

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 17/08/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

MAÍSA PEREIRA DA SILVA

**ESTUDO IN VIVO DO EFEITO DA OZONIOTERAPIA COMO PREVENÇÃO E/OU
TRATAMENTO DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR
MEDICAMENTOS**

ARAÇATUBA
2023

MAÍSA PEREIRA DA SILVA

**ESTUDO IN VIVO DO EFEITO DA OZONIOTERAPIA COMO PREVENÇÃO E/OU
TRATAMENTO DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR
MEDICAMENTOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para a obtenção do grau de “Mestre em Odontologia” – Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial.

Orientador: Prof. Dr. Francisley Ávila de Souza.

ARAÇATUBA
2023

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586e Silva, Maísa Pereira da.
Estudo in vivo do efeito da ozonioterapia como prevenção e/ou tratamento da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos / Maísa Pereira da Silva. – Araçatuba, 2023
78 f. : il. ; graf.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Francisley Ávila Souza

1. Osteonecrose 2. Ozônio 3. Difosfonatos 4. Alvéolo dental I. T.

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Este trabalho dedico a minha família. Primeiramente dedico, a base da minha família, aos meus avós. Ana Alves da Costa (*in memorian*), Fulgêncio Pereira da Costa (*in memorian*), Joaquina Benedita Pereira da Silva (*in memorian*) e Luiz Pereira da Silva, que em todos os momentos se orgulharam e incentivaram que eu me dedicasse aos estudos e assim ser a primeira da família a fazer uma pós-graduação. Obrigada por tudo.

Aos meus pais, que em toda a minha vida não mediram esforços para que alcançasse meus objetivos. A eles que sonharam os meus sonhos, confortaram as minhas derrotas e celebraram as minhas conquistas, e foram fortaleza quando eu não aguentava mais. Ao meu pai, Gilberto Pereira da Silva, que me acompanhou em todos os momentos de viagens desde a prova do vestibular à matrícula da residência e do mestrado, por não medir esforços e me acompanhar em cada fase. A minha mãe, Isabel Pereira da Costa Silva, que sempre foi meu suporte emocional e minha fonte de renovar as baterias, a pessoa que sempre me manteve firme mesmo quando minha fé já não existia. Obrigada por tudo.

E dedico também ao meu irmão, Luiz Felipe Pereira da Silva, que apesar de ser o meu pequeno, é um dos meus maiores torcedores e um dos meus protetores, anjo da guarda, que mesmo a distância tenta me proteger de tudo e estar acompanhando o que acontece na minha vida. Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente agradeço a Deus. Obrigada por tudo Senhor, por ter me proporcionado resiliência durante estes meses de pós-graduação. Por ter sido meu encontro de conforto em muitos momentos, por ter guiado e protegido a mim e minha família.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Francisley Ávila Souza, pela oportunidade e ter me orientado durante esta etapa, pela confiança e pelos desafios a mim impostos. Pela ajuda em muitos momentos, colaborando para que chegássemos ao fim desta etapa;

Ao meu grande professor da graduação, inspiração e incentivador, Prof. Dr. Edevaldo Tadeu Camarini, uma das pessoas importantes nesta minha jornada até aqui, e que me levou a escolher FOA-UNESP para a pós-graduação Strictu Sensu. Obrigada pelas oportunidades, pelas orientações, pelas cobranças, pelos ensinamentos em todos os momentos na base da minha formação.

Ao querido e não apenas professor, mas amigo, Prof. Dr. Eduardo Hochulli, pessoa que tive a oportunidade de conhecer na graduação, e inspirada nas suas técnicas cirúrgicas retornei à FOAR-UNESP para poder aprender com o senhor por um ano. Obrigada por não ter sido apenas um professor, mas por ter me orientado e com quem pude ter conversas francas no meu caminho a residência em cirurgia.

Aos meus pais e irmão por entenderem a minha ausência e apoiarem nesta etapa, dando o suporte mesmo que a distância. Obrigada por tudo, por sonharem meus sonhos e conquistarem eles comigo;

Ao meu namorado e amigo Ricardo Leite de Sousa, que tem estado comigo nestes últimos meses me dando apoio em todos meus planos e projetos, e suportando cada obstáculo e dando apoio para que eu possa enfrentá-los;

As minhas amigas de graduação, cursinho e da vida, Ana Barbisan, Eliza Montenegro, Fernanda Andreassa, Glaucia Orsini, Isadora Mecca e a eterna dupla Jéssica Behrens. Aos meus amigos de infância, Amanda Lido, Amanda Pagianotto, André Munhoz Direnzi, Erica Fernandes Mota, Fernando Favoretto, Franciele Santos, Luane Alvarenga, Marcela Pagianotto Bidóia, Matheus Bernardes Amim que mesmo com o tempo e distância me apoiam e compartilham as vitórias e sonhos comigo. A minha grande amiga e irmã, Mariana Granucci, com quem compartilhei os momentos de residência, e planos e sonhos profissionais, minha confidente, meu muito

obrigada. A todos vocês com quem compartilho os estresses, e que trazem leveza no meu dia a dia por mensagens, meu muito obrigada;

Aos meus colegas de mestrado, mas principalmente as que compartilharam os momentos bons e ruins, Natalia Sanches e Izabela Sol, que me ajudaram muito e foram sempre minha rede de apoio. Muito obrigada por tudo e vamos juntas até o doutorado.

