0,05$ ). As fotomicrografias representativas estão apresentadas na Figura 18. As medianas e diferenças estatísticas podem ser observadas na Figura 19.

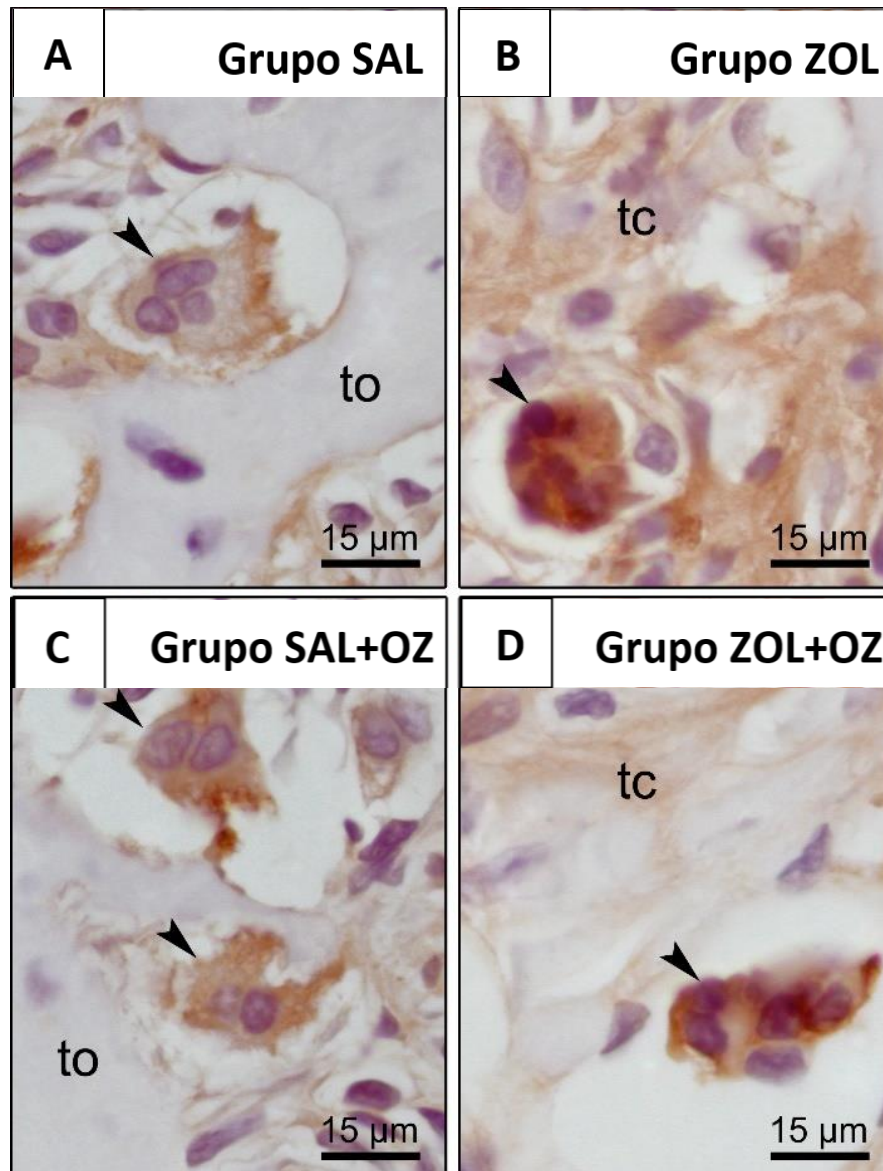


Figura 18. Imunomarcção para **TRAP** no sítio de extração dental e adjacências aos 28 dias pós-operatórios. (A,B,C,D) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP-positivas (osteoclastos) no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL (A), SAL+OZ (B), ZOL (C), ZOL+OZ (D). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo; Seta, osteoclasto. Contra-coloração: hematoxilina. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.

