



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 ($21,46 \pm 14,12$), followed by the GOT group ($19,66 \pm 13,23$). 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.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar os efeitos da ozonioterapia durante o processo de reparo alveolar após exodontia do primeiro molar inferior direito de ratos tratados com ácido zoledrônico e submetidos à ozonioterapia como prevenção e/ou tratamento da OMIM.

Avaliar o processo de reparo alveolar de forma qualitativa (grau de maturação) e quantitativa (histomorfometria), imunoistoquímica, a microestrutura óssea (volume ósseo, porcentagem do volume ósseo, espessura do trabeculado ósseo e separação e número de trabéculas), e a taxa de aposição óssea mineral durante o processo de reparo alveolar após as terapias propostas.

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Delineamento experimental

O presente trabalho foi iniciado após aprovação do Comitê de ética no uso de animais (CEUA 0236-2021), da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e seguiu todas as normas de experimentação em animal. Este trabalho foi delineado de acordo com as diretrizes da ARRIVE guidelines [32].

3.1.2 Animais

Foram utilizados 120 ratos *albinus wistar* machos com 3 meses de idade e peso aproximado de 350-450g. Os animais foram mantidos em biotério próprio da UNESP com controle da temperatura e luz do ambiente. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*.

Para determinação do poder da amostra foi considerado um nível de significância de 5% (com desvio padrão de 2%), e com um poder de teste de 80%, sendo definido alpha como 0,05, e oito ratos por grupos (n=8) foram necessários para comparar os diferentes grupos, de acordo com trabalho prévio publicado [33].

3.1.3 Aplicação do ácido zoledrônico

Todos os animais foram tratados com o uso do ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), exceto os animais do grupo SAL (Grupo Soro Fisiológico), que receberam apenas 0,1 ml de soro fisiológico (NaCl 0,9%), no mesmo protocolo de aplicação acima descrito. Seguindo o modelo experimental de trabalhos prévios publicados [33,34], os animais receberam 04 aplicações de 0,035 mg/kg de ácido zoledrônico (ZOL) dissolvido em 0,1ml de veículo (NaCl 0,9%), através da veia caudal, com intervalos de 15 dias entre as aplicações. Uma semana após a última aplicação, os animais foram submetidos a exodontia dos primeiros molares inferiores direitos. Na sequência, os animais seguiram medicados de 15/15 dias até o período de eutanásia, conforme protocolo de aplicação descrito acima. (Figura 1)



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.

3.1.4 Grupos experimentais

Após a aplicação sistêmica de ZOL, os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos, de acordo com o tratamento que receberam.

Grupo Soro Fisiológico (SAL): Os animais terão seu primeiro molar inferior direito extraído após protocolo de tratamento com soro fisiológico (NaCl 0,9%).

Grupo zoledronato (ZOL): Os animais terão seu primeiro molar inferior direito extraído após protocolo de tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil).

Grupo Ozônio Prevenção (GOP): Os animais terão seu primeiro molar inferior direito extraído após protocolo de tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil). Nesse grupo, os animais receberão ozônio na forma de prevenção: será feita a administração de 0,7mg/Kg de ozônio gás [24], via intraperitoneal de 2 em 2 dias [35], iniciando 4 semanas antes do procedimento cirúrgico e finalizando no dia do procedimento.

Grupo Ozônio Tratamento (GOT): Os animais terão seu primeiro molar inferior direito extraído após protocolo de tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®,

Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil). Nesse grupo, os animais receberão ozônio na forma de tratamento: será feita a administração de 0,7mg/Kg de ozônio gás [24], via intraperitoneal de 2 em 2 dias [35], iniciando imediatamente após o procedimento cirúrgico, sendo mantida por 4 semanas.

Grupo Ozônio Prevenção + Ozônio Tratamento (GOPT): Os animais terão seu primeiro molar inferior direito extraído após protocolo de tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil). Nesse grupo, os animais receberão ozônio na forma de prevenção e tratamento: será feita a administração de 0,7mg/Kg de ozônio gás [24], via intraperitoneal de 2 em 2 dias [35], iniciando 4 semanas antes do procedimento cirúrgico e sendo mantida por 8 semanas.

3.1.5 Extração dentária

Todos os animais tiveram seus primeiros molares inferiores direitos extraídos no 52º dia após início do tratamento com o ZOL, o que corresponde a 7 dias após a quarta aplicação de ZOL. Os animais foram posicionados em decúbito ventral em mesa de operação personalizada. A sindesmotomia da inserção gengival foi realizada cuidadosamente por meio de um descolador delicado seguido da luxação e exodontia do dente. Após a exodontia foi realizado um descolamento dos tecidos moles da região que corresponde ao alvéolo do elemento extraído, com intuito de auxiliar na manutenção do coágulo, tratamento do alvéolo de acordo com o grupo e fechamento primário do alvéolo por tecido mole. Em seguida foi realizada a sutura com fio absorvível de Poliglactina 910 espessura 4.0 (Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil). (Figura 2)