Ao meu grupo de pesquisa Ana Flávia, Paulo Matheus, Nelson Silva e Harrison Lucho, meu muito obrigada;

Em especial as meninas do grupo de pesquisa Laís Kawamata e Maria Eduarda Freitas por toda a ajuda neste meu projeto, por ter compartilhados os momentos bons e difíceis. Muito obrigada pela ajuda na execução da confecção dos resultados aqui mostrados;

Ao meu grande amigo neste grupo de pesquisa e coorientador por consideração, Henrique Hadad, por me ajudar em todos os momentos, por ser calma nos meus momentos de estresse, e ser riso nos momentos de desespero;

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -UNESP, na pessoa do seu Diretor, Prof. Glauco Issamu pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Odontologia.

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. Tit. Wirley Gonçalves Assunção, como coordenador do programa de pós-graduação em Odontologia. Por tornarem possível toda a pesquisa e o meu desenvolvimento no mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/Brasil - Código de Financiamento 001. Pela bolsa mestrado CAPES-DS concedida durante estes dois anos.

Ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – FOA/UNESP, com a representação do Prof. Dr. Marcelo Macedo Crevelin, como chefe de departamento e aos servidores Marco Aurélio de Oliveira Ianner e Paulo Roberto Gratão, Renato Gomes de Oliveira, por todo suporte para a realização dessa pesquisa.

Ao Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, e ao colega e funcionário, 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 importante.

A Universidade Estadual de Maringá – UEM e todos os meus antigos professores e funcionários, que me guiaram e me inspiraram a seguir e buscar o caminho da docência. As minhas inspirações Elen Tolentino de Souza, Vanessa Cristina Veltrini e Liogi Iwaki Filho, e em especial ao Prof. Edevaldo Tadeu Camarini, por ter me dado a oportunidade de seguir na cirurgia, me incentivando e orientando, e não me deixando desistir. Enfim, a todos que colaboraram com a minha formação com o mais alto nível de competência, graças a vossas preciosas colaborações e ensinamentos.

Aos alunos de Iniciação Científica, Leticia Gabriella, Luís Fernando, Olivia França, Maria Carolina, Kézia Mendes, Lilian Maria Paulino, Julia Pietro Bão, Beatriz Medeiros, Beatriz Costa Lau, Ana Laura, Ana Luísa e Igor Antonelli por toda dedicação na execução deste projeto. A todos os demais colegas, de graduação e pós-graduação, que participaram e contribuíram de alguma forma no desenvolvimento desse trabalho.

Enfim, aos animais que serviram com suas vidas à ciência, possibilitando a execução dessa pesquisa.

"Não siga o caminho. Vá onde não há caminho e começa a trilha. Quando você inicia uma nova trilha equipada com coragem, força e convicção, a única coisa que pode parar é você!"

RUBY BRIDGES

Silva MP. Estudo in vivo do efeito da ozonioterapia como prevenção e/ou tratamento da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2022.

RESUMO

O ozônio tem sido utilizado no processo de reparo ósseo em condições desfavoráveis, como na osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMIM). O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação de ozonioterapia como prevenção e/ou o tratamento da OMIM. Cento e vinte ratos *wistar* foram distribuídos entre os grupos tratamentos: eles foram induzidos com Zoledronato e receberam ozonioterapia antes da exodontia (prevenção – GOP), após exodontia (tratamento – GOT), em ambos momentos (prevenção e tratamento – GOPT), um grupo não recebeu ozônio (ZOL), e outro recebeu soro fisiológico ao invés da indução (SAL). Após 14 e 28 dias pós-operatórios foram eutanasiados e as peças submetidas as análises histológicas com eosina e hematoxilina, imunoistoquímica, microtomográfica computadorizada (microCT), confocal a LASER e histomorfométrica. Em 14 dias observamos o início do reparo em GOT, assim como um epitélio presente em SAL e GOT, o mesmo ocorre em 28 dias, e uma intensa imunomarcção de osteocalcina (OC) em GOPT em 14 dias. A microCT demonstrou maiores médias de BV/TV em todos grupos quando comparados a ZOL ($p < 0,001$), ZOL apresentou maior porosidade ($p = 0,03$) e o espaçamento trabecular foi maior no grupo GOT quando comparado ao GOP ($p < 0,05$). A taxa de aposição mineral (MAR) dos grupos GOP foram maiores ($21,46 \pm 14,12$), seguida do grupo GOT ($19,66 \pm 13,23$). GOT apresentou a maior média de %NBA ($68,322 \pm 25,296$), quando comparado ao grupo ZOL ($p < 0,05$), seguido pelo grupo SAL ($66,039 \pm 28,379$) e ZOL ($60,856 \pm 28,425$). Diante dos resultados pode-se observar que a ozonioterapia pode modular o reparo alveolar em animais induzidos com ácido zoledrônico.

Palavra-Chave: Osteonecrose. Ozônio. Bifosfonatos. Alvéolo Dental.

Silva MP. In vivo study of the effect of ozone therapy as a prevention and/or treatment of drug-induced osteonecrosis of the jaws [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2022.