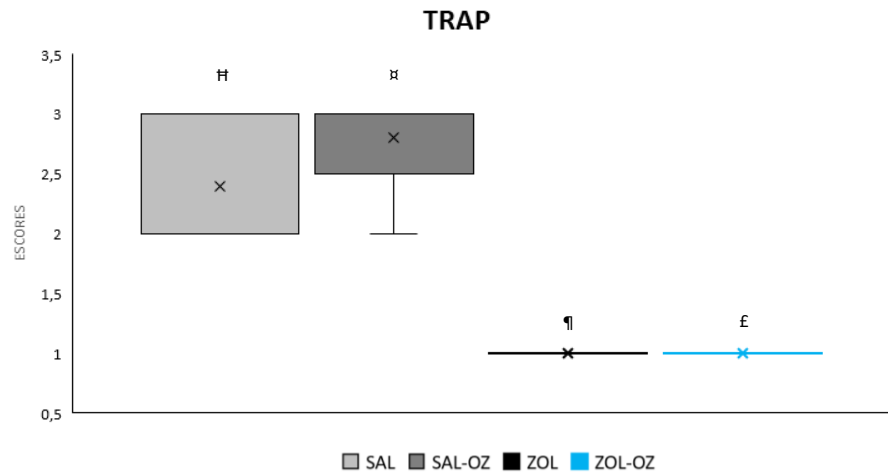


Figura 19. Representação gráfica da expressão gênica por escores da proteína TRAP em comparativo entre os grupos experimentais SAL, SAL+OZ, ZOL e ZOL+OZ. Onde "¶" representa diferença estatística entre ZOL e SAL+OZ, "H" representa diferença estatística entre ZOL e SAL, "¶" representa diferença estatística entre ZOL e ZOL+OZ, "α" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL+OZ, "£" representa diferença estatística entre ZOL+OZ e SAL e "φ" representa diferença estatística entre SAL e SAL+OZ.



# *Discussão*

## 5 DISCUSSÃO

Na literatura que envolve bifosfonatos e osteonecrose dos maxilares ainda não existe um consenso ou tratamento 100% eficaz e seguro para os pacientes que são acometidos pela osteonecrose dos maxilares [1,2,4,23,24]. O diagnóstico e os possíveis tratamentos são tabulados facilitando seu conhecimento, assim como sua fisiopatologia, que tendem a elucidar melhor a doença em si e auxiliar no desenvolvimento e aprimoração de novas terapias de tratamento e prevenção [1,2,23-25].

A ozonioterapia vem sendo estudada ao decorrer dos anos em outros países como alternativa terapêutica para a ONM-M [14,15,25-27]. Em países onde é amplamente permitido o uso da ozonioterapia, é possível a realização de estudos clínicos em humanos, o que vem trazendo resultados elucidadores quanto a eficácia, tolerabilidade e segurança de tal tratamento [25-28]. Tanto a insuflação do gás [24,25], como a aplicação local por suspensões, como óleos ozonizados [25] trazem dados promissores que incentivam o uso dessa terapia no tratamento de pacientes inclusive oncológicos, que são os que por vezes recebem as maiores doses de bifosfonatos [25-28].

No presente estudo, com os resultados apresentados pela análise da microtomográfica (MicroCT) foi possível averiguar as características ósseas dos animais antes do início da terapia com o bifosfonatos, representados pelo grupo MCT0 e após 3 semanas de aplicações no protocolo de aplicação de 3 em 3 dias, representados pelo grupo MCT1ZOL, com seu grupo controle MCT1SAL, que receberam apenas solução salina no mesmo protocolo de aplicação. Os animais tanto no período inicial como após 3 semanas, apresentaram consistência nos valores volumétricos, principalmente no quesito densidade óssea, independente do tratamento proposto. Isso pode ser justificado pelo tempo efetivo da medicação para reorganização da arquitetura óssea por completa,[29] que alteraria a densidade e demais parâmetros volumétricos, fato esse que pode ser comparado aos períodos seguros ou menos susceptíveis para a incidência da osteonecrose dos maxilares, após o início da utilização dos bifosfonatos, que em humanos, dependendo da dose e da potência do bifosfonatos, pode variar de 3 mês a 6 meses.[29-31]

Quando comparamos os animais agora do grupo experimental que passaram pela terapia de aplicação de zoledronato, por 7 semanas ininterruptas, grupo ZOL, e o grupo controle que recebeu apenas solução salina pelas mesmas 7 semanas, ficou evidente a alteração na arquitetura óssea, advinda do bifosfonato, onde o osso do grupo ZOL apresentou

densidade e os parâmetros volumétricos muito maiores quando comparados ao grupo SAL, com diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ). O que valida novamente a hipótese de que o bifosfonato juntamente com a própria fisiologia óssea levam determinado tempo para que a reestruturação da arquitetura óssea ocorra nesses organismos.[29-31]