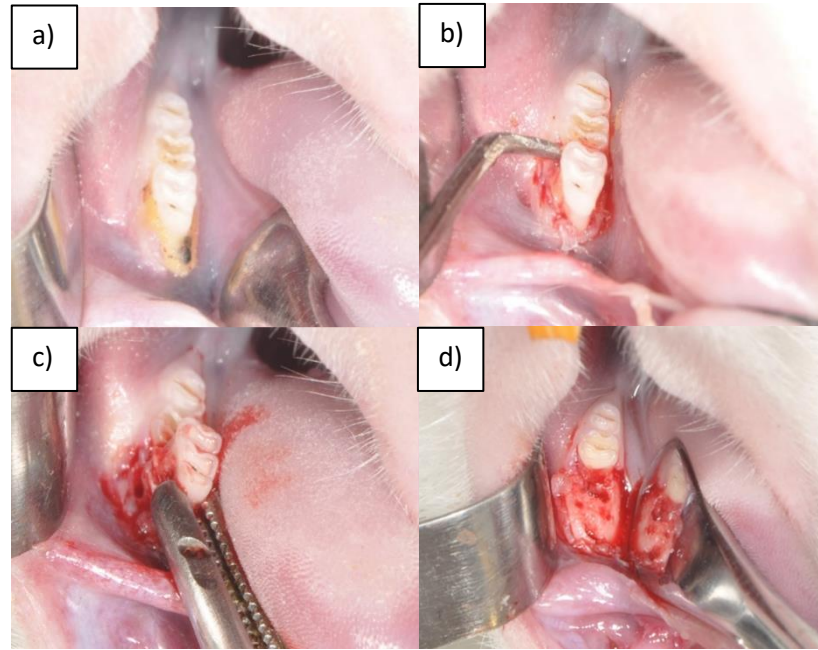


Fig. 2. Imagens da exodontia apresentando a sequência de exodontia (b, c e d) e presença da amarria instalada previamente a indução com ácido zoledrônico (a).

3.1.6 Ozonioterapia

Os animais receberam a terapia com Ozônio, fornecido por empresa especializada (Ozone & Life Indústria, Comércio e Sistemas LTDA, São José dos Campos, São Paulo, Brasil). As aplicações foram previamente a exodontia, no caso do Grupo Prevenção (GOP), após exodontia no Grupo Tratamento (GOT) e antes e após a exodontia, no Grupo Prevenção e Tratamento (GOPT). O ozônio foi aplicado na forma de gás por via intraperitoneal através de seringa descartável de 3 ml com agulha de calibre 25mm x 0,07mm, na concentração de 0,7mg/kg [24], via intraperitoneal de 2 em 2 dias [35].



Fig. 3. Imagens da aplicação intraperitoneal de ozônio de 2 em 2 dias.

3.1.7 Aplicação de Fluorocromos

A aplicação dos fluorocromos seguiu metodologias empregadas em estudos prévios publicados [36-38]. Para análise de epifluorescência, no período de 13 dias após a exodontia dos molares foi administrado pela via intramuscular 20 mg/kg de calceína. Passados mais 23 dias das exodontias, foram administrado 20 mg/kg de vermelho de alizarina para cada animal.

3.1.8 Eutanásia

Passados os tempos de 14 e 28 dias após a exodontia dos primeiros molares inferiores do lado direito os 80 animais para as análises desmineralizadas foram submetidos à eutanásia, 40 para cada período. O esquema de trabalho pode ser observado na imagem abaixo (Figura 4).

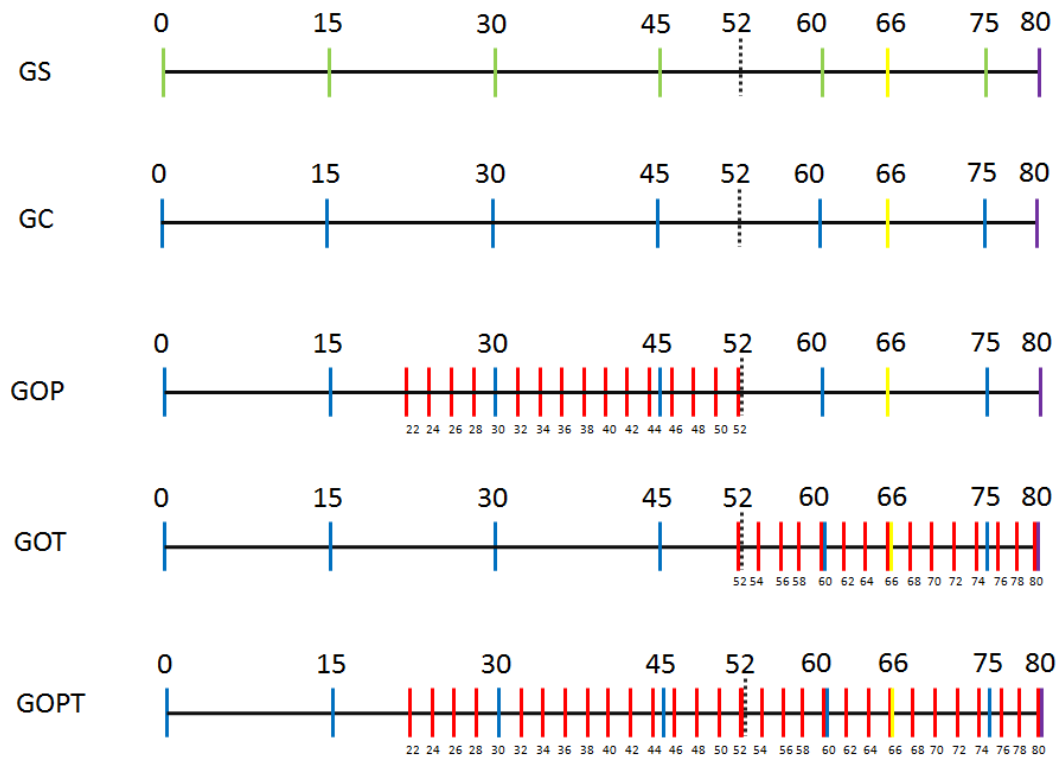


Fig. 4. Fluxograma do tempo de trabalho de acordo com o grupo no tópico de análise desmineralizadas. O traço de cor verde em SAL representa os momentos de aplicação de NaCl nos animais; O traço de cor preta pontilhado em todos os grupos representa o dia do procedimento cirúrgico; O traço em amarelo em 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.