ABSTRACT

Ozone has been used in the bone repair process under unfavorable conditions, such as in drug-induced osteonecrosis of the jaws (OMIM). The objective of this work was to evaluate the application of ozone therapy as prevention and/or treatment of OMIM. One hundred and twenty wistar rats were distributed among treatment groups: they were induced with Zoledronate and received ozone therapy before tooth extraction (prevention - GOP), after tooth extraction (treatment - GOT), at both times (prevention and treatment - GOPT), one group I did not receive ozone (ZOL), and another received saline instead of induction (SAL). After 14 and 28 days postoperatively, they were euthanized and the pieces submitted to histological analysis with eosin and hematoxylin, immunohistochemistry, computed microtomography (microCT), confocal LASER and histomorphometric analysis. In 14 days we observed the beginning of repair in GOT, as well as an epithelium present in SAL and GOT, the same occurs in 28 days, with intense immunostaining of osteocalcin (OC) in GOPT in 14 days. The microCT showed higher BV/TV means in all groups when compared to the ZOL ($p < 0.001$), ZOL showed greater porosity ($p = 0.03$) and the trabecular spacing was greater in the GOT group when compared to the GOP ($p < 0.05$). The mineral apposition rate (MAR) of the GOP groups were higher (21.46 ± 14.12), followed by the GOT group (19.66 ± 13.23). GOT had the highest average of %NBA (68.322 ± 25.296), when compared to the ZOL group ($p < 0.05$), followed by the SAL group (66.039 ± 28.379) and ZOL (60.856 ± 28.425). In view of the results, it can be observed that ozone therapy can modulate alveolar repair in animals induced with zoledronic acid.

Keywords: Osteonecrosis. Ozone. Bisphosphonates. Dental Alveolus.

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Aplicação de ácido zoledrônico por via caudal nos grupos ZOL, GOP, GOT e GOPT. No grupo SAL foi usada a mesma via para aplicação de soro fisiológico. 23
- Fig. 2. Imagens da exodontia apresentando a sequência de exodontia (b, c e d) e presença da amarra instalada previamente a indução com ácido zoledrônico (a). 25
- Fig. 3. Imagens da aplicação intraperitoneal de ozônio de 2 em 2 dias. 26
- Fig. 4. Fluxograma do tempo de trabalho de acordo com o grupo no tópico de análise desmineralizadas. O traço de cor verde em SAL representa os momentos de aplicação de NaCl nos animais; O traço de cor preta pontilhado em todos os grupos representa o dia do procedimento cirúrgico; O traço em amarelo em todos os grupos representa o dia da eutanásia do tempo de 14 dias; O traço em roxo em todos os grupos representa o dia da eutanásia do tempo de 28 dias; O traço em azul nos grupos ZOL, GOP, GOT e GOPT representam a aplicação do ácido zoledrônico; e o traço em vermelho em GOP, GOT e GOPT representam a aplicação do ozônio 27
- Fig. 5. Fluxograma do tempo de trabalho de acordo com os grupos grupo nas análises mineralizadas. O traço de cor verde em SAL representa os momentos de aplicação de NaCl nos animais; O traço de cor preta pontilhado em todos os grupos representa o dia do procedimento cirúrgico; O traço de cor preta com * em todos os grupos representa o dia da aplicação de calceína 13 dias após o procedimento cirúrgico; O sinal # em todos os grupos representa o dia da aplicação de alizarina 23 dias após o procedimento cirúrgico; O traço de cor roxa representa o tempo de eutanásia de 28 dias após o procedimento cirúrgico; O traço em azul nos grupos ZOL, GOP, GOT e GOPT representam a aplicação do ácido zoledrônico; e o traço em vermelho em GOP, GOT e GOPT representam a aplicação do ozônio. 28
- Fig. 6. Gráfico demonstrando as médias de porcentagem do volume ósseo em todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ($p < 0,001$). 32

- Fig. 7. Gráfico demonstrando as médias da espessura das trabéculas ósseas (em mm) de todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ($p < 0,05$). 33
- Fig. 8. Gráfico demonstrando as médias do número de trabéculas dos grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ($p > 0,05$). 34
- Fig. 9. Gráfico demonstrando as separações das trabéculas / mm em todos os grupos, obtidos através da análise de microtomográfica computadorizada ($p < 0,05$). 35
- Fig. 10. Gráfico demonstrando as médias de porcentagem de porosidade geral de todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ($p < 0,05$). 36
- Fig. 11. Imagens do grupo SAL, obtidos no software CTVox. A) Corte Parassagital na região do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito; B) Corte sagital na região de primeiro molar inferior direito; C) Corte axial na região de terço médio do alvéolo do primeiro molar inferior direito. 36
- Fig. 12. Imagens do grupo ZOL, obtidos no software CTVox. A) Corte Parassagital na região do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito; B) Corte sagital na região de primeiro molar inferior direito; C) Corte axial na região de terço médio do alvéolo do primeiro molar inferior direito 37
- Fig. 13. Imagens do grupo ZOL, obtidos no software CTVox. A) Corte Parassagital na região do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito; B) Corte sagital na região de primeiro molar inferior direito; C) Corte axial na região de terço médio do alvéolo do primeiro molar inferior direito 37
- Fig. 14. Imagens do grupo GOT, obtidos no software CTVox. A) Corte Parassagital na região do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito; B) Corte sagital na região de primeiro molar inferior direito; C) Corte axial na região de terço médio do alvéolo do primeiro molar inferior direito 38
- Fig. 15. Imagens do grupo GOPT, obtidos no software CTVox. A) Corte Parassagital na região do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito; B) Corte sagital na região de primeiro molar inferior direito; C) Corte axial na região de terço médio do alvéolo do primeiro molar inferior direito 38
- Fig. 16. Gráfico representativo das médias de mineralização óssea/dia de acordo com os grupos avaliados nesse estudo 39