Ainda quanto aos resultados microtomográficos dos grupos experimentais tanto a análise do volume ósseo (Bv) quanto da porosidade total (Po.Tot) da área de interesse foi possível constatar diferença, hora relevante estatisticamente, hora não relevante ( $p = 0,07$ ), quando comparamos os grupos ZOL e ZOL+OZ, o que nos demonstra efetividade ou pelo menos tendência de atuação da terapia com ozônio nessa modulação da arquitetura óssea, onde mesmo com a incidência forte do zoledronato na densidade óssea, o ozônio sistemicamente atua freando ou modulando essa “petrificação” óssea.[32,33]

Importante salientar aqui que os altos valores dos parâmetros ósseos encontrados nas microtomografias do grupo ZOL, não devem ser lidos como altos valores de osso saudável, ou tampouco, osso vital, assim como demais exames radiográficos, evidenciam a densidade do osso e a partir disso é possível estabelecer os demais parâmetros volumétricos, portanto essa quantificação óssea pode ser tanto de osso vital, como de osso não vital, como por exemplo, no caso da osteonecrose dos maxilares, quando temos o osso com sequestros ósseos, estes aparecem de forma densa nos exames radiográficos, mesmo sendo material não mais vital.[4,6,34,35]

Ponto esse que ficou evidente na análise histométrica das amostras dos grupos experimentais, onde o grupo ZOL apresentou maiores volumes de tecido ósseo não vital quando comparado aos demais grupos, característica essa que pode ser classificada como osteonecrose dos maxilares relacionada a medicações,[1,2,4,6,34] correlacionando com a maior rapidez do metabolismo do rato, 2-3 semanas apresentando o osso nessas características equivaleria a mais de 8 semanas de sintomatologia em humanos.[16,36] Diferente do grupo SAL e grupo SAL+OZ, onde os valores para PONV ficaram irrisórios, demonstrando boa resposta do organismo frente ao trauma local, que no presente estudo, foi a extração dentária, associada previamente a periodontite experimental.[11,32,33]

Seguindo a questão de detecção de osso não vital e seus componentes pró-inflamatórios envolvendo a expressão dos genes  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$ , as análises imunoistoquímicas evidenciaram valores muito elevados para os grupos tratados com os bifosfonatos (ZOL e ZOL+OZ)( $p < 0,05$ ), evidenciando e transparecendo o ambiente com



necessidades de combate a agentes patógenos e ativação de células do sistema imune, [37,38] buscando homeostase, a qual não é atingida em ambiente com células e estruturas necrosadas, onde esse tecido não vital, atrai células inflamatórias e sua exacerbação acarreta em dados teciduais ainda mais extensos, o que associado a cavidade rica em micro-organismos, torna-se a receita para o desenvolvimento e avanço da osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de medicamentos.[1,2,4,6,14-16]

Quando falamos na questão do turnover ósseo, que está relacionado diretamente com a atividade e homeostase entre osteoblastos e osteoclastos, que em condições fisiológicas se dá justamente por equilíbrio, nos organismos que são expostos aos bifosfonatos esse turnover é drasticamente afetado, como pode ser traduzido pela análise da expressão gênica da osteocalcina (OCN) e da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) nos grupos experimentais ZOL e ZOL+OZ.[37,39,40] Estes apresentaram valores inferiores no quesito OCN e TRAP quando comparados aos demais grupos. Isso pode ser lido como deficiência na deposição e mineralização óssea por parte dos osteoblastos, que quando ativos são os principais secretores da OCN, já quanto a expressão de TRAP, que em condições fisiológicas é secretada principalmente pelos osteoclastos em função, nos mesmos grupos submetidos ao zoledronato, apresentaram os menores valores de sua expressão, o que pode ser analisado como a ausência de atividade osteoclástica. Trazendo para esses ossos em questão o panorama de osso estático, sem resposta aos estímulos externos, que termina com o seu deterioramento e morte tecidual.[37,40]