Passados 28 dias das exodontias, os 40 animais para as análises mineralizadas foram eutanasiados. Foi realizada a ressecção em bloco da região alveolar dos molares para análise de epifluorescência e microtomográfica. O esquema de trabalho pode ser mais bem observado na imagem abaixo (Figura 5).

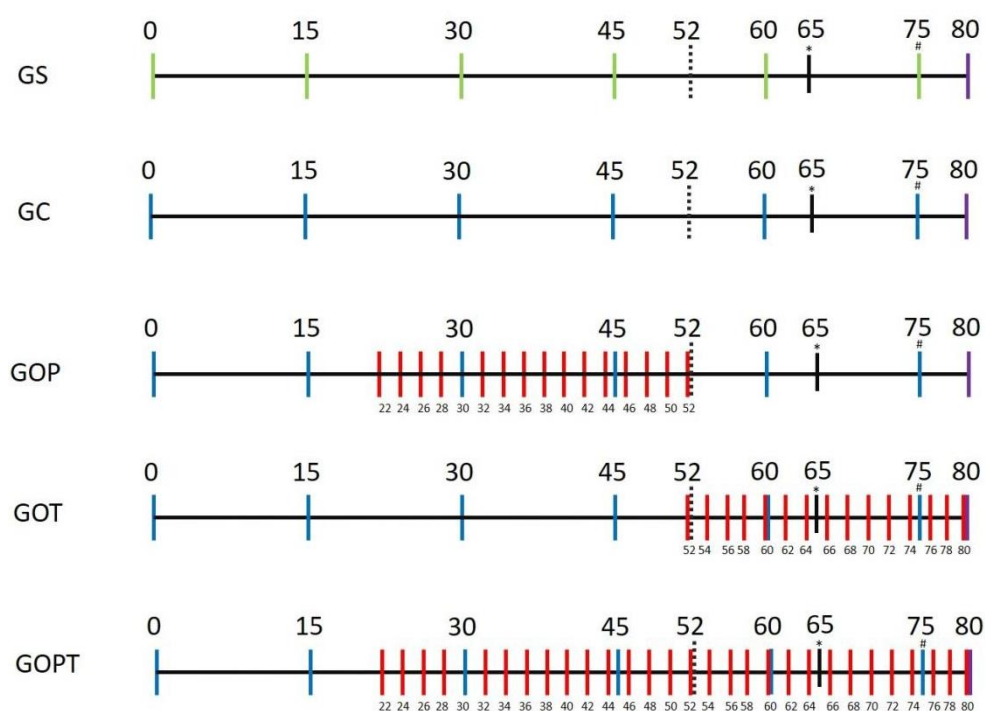


Fig. 5. Fluxograma do tempo de trabalho de acordo com os grupos grupo nas análises mineralizadas. O traço de cor verde em SAL representa os momentos de aplicação de NaCl nos animais; O traço de cor preta pontilhado em todos os grupos representa o dia do procedimento cirúrgico; O traço de cor preta com * 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.

3.2 Análises

3.2.1 Análise Microtomográfica (microCT)

Após a eutanásia dos animais, as mandíbulas dos animais dos 5 grupos experimentais foram submetidas a análise microtomográfica, de acordo com metodologia descrita por Bouxsein et al. [39]. Por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) as peças foram escaneadas utilizando cortes de 6µm de espessura (90Kv e 111µA) com filtro de Al. 0,5mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0.5mm, tamanho do pixel de 2016x1344 µm e com tempo de aquisição de 1h e 32min. 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), com smoothing de 1, correção dos anéis de artefato de 8, correção de Beam Hardening de 24% e a faixa de conversão de

imagem que variou de 0,0 – 0,14. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit), as imagens foram reconstruídas para serem observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0) foi avaliado e mensurado o volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (Tb.Sp e Tb.N) e porosidade total (Po.tot) para então realizar a reconstrução em 3D pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

3.2.2 Microscopia confocal a laser

As peças obtidas foram no plano méso-distal, no centro do alvéolo, tendo como referência a raiz mesial do segundo molar, seccionadas em lâminas de aproximadamente 50 µm de espessura. Foram obtidos cortes longitudinais na região do alvéolo. Estes cortes foram capturados pelo microscópio a laser confocal Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando uma objetiva de 10X. Foram obtidas assim, imagens dos fluorocromos calceína e vermelho de alizarina separadamente (osso velho/osso novo) e por fim, estas imagens foram reconstruídas, fornecendo a sobreposição dos fluorocromos utilizados para avaliação do turnover ósseo pela taxa de aposição mineral (MAR), através da ferramenta “free hands, foram traçadas 5 medidas estendendo-se da margem externa da calceína em direção a margem externa da alizarina, sendo o valor obtido, dividido por 10, que representa o intervalo de dias entre as injeções dos dois fluorocromos analisados [40].