- Fig. 17. Imagens do osso alveolar do grupo SAL, obtidas através da análise de 40
microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo
calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina
(vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.
- Fig. 18. Imagens do osso alveolar do grupo ZOL, obtidas através da análise de 40
microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo
calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina
(vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.
- Fig. 19. Imagens do osso alveolar do grupo GOP, obtidas através da análise de 40
microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo
calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina
(vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.
- Fig. 20. Imagens do osso alveolar do grupo GOT, obtidas através da análise de 41
microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo
calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina
(vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.
- Fig. 21. Imagens do osso alveolar do grupo GOPT, obtidas através da análise de 41
microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo
calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina
(vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.
- Fig. 22. Gráfico representativa da dinâmica/composição do alvéolo distal do primeiro 42
molar inferior direito de acordo com cada grupo. Os componentes avaliados
foram Tecido Conjuntivo, Área óssea Neoformada e Tecido necrótico (osso
não vital).
- Fig. 23. Gráfico representativo das médias da porcentagem de área óssea neoformada 43
de acordo com os grupos avaliados nesse estudo.
- Fig. 24. Gráfico representativo das médias da porcentagem da área de tecido 44
conjuntivo de acordo com os grupos avaliados.
- Fig. 25. Fotomicrográfica representativa do alvéolo distal do primeiro molar inferior 45
direito de acordo com cada grupo, corado em azul de Stevenel e Alizarina no
aumento de 4x (azul – tecido conjuntivo; rosa – tecido mineralizado). Desse
modo, a imagem A) representa o grupo SAL; B) ZOL; C) GOP; D) GOT e
E) GOPT.

- Fig. 26. Gráfico representativa da dinâmica/composição do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo após avaliação de HE (hematoxilina e eosina) em 14 dias. Os componentes avaliados foram Tecido Conjuntivo, Área óssea Neoformada e Tecido necrótico (osso não vital). 49
- Fig. 27. Gráfico representativa da dinâmica/composição do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo após avaliação de HE (hematoxilina e eosina) em 28 dias. Os componentes avaliados foram Tecido Conjuntivo, Área óssea Neoformada e Tecido necrótico (osso não vital). 49
- Fig. 28. Gráfico representativo das médias da área óssea neoformada de acordo com os grupos avaliados nesse estudo. 50
- Fig. 29. Gráfico representativo a área de tecido conjuntivo de acordo com os grupos avaliados nesse estudo. 51
- Fig. 30. Imagens representativas do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo, corado em Eosina e Hematoxilina no aumento de 4x. Desse modo a imagem A e F) representa o grupo SAL; B e G) ZOL; C e H) GOP; D e I) GOT e E e J) GOPT. 52
- Fig. 31. Imagem apresentando a distribuição dos escores de imunoistoquímica dos grupos. 1- leve; 2- moderado e 3-intensa. 53
- Fig. 32. Imagens representativas da análise imunoistoquímica de OC do ápice do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito em aumento de 10x. Imagens de 14 dias: A) SAL; B) ZOL; C)GOP; D)GOT; E) GOPT, Imagens de 28 dias: F) SAL; G) ZOL; H) GOP; I) GOT e J) GOPT 53
- Fig. 33. Imagens representativas da análise imunoistoquímica de TRAP do ápice do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito em aumento de 10x. Imagens de 14 dias: A) SAL; B) ZOL; C)GOP; D)GOT; E) GOPT, Imagens de 28 dias: F) SAL; G) ZOL; H) GOP; I) GOT e J) GOPT 54
- Fig. 34. Imagens representativas da análise imunoistoquímica de RANKL do ápice do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito em aumento de 10x. Imagens de 14 dias: A) SAL; B) ZOL; C)GOP; D)GOT; E) GOPT. 54

LISTA DE ABREVIATURAS

%NBA	Porcentagem de área óssea neoformada
ANOVA	Análise de Variância
ARRIVE	Animal Research: Reporting in Vivo Experiments
BV	Volume ósseo
BV/TV	Porcentagem do volume ósseo
CEUA	Comitê de ética de uso animal
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécimes reativas de oxigênio
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
GOP	Grupo ozônio prevenção
GOPT	Grupo ozônio prevenção e tratamento
GOT	Grupo ozônio tratamento
GSH	Glutathione
HE	Hematoxilina e Eosina
MAR	Taxa de aposição mineral
microCT	Análise Microtomográfica
NaCl 0,9%	Soro fisiológico
NO+	Nitrosênio
O ³	Ozônio
OC	Osteocalcina
OMIM	Osteonecrose induzida por medicamentos
Po.tot	porosidade total
RANKL	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
SAL	Grupo Soro Fisiológico
SOD	Superóxido dismutase
Tb.N	Número de trabéculas
TB.Sp	Separação de trabéculas
Tb.Th	Espessura do trabeculado ósseo
TFB-1	Fator de crescimento
TRAP	Fosfatase ácido resistente ao tartarato
ZOL	Ácido zoledrônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 PROPOSIÇÃO	23
3 MATERIAL E MÉTODO	25
3.1 Delineamento experimental.....	25
3.1.2 Animais.....	25
3.1.3 Aplicação do ácido zoledrônico	25
3.1.4 Grupos experimentais	26
3.1.5 Extração dentária	27
3.1.6 Ozonioterapia.....	28
3.1.7 Aplicação de Fluorocromos.....	29
3.1.8 Eutanásia	29
3.2 Análises.....	31
3.2.1 Análise Microtomográfica (microCT)	31
3.2.2 Microscopia confocal a laser	32
3.2.3 Análise Histomorfométrica	32
3.2.4 Análise Histológica.....	33
3.2.5 Análise de Imunoistoquímica	33
3.3 Análise Estatística.....	33
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Análise Microtomográfica (Micro-Ct).....	35
4.1.1 Porcentagem de volume ósseo	35
4.1.2 Espessura trabecular (Tb.Th):	35
4.1.3 Número de trabéculas (Tb.N):.....	36
4.1.4 Separação trabecular (Tb.Sp):	37
4.1.5 Porcentagem de porosidade total (Po.tot):.....	38
4.1.6 Análise qualitativa dos alvéolos:.....	39
4.2 Microscopia confocal a laser	41
4.2.1 Taxa de Mineralização diária (MAR).....	41
4.2.2 Análise qualitativa:	42
4.3 Análise Histomorfométrica Mineralizada	44
4.3.1 Dinâmica Óssea:.....	44
4.3.2 Porcentagem de área óssea neoformada (%NBA):	45
4.3.3 Porcentagem de tecido conjuntivo:.....	46
4.3.4 Análise qualitativa:	47