Nesse mesmo aspecto, fato relevante é que o grupo ZOL+OZ apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo ZOL no quesito expressão gênica de OCN e também não apresentou diferença estatística significativa quando comparada ao grupo SAL.[40] O que pode ser visto como efetividade na ativação dos osteoblastos e de suas funções por parte da terapia de ozônio e que traria novamente para o osso estático, um indício inicial de vitalidade. Fato esse que pode ser linkado diretamente com os valores encontrados na histometria de PONF e PONV, onde mesmo com a atuação expressiva do zoledronato a terapia com ozônio se mostrou capaz de reduzir a quantidade de tecido ósseo não vital e aumentar a presença de osso neoformado em resposta ao trauma local, quando comparado com o grupo ZOL.[32,33,39]

Finalizando os resultados imunoistoquímicos, a expressão gênica de VEGF trouxe valores que corroboram novamente com nossos demais achados, que evidenciam para o grupo ZOL densidade óssea elevada, não vital e avascular.[41] Os grupos SAL e SAL+OZ

obtiveram as maiores marcações para VEGF, seguido do grupo ZOL+OZ e por último pelo grupo ZOL, fato esse que indica a ausência de vascularização no grupo ZOL, fator esse crucial para a irrigação dos tecidos e das células, assim como o transporte de citocinas, demais células e o principal oxigênio consumido por esse organismo.[32,3,41] Um dado que chama atenção aqui é a diferença estatística encontrada no grupo ZOL+OZ para com o grupo ZOL ( $p<005$ ), onde a terapia de ozônio aumentou a expressão gênica de VEGF, traduzindo isso em neovasclogênese, mais aporte sanguíneo para o tecido ósseo, diminuindo a densidade quase patológica do osso causada pelo zoledronato, levando novas células e precursores para a região, que podem sofrer diferenciação e se tornarem osteoblastos, correlacionado assim, com as expressões de OCN também.[33,41]

Os dados encontrados para o grupo ZOL em todas as análises, apresentou um osso característico sem vitalidade, onde muitas das suas lacunas onde deveriam estar presentes osteócitos ou células da linhagem osteogênica se apresentavam vazios ou apenas com remanescentes e resíduos dessas células, traduzindo isso em um osso sem vitalidade, que não possui as mesmas respostas biológicas que um osso convencional e muito menos a capacidade adaptativa e responsiva para traumas e suporte de cargas fisiológicas. O que acarreta clinicamente no desenvolvimento da osteonecrose, que no presente trabalho é correlacionado com a medicação em doses oncológicas adaptadas do bifosfonato zoledronato.[6,11,15-17]

Especificamente falando dos animais que foram submetidos a terapia com ozônio, SAL+OZ e ZOL+OZ, esses apresentaram uma característica de maior neoformação óssea quando comparada com seus pares sem o tratamento. Isso provavelmente se dá, devido as características da bioativação das células com a elevação dos níveis energéticos das células, que estimulam a diferenciação celular, a produção de energia para essas células entre outras repercussões fisiocitológica [15,16]. Além disso, suas propriedades antioxidantes, mantém as células mais jovens e saudáveis quando comparadas as sem tratamento, sem falar na capacidade neoangiogênica, que estimula a formação de novos vasos que futuramente transportam tanto células constitutivas como também a oxigenação imprescindível para o tecido. E por último as propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antivirais, eliminam as possíveis barreiras que impediriam o desenvolvimento e reparação desse tecido [3-9], que nos animais sem a aplicação de ozônio, é inundado de micro-organismos patogênicos, principalmente quando observados a osteonecrose, que resulta em infecção generalizada do osso local, com presença de extensa supuração, prurido, mal odor e dor [1-6].

Em todas as publicações, emerge um tópico: a necessidade de novos estudos, em especial os estudos controlados, de estudos pré-clínicos, visando trazer embasamento fidedigno para a utilização do ozônio como terapia na osteonecrose dos maxilares [23-28,33]. Principalmente no que se trata de dosagens e métodos de aplicação [25,27]. O que enaltece os resultados da atual pesquisa, onde as investigações animais permitem o entendimento do comportamento biológico nas alterações fisiopatológicas, por meio de análises que se complementam, visto que as pesquisas clínicas muitas vezes não possibilitam total elucidação da doença.