3.2.3 Análise Histomorfométrica

Todas as lâminas contendo as mandíbulas em tecido desmineralizado dos cinco grupos experimentais foram coradas pelo azul de Stevenel e fucsina ácida. As análises histométricas foram realizadas por meio do software de análise de imagens Image J (Software de Processamento e Análise de Imagem, Ontario, ON, Canadá). As medidas foram obtidas em micrometros e convertidas para porcentagem, para obtenção da porcentagem da área de osso neoformado (%NBA), tecido conjuntivo e a área de osso necrótico, localizada no interior do alvéolo distal na região do primeiro molar.

3.2.4 Análise Histológica

Quatro lâminas de cada amostra de tecido desmineralizado foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) e outras três para as reações de imunoistoquímica. As imagens de lâminas coradas com HE foram obtidas através do microscópio óptico. Determinou-se as áreas a serem avaliadas na análise quantitativa: área de tecido ósseo íntegro, tecidos moles (tecido epitelial, conjuntivo, vasos sanguíneos) e lacunas ósseas, adaptando os critérios usados por metodologia publicada em trabalho anterior. A análise será realizada na região de interesse, que corresponde à área do alvéolo correspondente ao primeiro molar no sentido anteroposterior.

3.2.5 Análise de Imunoistoquímica

Na análise de imunoistoquímica foram separadas três lâminas que foram fotografadas na região de interesse, a fim de caracterizar as etapas de mineralização óssea, através da atividade osteoblástica (OC), assim como a atividade osteoclástica (TRAP), e a expressão dos osteoblastos na ativação da atividade osteoclástica (RANKL). Para cada um dos anticorpos foram avaliadas a expressão destas proteínas por meio de análise semi-quantitativa pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo alveolar que representam: marcação leve (1), marcação moderada (2) e marcação intensa (3), que estarão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo.

3.3 Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análise estatística no Programa SigmaPlot 12. Primeiramente, foi realizado o teste de homogeneidade (Shapiro-Wilk) para verificação da distribuição dos dados. O teste one-way ANOVA e Kruskal-Wallis foi realizado para verificar a diferença entre as médias entre os grupos, seguido de um teste Tukey’s post hoc para múltiplas comparações, e o teste two-way ANOVA para avaliação de dois ou mais fatores.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

A análise microtomográfica mostrou diferenças estatísticas entre os grupos nos parâmetros de BV/TV ($p < 0,001$), Tb.Th ($p = 0,02$), Tb.Sp ($p = 0,030$) e Po.tot ($p = 0,030$). Enquanto que no parâmetro de Tb.N ($p = 0,326$) não foram observadas diferenças estatísticas.

4.1.1 Porcentagem de volume ósseo

Neste parâmetro foi encontrada diferença estatística entre todos os grupos de ozonioterapia (GOP, GOT e GOPT), assim como no grupo Sham (SAL) ($p < 0,001$). As médias de porcentagem de volume ósseo foram maiores nos grupos de ozonioterapia, GOP ($60,36 \pm 5,78$), GOT ($59,27 \pm 3,50$) e GOPT ($60,43 \pm 3,34$), quando comparados ao ZOL ($p < 0,001$). (Figura 6)

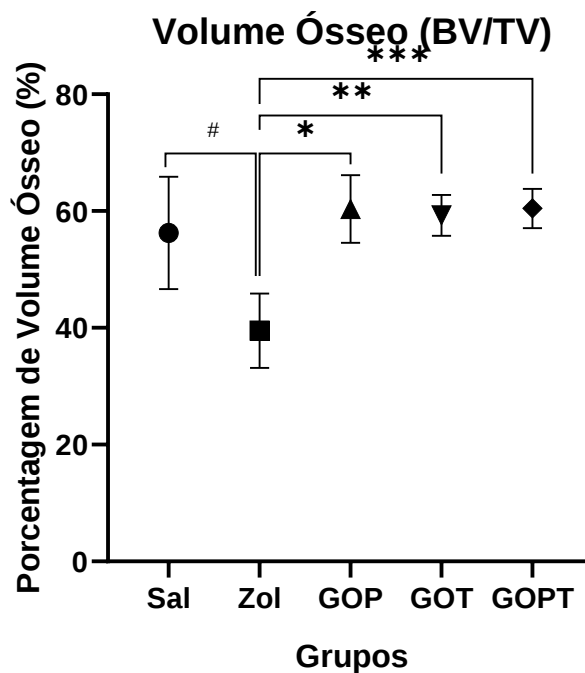


Fig. 6. Gráfico demonstrando as médias de porcentagem do volume ósseo em todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ($p < 0,001$).

4.1.2 Espessura trabecular (Tb.Th):

Os grupos de ozonioterapia apresentaram uma média maior quando comparado ao grupo ZOL, sendo GOP $0,224 \pm 0,003$; GOT $0,223 \pm 0,018$ e GOPT $0,216 \pm 0,016$. Entretanto

neste parâmetro de espessura trabecular apenas o grupo GOP apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo ZOL. ($p < 0,05$) (Figura 7)