4.4 Análise Histomorfométrica Desmineralizada	49
4.4.1 Dinâmica Óssea:.....	49
4.4.2 Área óssea neoformada:	50
4.4.3 Área de tecido conjuntivo:	51
4.4.4 Análise qualitativa:	52
4.5 Análise de Imunoistoquímica	54
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS.....	78

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O ozônio natural é um gás produzido pelo ar atmosférico e o ozônio medicinal é obtido através da manipulação físico-química do oxigênio, controlando um equipamento padronizado, e conhecendo a dose adequada a fim de eliminar sua toxicidade [1,2]. O acesso e produção controlada do ozônio permitem sua aplicabilidade em diferentes terapêuticas, como as cicatrizações teciduais e reparos ósseos [2-6]. Um estudo prévio publicado [6] mostrou que aplicação do ozônio durante processo de reparação de tecidos moles permitiu uma maior vascularização, presença de miofibroblastos, fibroblastos, células endoteliais, colágeno e poucas células inflamatórias após exérese de lesões. Outros trabalhos publicados ainda destacaram o aumento dos fatores de crescimento [7], assim como a boa oxigenação e metabolismo dos tecidos, que intervém no equilíbrio oxidante/antioxidante [8,9], permitindo assim uma boa epiteliação e proliferação celular durante o processo reparacional.

Patologias ósseas, como também terapias medicamentosas que interferem no turnover ósseo e apresentam efeitos antiangiogênicos podem prejudicar o reparo ósseo, levando a ocorrência de exposições ósseas após um trauma dento-alveolar [10-15]. A associação desta exposição à infecção local, o acúmulo de bactérias, o atraso da reparação tecidual, devido a toxicidade dos antirreabsortivos aos fibroblastos favorecem ao surgimento da osteonecrose [16-19]. Trabalhos prévios publicados [2,4,5] têm apresentado que a ozonioterapia aplicada ao reparo ósseo modula o processo de neoformação óssea, diminuindo área fibrótica, proliferando vasos sanguíneos, número de osteoblastos, osteoclastos, nova área de osso mineralizado. Acredita-se que estes eventos ocorram devido à presença de oxigênio por mais tempo no tecido em decorrência da aplicação do ozônio.

A ozonioterapia proporciona ativação de vias bioquímicas em eritrócitos, leucócitos, plaquetas, as quais desencadeiam a liberação de fatores de crescimento, assim como viabilizam a microvascularização dos tecidos [1,20]. Estes eventos promovidos pela administração sistêmica do ozônio têm permitido resultados clínicos satisfatórios nos processos de cicatrização tecidual de uma forma geral [7] e em reparo ósseo de osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMIM) [1,2,4,5]. A osteonecrose pode apresentar quadros de infecção que evoluem devido a sua exposição ao meio bucal, entretanto a OMIM é uma necrose asséptica, sendo a sua principal característica a supressão de vascularização, podendo apresentar ou não um quadro de infecção [21]. A ozonioterapia promove com o EO (Estresse Oxidativa) temporário a ativação de eritrócitos com características metabólicas melhoradas, capazes de corrigir a hipóxia em doenças vasculares. O fator de crescimento liberados pelas

plaquetas, TFB-1, devido a ativação pelos EROs (espécimes reativas do oxigênio) favorecem ao processo cicatricial, enquanto que o NO⁺ regula o tônus vascular destes sítios [1,22].

O emprego do ozônio em quadros de osteomielite vem sendo relatada e investigada pela literatura científica [23-25]. Estudos prévios publicados [23,24] relataram que a terapia favorece a reparação óssea na osteomielite, demonstrando boa resposta celular que acarreta em uma boa repercussão clínica. No entanto, a literatura ainda é escassa quanto a pesquisas que investigam o mecanismo e repercussões celulares da terapia na osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos. O uso do ozônio na OMIM tem sido reportado com bons resultados em trabalhos clínicos não randomizados [26-28] ou relatos de casos clínicos como tratamentos adjuvantes [29-31]. Estes trabalhos clínicos descritos acima preconizaram a ozonioterapia após o trauma cirúrgico que desencadeou a OMIM. Entretanto, trabalho prévio publicado [26] destacou a aplicação da terapia previamente em casos em que há a necessidade de abordagem cirúrgica, como em procedimentos de exodontia. O objetivo é estimular as reações biológicas e oxigenação dos tecidos previamente ao trauma cirúrgico.