A utilização da ozonioterapia como alternativa terapêutica nos casos de osteonecrose relacionado a medicações se mostrou eficiente na manutenção do tecido ósseo vital, aumento da vascularização local, assim como no auxílio do quesito, reparação tecidual, tanto nos animais que passaram pelo protocolo de medicação oncológica (zoledronato - ZOL+OZ), como os animais controle que já possuem certa defasagem nesses níveis de reparação óssea e densidade óssea (SAL+OZ). O que corrobora com diversas literaturas, com estudos clínicos, onde é permitido a experimentação e utilização dessa terapia [9-14,23-28].

Esses dados estimulam mais investigações e trabalhos visando a consolidação desses resultados em outras concentrações e outras modalidades, trazendo o benefício da ozonioterapia em tantos pacientes que poderiam ser beneficiados com tais propriedades reparacionais e fisiológicas. Criando novos protocolos e até novos meios de dispersão desse  $O^3$ .

*Conclusão*



## 6 CONCLUSÃO

Dentro das limitações desse estudo *in vivo*, foi possível concluir que o tratamento com ozonioterapia foi efetivo no controle da osteonecrose relacionado aos medicamentos, apresentando modulação na área de osso neoformado, diminuição do tecido ósseo não vital, melhorou a vascularização local, modulou as respostas inflamatórias dos tecidos e subsidiou melhores parâmetros volumétricos para os grupos em uso do protocolo de tratamento. Além disso, se provou benéfico também no grupo que não foi submetido ao bifosfonato, melhorando a sua resposta óssea ao trauma sofrido.

Em síntese a terapia com ozônio apresenta resultados promissores e encorajadores para que novas pesquisas sejam realizadas e que possíveis protocolos possam ser aplicados em pacientes com ONM-M.

## *Referências*



## REFERÊNCIAS

- [1] S.L. Ruggiero, T.B. Dodson, L.A. Assael, R. Landesberg, R.E. Marx, B. Mehrotra, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: 2009 update, *Aust Endod J* 35 (2009) 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2009.01.009>.
- [2] M. Scoletta, P.G. Arduino, P. Dalmaso, R. Broccoletti, M. Mozzati, Treatment outcomes in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a prospective study, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110 (2010) 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.02.020>.
- [3] T. Van den Wyngaert, T. Claeys, M.T. Huizing, J.B. Vermorcken, E. Fossion, Initial experience with conservative treatment in cancer patients with osteonecrosis of the jaw (ONJ) and predictors of outcome, *Ann Oncol* 20 (2009) 331–336. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn630>.
- [4] A.A. Khan, A. Morrison, D.L. Kendler, R. Rizzoli, D.A. Hanley, D. Felsenberg, L.K. McCauley, F. O’Ryan, I.R. Reid, S.L. Ruggiero, A. Taguchi, S. Tetradis, N.B. Watts, M.L. Brandi, E. Peters, T. Guise, R. Eastell, A.M. Cheung, S.N. Morin, B. Masri, C. Cooper, S.L. Morgan, B. Obermayer-Pietsch, B.L. Langdahl, R. Al Dabagh, K.S. Davison, G.K. Sándor, R.G. Josse, M. Bhandari, M. El Rabbany, D.D. Pierroz, R. Sulimani, D.P. Saunders, J.P. Brown, J. Compston, International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw, Case-based review of osteonecrosis of the jaw (ONJ) and application of the international recommendations for management from the international task force on ONJ, *J Clin Densitom* 20 (2017) 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2016.09.005>.
- [5] K. McGowan, T. McGowan, S. Ivanovski, Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review, *Oral Dis* 24 (2018) 527–536. <https://doi.org/10.1111/odi.12708>.
- [6] S. Otto, C. Schreyer, S. Hafner, G. Mast, M. Ehrenfeld, S. Sturzenbaum, C. Pautke, Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment, *J Craniomaxillofac Surg* 40 (2012) 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2011.05.003>.