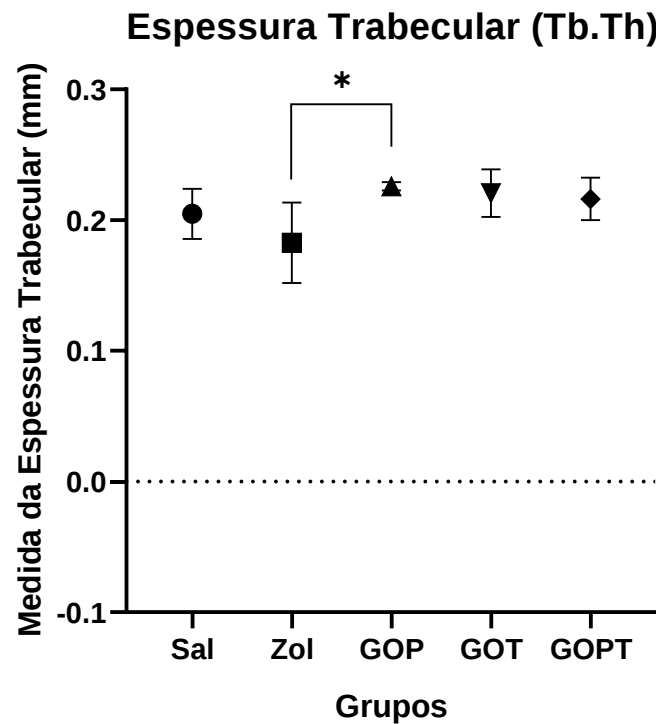


Fig. 7. Gráfico demonstrando as médias da espessura das trabéculas ósseas (em mm) de todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ($p < 0,05$).

4.1.3 Número de trabéculas (Tb.N):

Quanto a este parâmetro os grupos de ozonioterapia (GOP, GOT e GPOT) e o grupo Sham (SAL) apresentaram uma maior média ($2,671 \pm 0,255$; $2,625 \pm 0,154$; $2,878 \pm 0,349$; $2,774 \pm 0,401$, respectivamente), quando comparados ao grupo zoledronato (ZOL), $2,537 \pm 0,238$, entretanto não foi encontrado diferença estatística ($P = 0,381$) entre os grupos estudados. (Figura 8).

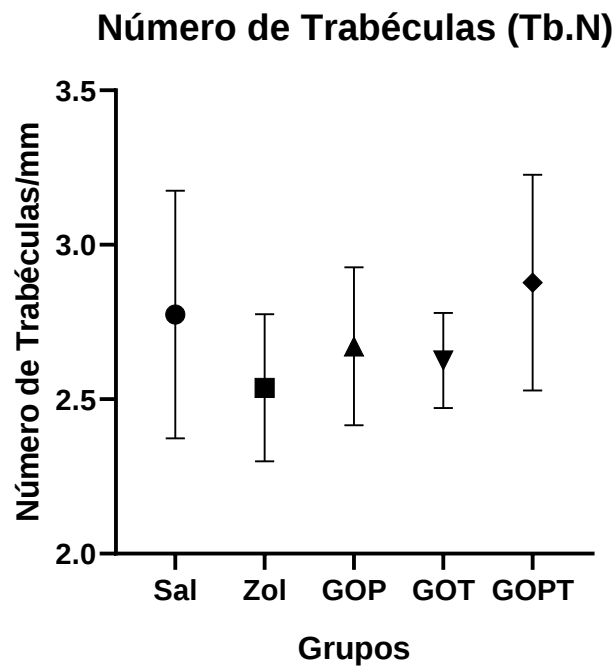


Fig. 8. Gráfico demonstrando as médias do número de trabéculas dos grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ($p > 0,05$).

4.1.4 Separação trabecular (Tb.Sp):

Quanto a este parâmetro foi observado diferença estatisticamente significativa ($p=0,03$). Entre os grupos de ozonioterapia GOP e GOT houve diferença significativa entre os grupos GOT e GOP ($p<0,05$). No grupo ZOL apresentou uma maior média de espaçamento trabecular ($0,401\pm0,0675$), entretanto não obtivemos diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos tratamentos. (Figura 9)

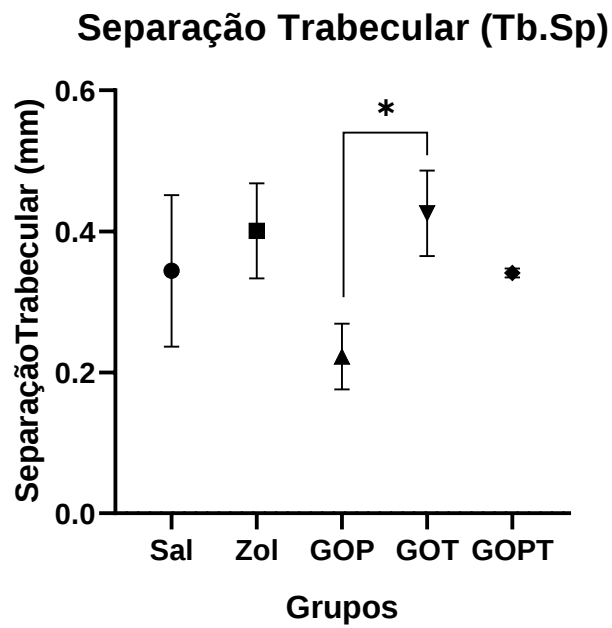


Fig. 9. Gráfico demonstrando as separações das trabéculas / mm em todos os grupos, obtidos através da análise de microtomográfica computadorizada ($p < 0,05$).