Diante do exposto o objetivo desta pesquisa será avaliar o reparo alveolar após exodontia do primeiro molar inferior direito de ratos tratados com ácido zoledrônico, após a ozonioterapia como prevenção e/ou tratamento da OMIM.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados no presente estudo pode-se concluir que o ozônio modula o reparo ósseo alveolar. Dentre as modalidades de aplicação de ozônio, a modalidade tratamento (GOT), quando aplicado após a exodontia e mantido por 14 aplicações com intervalos de 2 dias apresentaram os melhores resultados. Enquanto que grandes frequências de aplicações de ozônio (GOPT) não apresentaram vantagem.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. V. Bocci, Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful, *Mediators Inflamm.* 13 (2004) 3-11, <https://doi.org/10.1080/0962935062000197083>.
2. V.A. Bocci, Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art, *Arch. Med. Res.* 37 (2006) 425-435, <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006>.
3. V. Bocci, A. Carlo, Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 20 (2006) 133-138, <https://doi.org/10.1002/jbt.20124>.
4. V. Bocci, Ozone: A new medical drug. Springer Science & Business Media. first ed. 2005
5. 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>.
6. C.D. Soares, T.M.L. Morais, R.M.F.G. Araújo, P.F. Meyer, E.A.F. Oliveira, R.M.V. Silva, E.M. Carreiro, E.P. Carreiro, V.G. Bellico, B.A.L.A. Mariz, J. Jorge-Junior, Effects of subcutaneous injection of ozone during wound healing in rats *Growth Factors* 37 (2019) 95-103, <https://doi.org/10.1080/08977194.2019.1643339>.
7. J. Zhang, M. Guan, C. Xie, X. Luo, Q. Zhang, Y. Xue, Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014 (2014) 273475, <https://doi.org/10.1155/2014/273475>.
8. V. Travagli, I. Zanardi, P. Bernini, S. Nepi, L. Tenori, V. Bocci, Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood, *Int. J. Toxicol.* 29 (2010) 165-174, <https://doi.org/10.1177/1091581809360069>.
9. R. Viebahn-hänsler, O.S. Fernández, Z. Fahmy, Ozone in medicine: the low-dose ozone concept: guidelines and treatment strategies, *Ozone Sci. Eng.* 34 (2012) 408-424, <https://doi.org/10.1080/01919512.2012.717847>.

10. S. Aljohani, R. Fliefel, J. Ihbe, J. Kühnisch, M. Ehrenfeld, S. Otto, What is the effect of anti-resorptive drugs (ARDs) on the development of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in osteoporosis patients: a systematic review, *J. Craniomaxillofac. Surg.* 45 (2017) 1493-1502, <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.05.028>.
11. C. Madrid, K. Bouferrache, M. Abarca, B. Jaques, M. Broome, Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: how to manage cancer patients, *Oral Oncol.* 46 (2010) 468-470, <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.03.016>.
12. G.M. Kushner, B. Alpert, Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws, *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 19 (2011) 302-306, <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e328348b257>.
13. S.L. Ruggiero, Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an overview, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1218 (2011) 38-46, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05768.x>.
14. H. Bone, R. Chapurlat, M. Brandi, J. Brown, E. Czerwinski, M. Krieg, D. Mellström, S. Radominski, J. Reginster, H. Resch, J. Ivorra, C. Roux, E. Vittinghoff, N. Daizadeh, A. Wang, M. Bradley, N. Franchimont, M. Geller, R. Wagman, S. Cummings, S. Papapoulos, The effect of three or six years of denosumab exposure in women with postmenopausal osteoporosis: Results from the freedom extension, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 (2013) 4483-4492, <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1597>.
15. S. Papapoulos, K. Lippuner, C. Roux, C. Lin, D. Kendler, E. Lewiecki, M. Brandi, E. Czerwinski, E. Franek, P. Lakatos, C. Mautalen, S. Minisola, J. Reginster, S. Jensen, N. Daizadeh, A. Wang, M. Gavin, C. Libanati, R. Wagman, H. Bone, The effect of 8 or 5 years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: Results from the freedom extension study, *Osteoporos Int.* 26 (2015) 2773-2783, <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3234-7>.
16. S.L. Ruggiero, B. Mehrotra, T.J. Rosenberg, S.L. Engroff, Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62 (2004) 527-534, <https://doi.org/10.1016/j.joms.2004.02.004>.
17. C. Woodis, Once-yearly administered intravenous zoledronic acid for postmenopausal osteoporosis, *Ann. Pharmacother.* 42 (2008) 1085-1089, <https://doi.org/10.1345/aph.1K652>.

18. M. Pazianas, Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages, *J. Natl. Cancer Inst.* 103 (2011) 232-240, <https://doi.org/10.1093/jnci/djq516>.
19. L. Rasmusson, J. Abtahi, Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: An update on pathophysiology, risk factors, and treatment. *Int. J. Dent.* 2014 (2014) 471035, <https://doi.org/10.1155/2014/471035>.
20. J. Bagan, G.T. Sáez, M.C. Tormos, C. Gavalda-Esteve, L. Bagan, M. Leopoldo-Rodado, J. Calvo, C. Camps, Oxidative stress in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws, *J. Oral Pathol. Med.* 43 (2014) 371-377, <https://doi.org/10.1111/jop.12151>.
21. K. Takaoka, H. Hattori, M. Ueta, H. Maeda, M. Yamamura, K. Yamanegi, K. Noguchi, H. Kishimoto, Osteonecrosis of the jaws caused by bisphosphonate treatment and oxidative stress in mice, *Exp. Ther. Med.* 17 (2019) 1440-1448, <https://doi.org/10.3892/etm.2018.7076>.
22. D.A. Wink, M.B. Grisham, J.B. Mitchell, P.C. Ford, Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology, *Methods Enzymol.* 268 (1996) 12-31, [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)68006-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)68006-9).
23. A. Bilge, O. Öztürk, Y. Adali, S. Üstebay, Could ozone treatment be a promising alternative for osteomyelitis? An experimental study, *Acta Ortop. Bras.* 26 (2018) 67-71, <https://doi.org/10.1590/1413-785220182601179926>.
24. E. Oguz, S. Ekinici, M. Eroglu, S. Bilgic, K. Koca, M. Durusu, U. Kaldirim, S. Sadir, Y. Yurttas, G. Cakmak, A. Kilic, T. Purtuloglu, S. Ozyurek, Y. Cekli, H. Ozkan, A. Sehirlioglu, Evaluation and comparison of the effects of hyperbaric oxygen and ozonized oxygen as adjuvant treatments in an experimental osteomyelitis model, *J. Surg. Res.* 171 (2011) e61-e68, <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.06.029>.
25. T. Yasheng, A. Mijiti, M. Yushan, Z. Liu, Y. Liu, A. Yusufu, Ozonated water lavage and physiological saline irrigation combined with vacuum-sealed drainage in the treatment of 18 cases of chronic osteomyelitis, *J. Int. Med. Res.* 49 (2021) 300060521999530, <https://doi.org/10.1177/0300060521999530>.
26. A. Agrillo, C. Ungari, F. Filiaci, P. Priore, G. Iannetti, Ozone therapy in the treatment of avascular bisphosphonate-related jaw osteonecrosis, *J. Craniofac. Surg.* 18 (2007) 1071-1075, <https://doi.org/10.1097/scs.0b013e31857261f>.