- [7] R. Gomez Font, M.L. Martinez Garcia, J.M. Olmos Martinez, Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments. Update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13 (2008) E318-E124.
- [8] R.E. M, Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic, *J Oral Maxillofac Surg* 61 (2003) 1115–1117. [https://doi.org/10.1016/s0278-2391\(03\)00720-1](https://doi.org/10.1016/s0278-2391(03)00720-1).
- [9] S.K. Buyuk, S.I. Ramoglu, M.F. Sonmez, The effect of different concentrations of topical ozone administration on bone formation in orthopedically expanded suture in rats, *Eur J Orthod* 38 (2016) 281-285. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjv045>.
- [10] F. Erdemci, Y. Gunaydin, M. Sencimen, I. Bassorgun, M. Ozler, S. Oter, A. Gulses, A. Gunal, S. Sezgin, G.R. Bayar, N. Dogan, I.K. Gider, Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats, *Int J Oral Maxillofac Surg* 43 (2014) 777-783. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2013.12.007>.
- [11] H. Ozdemir, H. Toker, H. Balci, H. Ozer, Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats, *J Periodontal Res* 48 (2013) 722-726. <https://doi.org/10.1111/jre.12060>.
- [12] H. Toker, H. Özdemir, T.E. Kuzu, H. Özer, The effects of allograft combined with ozone therapy on regeneration of calvarial defects in rats, *Cumhuriyet Dent J* 19 (2017) 205-.
- [13] R. Gonenci, M. Tabur, S.Y. Ozsoy, Preventive and curative effects of medical ozone in rats exposed to experimental osteomyelitis. *Pakistan Vet J* 37 (2017) 355-359.
- [14] B. Kan, M. Sencimen, G.R. Bayar, P. Korkusuz, A.T. Coskun, A. Korkmaz, E. Bahador, T. Zerener, Histomorphometric and microtomographic evaluation of the effects of hyperbaric oxygen and systemic ozone, used alone and in combination, on calvarial defect healing in rats, *J Oral Maxillofac Surg* 73 (2015) 1231.e1-1231.e10. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2015.02.018>.
- [15] C. Statkiewicz, L.F. Toro, J.M. Mello-Neto, D.P. Sa, C.A. Casatti, J.P.M. Issa, L.T.A. Cintra, J.M. Almeida, M.J.H. Nagata, V.G. Garcia, L.H. Theodoro, E. Ervolino, Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats, *J Photochem Photobiol B* 184 (2018) 7-19. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.05.004>.



- [16] E. Ervolino, C. Statkiewicz, L.F. Toro, J.M. Mello-Neto, T.P. Cavazana, J.P.M. Issa, R.C.M. Dornelles, J.M. Almeida, M.J.H. Nagata, R. Okamoto, C.A. Casatti, V.G. Garcia, L.H. Theodoro, Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate, *Bone* 120 (2019) 101-113. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.10.014>.
- [17] L.F. Toro, J.M. Mello-Neto, F. Santos, L.C. Ferreira, C. Statkiewicz, L.T.A. Cintra, J.P.M. Issa, R.C.M. Dornelles, J.M. Almeida, M.J.H. Nagata, V.G. Garcia, L.H. Theodoro, C.A. Casatti, E. Ervolino, Application of autologous platelet-rich plasma on tooth extraction site prevents occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws in rats, *Sci Rep* 9 (2019) 22. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37063-y>.
- [18] M. Song, A. Alshaikh, T. Kim, S. Kim, M. Dang, S. Mehrazarin, K.H. Shin, M. Kang, N.H. Park, R.H. Kim, Preexisting periapical inflammatory condition exacerbates tooth extraction-induced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw lesions in mice, *J Endod* 42 (2016) 1641-1646. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.07.020>.
- [19] V.G. Garcia, M. Longo, E.C. Gualberto Júnior, A.F. Bosco, M.J. Nagata, E. Ervolino, L.H. Theodoro, Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats, *J Periodontal Res* 49 (2014) 584-594. <https://doi.org/10.1111/jre.12138>.
- [20] V. Thumbigere-Math, B.S. Michalowicz, J.S. Hodges, M.L. Tsai, K.K. Swenson, L. Rockwell, R. Gopalakrishnan. Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw, *J Periodontol* 85 (2014) 226-233. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130017>.
- [21] T.L. Aghaloo, B. Kang, E.C. Sung, M. Shoff, M. Ronconi, J.E. Gotcher, O. Bezouglaia, S.M. Dry, S. Tetradis, Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat, *J Bone Miner Res* 26 (2011) 1871-1882. <https://doi.org/10.1002/jbmr.379>.  
(2019) 22. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37063-y>.
- [22] J.W. MacKay, P.J. Murray, B. Kasmai, G. Johnson, S.T. Donell, A.P. Toms, Subchondral bone in osteoarthritis: association between MRI texture analysis and histomorphometry, *Osteoarthritis Cartilage* 25 (2017) 700-707. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.12.011>.