4.1.5 Porcentagem de porosidade total (Po.tot):

O grupo ZOL apresentou uma maior porcentagem de porosidade total ($55,24 \pm 8,53$) quando comparada ao grupo SAL ($35,00 \pm 8,68$). ($P = 0,033$). Demais grupos apresentaram médias menores que o ZOL, entretanto nenhuma diferença significativa foi encontrada nos demais grupos. (Figura 10)

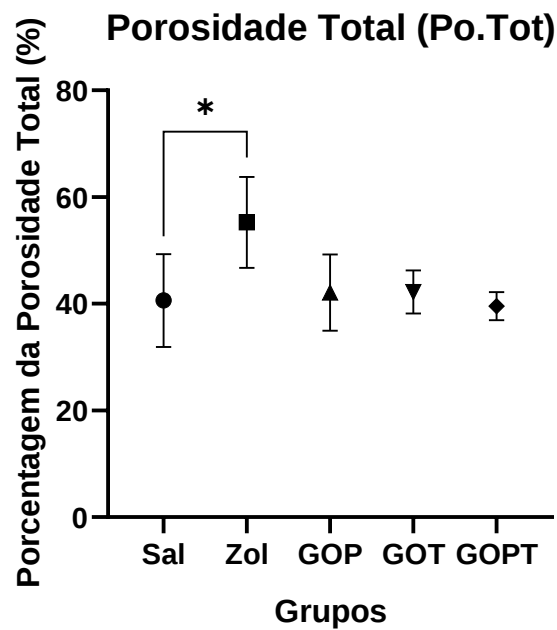


Fig. 10. Gráfico demonstrando as médias de porcentagem de porosidade geral de todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ($p < 0,05$).

4.1.6 Análise qualitativa dos alvéolos:

Os resultados obtidos através da análise micro tomográfica possibilitaram observar que no grupo sham (SAL) ocorreu um bom processo de reparo alveolar em uma vista parassagital observamos um bom reparo. (Figura 11).

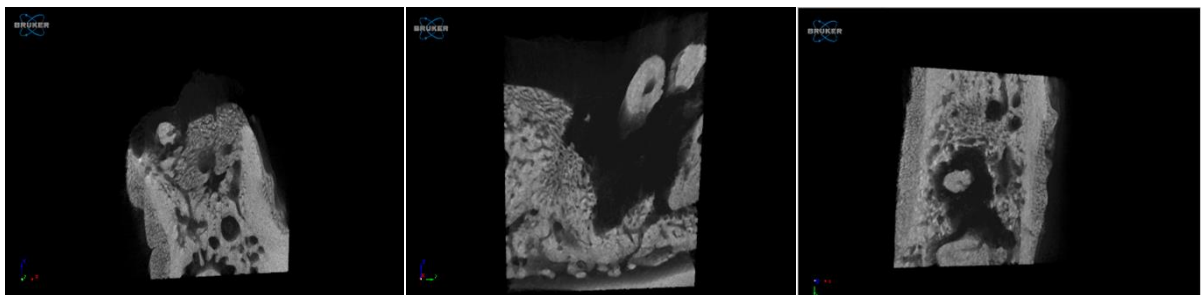


Fig. 11. Imagens do grupo SAL, obtidos no software CTVox. A) Corte Parassagital na região do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito; B) Corte sagital na região de primeiro molar inferior direito; C) Corte axial na região de terço médio do alvéolo do primeiro molar inferior direito.

No grupo zoledronato (ZOL) foi encontrado sequestros ósseos nos alvéolos dos primeiros molares inferiores direito extraídos. Pode-se observar também um alvéolo vazio com

superfície irregular, em seu terço apical, evidenciado nos cortes parassagittais e sagittal. (Figura 12).

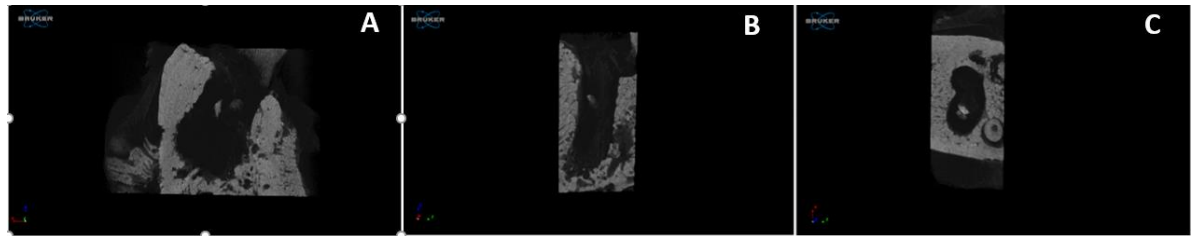


Fig. 12. Imagens do grupo ZOL, obtidos no software CTVox. A) Corte Parassagittal na região do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito; B) Corte sagittal na região de primeiro molar inferior direito; C) Corte axial na região de terço médio do alvéolo do primeiro molar inferior direito

No entanto, para os grupos de ozonioterapia houve diferentes comportamentos [46], de reparo, prevenindo a ocorrência da osteonecrose. No grupo prevenção (GOP) pode-se observar um reparo ósseo, ocorrendo de forma concêntrica, entretanto em região de terço apical e parcialmente em terço médio. (Figura 13).

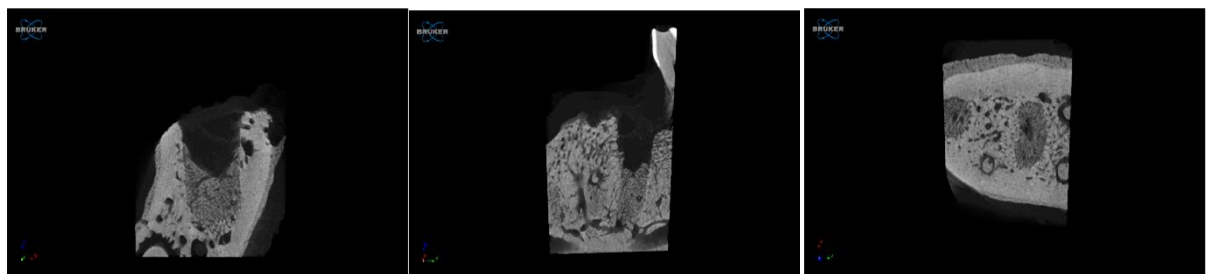


Fig. 13. Imagens do grupo GOP, obtidos no software CTVox. A) Corte Parassagittal na região do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito; B) Corte sagittal na região de primeiro molar inferior direito; C) Corte axial na região de terço médio do alvéolo do primeiro molar inferior direito;

Para os grupos de ozonioterapia, o grupo tratamento (GOT), no qual foi iniciado a administração de ozônio após a exodontia, observou-se um melhor reparo ósseo, no qual também ocorreu de forma concêntrica, e acometendo os alvéolos em terço apical, médio e parcialmente a cervical (Figura 14).