27. 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.
28. C.I. Ripamonti, E. Cislighi, E. Mariani, L. Maniezzo, M. Efficacy and safety of medical ozone (O₃) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: preliminary results of a phase I-II study, *Oral Oncol.* 47 (2011) 185-190, <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.01.002>.
29. F. Goker, G. Donati, F. Grecchi, A. Sparaco, M. Ghezzi, V. Rania, C.A. Rossi, M. Del Fabbro, Treatment of BRONJ with ozone/oxygen therapy and debridement with piezoelectric surgery, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 24 (2020) 9094-9103, https://doi.org/10.26355/eurrev_202009_22855.
30. G. Maluf, R.J. Caldas, E.R. Fregnani, P.S. Silva Santos, A rare case of bevacizumab-related osteonecrosis of the jaw associated with dental implants, *Int. J. Implant Dent.* 5 (2019) 34, <https://doi.org/10.1186/s40729-019-0188-0>.
31. M.T. Petrucci, C. Gallucci, A. Agrillo, M.C. Mustazza, R. Foà, Role of ozone therapy in the treatment of osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients, *Haematologica* 92 (2007) 1289-1290, <https://doi.org/10.3324/haematol.11096>.
32. C. Kilkenny, W.J. Browne, I.C. Cuthill, M. Emerson, D.G. Altman, Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research, *PLoS Biol.* 8 (2010) e1000412, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.
33. H. Hadad, L. Kawamata de Jesus, A.F. Piquera Santos, H. Rinaldi Matheus, L.G. Souza Rodrigues, P. Paolo Poli, E. Marcantonio Junior, F. Pozzi Semeghini Guastaldi, C. Maiorana, J. Milanezi de Almeida, R. Okamoto, F. Ávila Souza, Beta tricalcium phosphate, either alone or in combination with antimicrobial photodynamic therapy or doxycycline, prevents medication-related osteonecrosis of the jaw, *Sci. Rep.* 12 (2022) 16510, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20128-4>.
34. C. Curra, C.L. Cardoso, O. Ferreira Júnior, M.M. Curi, M.A. Matsumoto, B.C. Cavenago, J. Ferreira, Medication-related osteonecrosis of the jaw. Introduction of a new

- modified experimental model, *Acta Cir. Bras.* 31 (2016) 308-313, <https://doi.org/10.1590/S0102-865020160050000003>.
35. 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>.
 36. G. Koçer, M. Naziroğlu, Ö. Çelik, L. Önal, D. Özçelik, M. Koçer, T.T. Sönmez, Basic fibroblast growth factor attenuates bisphosphonate-induced oxidative injury but decreases zinc and copper levels in oral epithelium of rat, *Biol. Trace Elem. Res.* 153 (2013) 251-256, <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9659-y>.
 37. R.N. Howie, J.L. Borke, Z. Kurago, A. Daoudi, J. Cray, I.E. Zakhary, T.L. Brown, J.N. Raley, L.T. Tran, R. Messer, F. Medani, M.E. Elsalanty, A model for osteonecrosis of the jaw with zoledronate treatment following repeated major trauma, *PloS One* 10 (2015) e0132520, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132520>.
 38. A. Janovszky, A. Szabo, R. Varga, D. Garab, M. Boros, C. Mester, N. Beretka, T. Zombori, H.P. Wiesmann, R. Bernhardt, I. Ocsovszki, P. Balázs, J. Piffkó, Periosteal microcirculatory reactions in a zoledronate-induced osteonecrosis model of the jaw in rats, *Clin. Oral Investig.* 19 (2015) 1279-1288, <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1347-6>.
 39. M.L. Bouxsein, S.K. Boyd, B.A. Christiansen, R.E. Guldberg, K.J. Jepsen, R. Müller, Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography, *J. Bone Miner. Res.* 25 (2010) 1468-1486, <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>.
 40. D.W. Dempster, J.E. Compston, M.K. Drezner, F.H. Glorieux, J.A. Kanis, H. Malluche, A.M. Parfitt, Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee, *J. Bone Miner. Res.* 28 (2013) 2-17, <https://doi.org/10.1002/jbmr.1805>.