- [23] Y. Endo, H. Kumamoto, M. Nakamura, S. Sugawara, T. Takano-Yamamoto, K. Sasaki, T. Takahashi, Underlying mechanisms and therapeutic strategies for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ), *Biol Pharm Bull* 40 (2017) 739-750. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-01020>.
- [24] M. El-Rabbany, A. Sgro, D.K. Lam, P.S. Shah, A. Azarpazhooh, Effectiveness of treatments for medication-related osteonecrosis of the jaw: a systematic review and meta-analysis. *J Am Dent Assoc* 148 (2017) 584-594.e2. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2017.04.002>.
- [25] C.I. Ripamonti, E. Cislighi, L. Mariani, M. Maniezzo, Efficacy and safety of medical ozone (O<sub>3</sub>) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: preliminary results of a phase I-II study. *Oral Oncol* 47 (2011) 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.01.002>.
- [26] A. Agrillo, F. Filiaci, V. Ramieri, E. Riccardi, D. Quarato, C. Rinna, P. Gennaro, F. Cascino, V. Mitro, C. Ungari, Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): 5 year experience in the treatment of 131 cases with ozone therapy, *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16 (2012) 1741-1747.
- [27] C.I. Ripamonti, M. Maniezzo, S. Boldini, M.A. Pessi, L. Mariani, E. Cislighi, Efficacy and tolerability of medical ozone gas insufflations in patients with osteonecrosis of the jaw treated with bisphosphonates-Preliminary data: Medical ozone gas insufflation in treating ONJ lesions, *J Bone Oncol* 1 (2012) 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2012.08.001>.
- [28] C.I. Ripamonti, M. Maniezzo, M.A. Pessi, S. Boldini, Treatment of osteonecrosis of the jaw (ONJ) by medical ozone gas insufflation: a case report, *Tumori* 98 (2012) 72e-75e. <https://doi.org/10.1700/1125.12414>.
- [29] D.L. Diab, N.B. Watts. Bisphosphonate drug holiday: who, when and how long. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2013;5(3):107-111. doi:10.1177/1759720X13477714
- [30] H.G. Bone, D. Hosking, J.P. Devogelaer, J.R. Tucci, R.D. Emkey, R.P. Tonino, J.A. Rodriguez-Portales, R.W. Downs, J. Gupta, A.C. Santora, U.A Liberman; Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 2004 Mar 18;350(12):1189-99. doi: 10.1056/NEJMoa030897.

- [31] D.M Black, D.C Bauer, A.V. Schwartz, S.R. Cummings, C.J. Rosen. Continuing bisphosphonate treatment for osteoporosis--for whom and for how long?. *N Engl J Med.* 2012;366(22):2051-2053. doi:10.1056/NEJMp1202623
- [32] H. Ozdemir, H. Toker, H. Balçı, H. Ozer. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. *J Periodontal Res.* 2013;48(6):722-726. doi:10.1111/jre.12060
- [33] Y. Endo , H. Kumamoto, M. Nakamura, S. Sugawara, T. Takano-Yamamoto, K. Sasaki, T. Takahashi. Underlying Mechanisms and Therapeutic Strategies for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ). *Biol Pharm Bull.* 2017;40(6):739-750. doi: 10.1248/bpb.b16-01020.
- [34] S.J.R. Martelli, M.F. Damian, A.P.N. Gomes, A.R. Schinestsck, E.R.A. Silva, A.C.U. Vasconcelos. Comparison of effects of zoledronic acid and clodronate on the bone structure: imaginological and histomorphometrical study in vivo. *J Oral Pathol Med.* 2017 Sep;46(8):632-636. doi: 10.1111/jop.12546.
- [35] K. Abe, Y. Yoshimura, Y. Deyama, T. Kikuri, T. Hasegawa, K. Tei, H. Shinoda, K. Suzuki, Y. Kitagawa. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med.* 2012 Jun;29(6):1007-15. doi: 10.3892/ijmm.2012.952.
- [36] F.A. Syed, Ng AC. The pathophysiology of the aging skeleton. *Curr Osteoporos Rep.* 2010 Dec;8(4):235-40. doi: 10.1007/s11914-010-0035-y. (PROP OSSO)
- [37] J.W. Kim, I.H. Cha, S.J. Kim, M.R Kim. Biomarkers for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016 Apr;18(2):281-91. doi: 10.1111/cid.12297.
- [38] Y.M. Souza , B. Fontes, J.O. Martins, P. Sannomiya, G.S. Brito, R.N Younes, S. Rasslan. (2010). Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats. *Clinics*, 65(2), 195-202. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322010000200012>
- [39] A. Naidu, P.C. Dechow., R. Spears, J.M. Wright, H.P. Kessler, L.A. Opperman. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2008;106(1), 5-13.