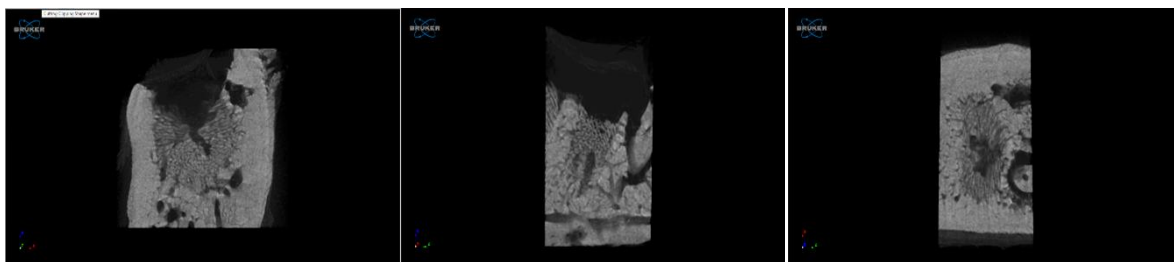


Fig. 14. Imagens do grupo GOT, obtidos no software CTVox. A) Corte Parassagital na região do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito; B) Corte sagital na região de primeiro molar inferior direito; C) Corte axial na região de terço médio do alvéolo do primeiro molar inferior direito;

De modo contrário aos demais grupos, nos alvéolos dos grupos tratado com ozônio previamente e após a exodontia dos primeiros molares inferiores (GOPT), foi observado alvéolos em sua maioria vazia, com pequeno reparo alveolar em região apical (Figura 15).

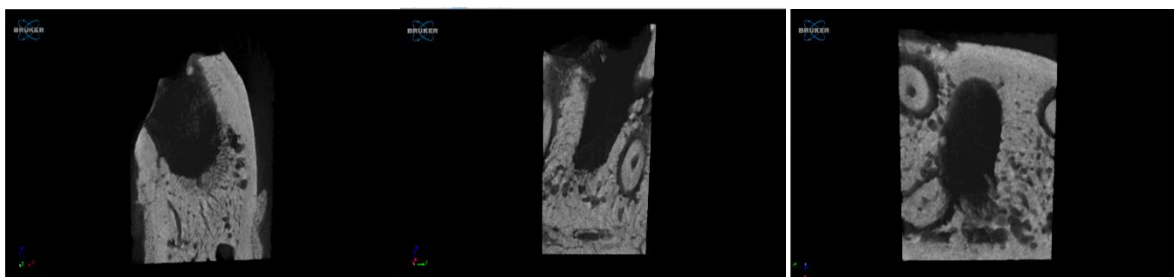


Fig. 15. Imagens do grupo GOPT, obtidos no software CTVox. A) Corte Parassagital na região do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito; B) Corte sagital na região de primeiro molar inferior direito; C) Corte axial na região de terço médio do alvéolo do primeiro molar inferior direito;

4.2 Microscopia confocal a laser

4.2.1 Taxa de Mineralização diária (MAR)

O grupo GOP apresentou a maior taxa de aposição diária ($21,466 \pm 14,121$) dentre os grupos tratados com ozonioterapia. Entretanto o grupo GOT, assim como o grupo SAL e GOP apresentou uma segunda maior MAR dentre os grupos experimentais ($19,662 \pm 13,235$). O grupo GOPT apresentou uma semelhança de MAR ao grupo ZOL, evidenciando uma pequena taxa de aposição mineral ($12,746 \pm 10,628$ e $10,383 \pm 9,257$ respectivamente), o qual também pode ser observado na diferença significativa entre os grupos SAL (coágulo) com o grupo ZOL e GOPT ($p < 0,05$). (Figura 16)

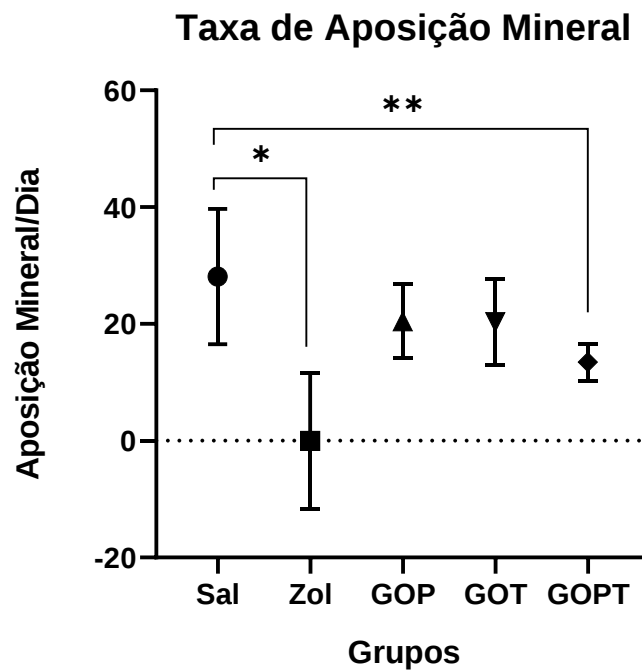


Fig. 16. Gráfico representativo das médias de mineralização óssea/dia de acordo com os grupos avaliados nesse estudo. (*, **) diferença estatística $p < 0,05$.