41. O. Awodele, S.O. Olayemi, J.A. Nwite, T.A. Adeyemo, Investigation of the levels of oxidative stress parameters in HIV and HIV-TB co-infected patients, *J. Infect. Dev. Ctries* 6 (2011) 79-85, <https://doi.org/10.3855/jidc.1906>.
42. F. Lebreton, W. van Schaik, M. Sanguinetti, B. Posteraro, R. Torelli, F. Lee Bras, N. Vemeuil, X. Zhang, J.C. Giard, A. Dhalluin, R.J. Willems, R. Leclercq, V. Cattoir, AsrR is an oxidative stress sensing regulator modulating *Enterococcus faecium* opportunistic traits, antimicrobial resistance, and pathogenicity, *PLoS Pathog.* 8 (2012) e1002834, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002834>.
43. C.A. McDevitt, A.D. Ogunniyi, E. Valkov, M.C. Lawrence, B. Kobe, A.G. McEwan, J.C. Paton, A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc, *PLoS Pathog.* 7 (2011) e1002357, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002357>.
44. R.N. Howie, J.L. Borke, Z. Kurago, A. Daoudi, J. Cray, I.E. Zakhary, T.L. Brown, J.N. Raley, L.T. Tran, R. Messer, F. Medani, M.E. Elsalanty, A model for osteonecrosis of the jaw with zoledronate treatment following repeated major trauma, *PloS One* 10 (2015) e0132520, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132520>.
45. A. Janovszky, A. Szabo, R. Varga, D. Garab, M. Boros, C. Mester, N. Beretka, T. Zombori, H.P. Wiesmann, R. Bernhardt, I. Ocsovszki, P. Balázs, J. Piffkó, Periosteal microcirculatory reactions in a zoledronate-induced osteonecrosis model of the jaw in rats, *Clin. Oral Investig.* 19 (2015) 1279-1288, <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1347-6>.
46. V.N. Pacheco, R. Langie, A. Etges, D. Ponzoni, E. Puricelli, Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in rats e a blind randomized controlled trial, *Int. J. Exp. Pathol.* 96 (2015) 255-260, <https://doi.org/10.1111/iep.12133>.
47. A. Garcia-Heredia, E. Kensicki, R.P. Mohny, A. Rull, I. Triguero, J. Marsillach, C. Tormos, B. Mackness, M. Mackness, D.M. Shih, J. Pedro-Botet, J. Joven, G. Sáez, J. Camps, Paraoxonase-1 deficiency is associated with severe liver steatosis in mice fed a high-fat high-cholesterol diet: a metabolomic approach, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 1946-1955, <https://doi.org/10.1021/pr400050u>.
48. M.M. Lopes Castro, P.C. Nascimento, D. Souza-Monteiro, S.M. Santos, M.B. Arouck, V.B. Garcia, R.F. Araújo Jr, A.A. Araujo, G.S. Balbinot, F.M. Collares, C.K. Rosing,

- M.C. Monteiro, C.S. Ferraz Maia, R.R. Lima, Blood oxidative stress modulates alveolar bone loss in chronically stressed rats, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 3728, <https://doi.org/10.3390/ijms21103728>.
49. V. Domazetovic, G. Marcucci, T. Iantomasi, M.L. Brandi, M.T. Vincenzini, Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants, *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 14 (2017) 209-216, <https://doi.org/10.11138/ccmbm/2017.14.1.209>.
 50. C. Walte, A. Pabst, T. Ziebart, M.O. Klein, B. Al-Nawas, Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro, *Oral Dis.* 17 (2011) 194-199, <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01720.x>.
 51. S.Y. Gao, G.S. Zheng, L. Wang, Y.J. Liang, S.E. Zhang, X.M. Lao, G.Q. Liao, Zoledronate suppressed angiogenesis and osteogenesis by inhibiting osteoclasts formation and secretion of PDGF-BB, *PloS One* 12 (2017) e0179248, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179248>.
 52. E.M. Camporesi, G. Bosco, Hyperbaric oxygen pretreatment and preconditioning, *Undersea Hyperb. Med.* 41 (2014) 259-263.
 53. O.S. Leon, S. Menendez, N. Merino, R. Castillo, S. Sam, L. Perez, E. Cruz, V. Bocci, Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals, *Mediators Inflamm.* 7 (1998) 289-294, <https://doi.org/10.1080/09629359890983>.
 54. T.L. Pires, Efeito da ozonioterapia sistêmica em ratos em uso de bisfosfonato. (2018). 62 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília.
 55. T. Okamoto, M.C. Russo, Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats, *Rev. Fac. Odontol. Aracatuba* 2 (1973) 153-169.
 56. T. Okamoto, R. Okamoto, M.C. Alves Rezende, M.F. Gabrielli, Interference of the blood clot on granulation tissue formation after tooth extraction: histomorphological study in rats, *Braz Dent J.* 5 (1994) 85-92.
 57. G. Broughton 2nd, J.E. Janis, C.E. Attinger, Wound healing: an overview, *Plast. Reconstr. Surg.* 117 (2006) 1e-S-32e-S, <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9>.

58. M. Lang, Z. Zhou, L. Shi, J. Niu, S. Xu, W. Lin, Y. Wang, Influence of zoledronic acid on proliferation, migration, and apoptosis of vascular endothelial cells, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 54 (2016) 889-893, <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2016.05.030>.
59. H. Abdik, E.A. Abdik, S. Demirci, A. Doğan, D. Turan, F. Şahin, The effects of bisphosphonates on osteonecrosis of jaw bone: a stem cell perspective, *Mol. Biol. Rep.* 46 (2019) 763-776, <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4532-x>.
60. M.A. Scheper, A. Badros, R. Chaisuparat, K.J. Cullen, T.F. Meiller, Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis, *Br. J. Haematol.* 144 (2009) 667-676, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07504.x>.