- [40] X. Huang, S. Huang, F. Guo, F. Xu, P. Cheng, Y. Ye, Y. Dong, X. Wang, A. Chen. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. *Mol Med Rep.* 2016 Jan;13(1):613-22. doi: 10.3892/mmr.2015.462
- [41] D.B. Kimmel. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Dent Res.* 2007 Nov;86(11):1022-33. doi: 10.1177/154405910708601102.
- [42] F.G. Basso, A.P. Silveira Turrioni, J. Hebling, C.A. de Souza Costa. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology.* 2013;59(6):534-41. doi: 10.1159/000351194.

*Anexos*



## ANEXOS

## ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação da ozonioterapia no tratamento de osteonecrose induzida por zoledronato em ratas senis", Processo FOA nº 00498-2019, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 25 de Junho de 2019.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 01 de Julho de 2021.


**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 01 de Agosto de 2021.

## CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Ozone therapy evaluation in the treatment of zoledronate induced osteonecrosis in senile rats", Protocol FOA nº 00498-2019, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 25, 2019.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** July 01, 2021.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** August 01, 2021.

  
Prof. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira  
Vice-Coordenador da CEUA  
CEUA Vice-Coordinator

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

## ANEXO B - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO SEGUNDO O PERIÓDICO BONE

<https://www.elsevier.com/journals/bone/8756-3282/guide-for-authors>

### Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

**To find out more, please visit the Preparation section below.**

### *Types of article*

Types of articles Bone accepts include:

- 1) Memoriam
- 2) Editorial or Commentary
- 3) Review
- 4) Original Articles
- 5) Rapid Communication
- 6) Case Report
- 7) Technical Note
- 8) Letters and Response to Letter to the Editor
- 9) Erratum/Corrigendum
- 10) Announcements

There are no length or format requirements other than those already shown on the GFA under Article Structure.

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources

(including the Internet)

- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements



## Before You Begin

### Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

### Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

### Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was



carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

### **Preprints**

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

### **Author contributions**

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

### **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor

considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### **Article transfer service**

his journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

### **Elsevier supports responsible sharing**

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

**Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Open access**

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

### **Elsevier Researcher Academy**

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

## **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### **Referees**

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



## **Preparation**

### **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### **References**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### **Formatting requirements**

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

### **Figures and tables embedded in text**

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

## **Peer review**

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

## **REVISED SUBMISSIONS**

### ***Use of word processing software***

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

#### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### ***Material and Methods***

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Since there are significant differences in skeletal structure and remodeling between the sexes and strains, it is essential that all animal studies report the age, sex, and strain (e.g., C57BL/6) of animals used.

#### ***Key Resources Table***

To enable reproducibility of the research, we encourage authors to submit a Key Resources Table, which helps make the resources clear to readers. The Key Resources Table highlights the genetically modified organisms and strains, cell lines, reagents and other resources essential to reproduce the results presented in a paper. More information is available here <https://www.elsevier.com/authors/author-resources/key-resources-table>

#### ***Theory/calculation***

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### ***Results***

Results should be clear and concise.

### **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### **Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Highlights**

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### **Graphical abstract**

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents

of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Formatting of funding sources**

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Genbank**

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

### **Electronic artwork**

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol,

Courier.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### **Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

#### **Illustration services**

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

#### **Figure captions**

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

## Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

## References

### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.



### **Reference management software**

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/bone>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### **Reference formatting**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### **Reference style**

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, *Cancer statistics reports for the UK*.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

#### **Journal abbreviations source**

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word](#)

[Abbreviations](#).

#### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

#### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

#### **Data linking**

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### **Mendeley Data**

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

### **Data**

### **statement**

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).



### **After Acceptance**

**Online proof correction** To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.