4.2.2 Análise qualitativa:

A precipitação do cálcio na matriz orgânica ao lado da calceína e da alizarina foi observada nas imagens na forma de linhas fluorescentes. Nesse estudo os fluorocromos foram injetados aos 15 dias (calceína), onde evidenciou o osso mais velho e aos 25 dias (alizarina) após as exodontias, para evidenciar o osso mais novo. (Figura 17-21)

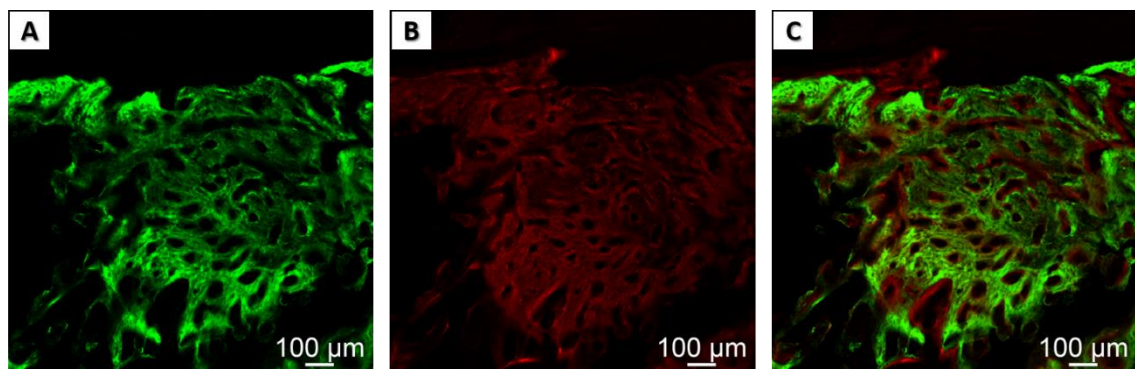


Fig. 17. Imagens do osso alveolar do grupo SAL, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

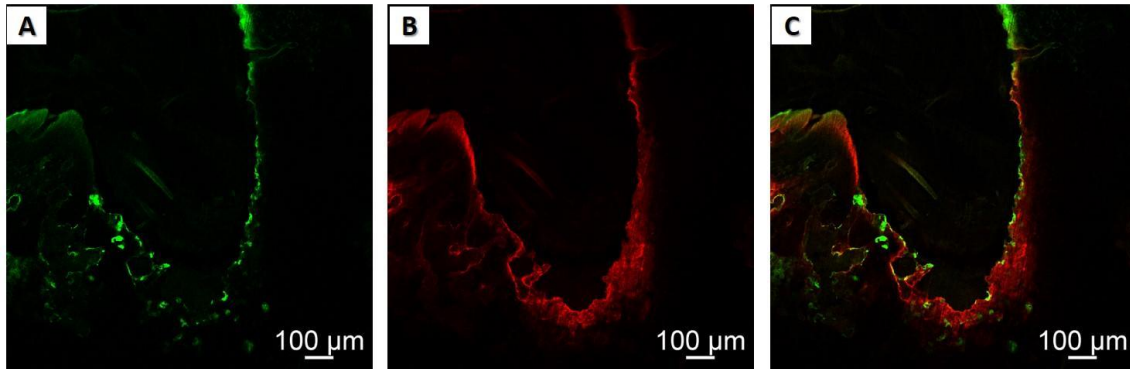


Fig. 18. Imagens do osso alveolar do grupo ZOL, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

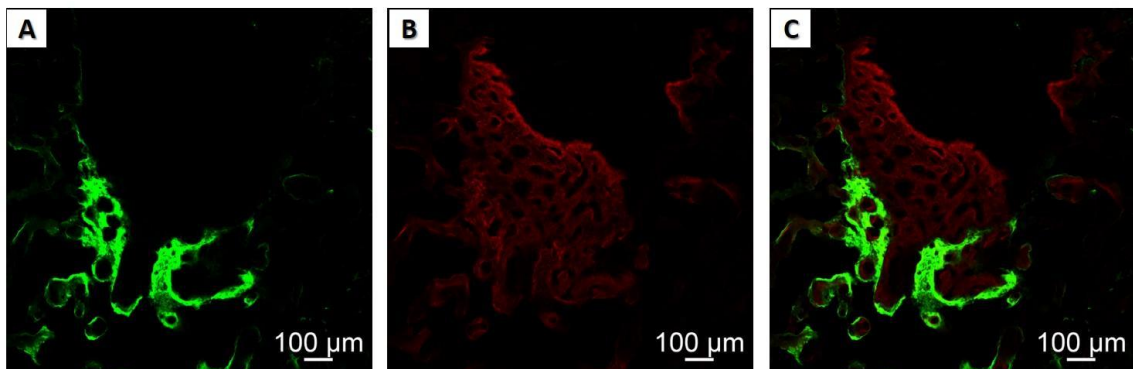


Fig. 19. Imagens do osso alveolar do grupo GOP, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

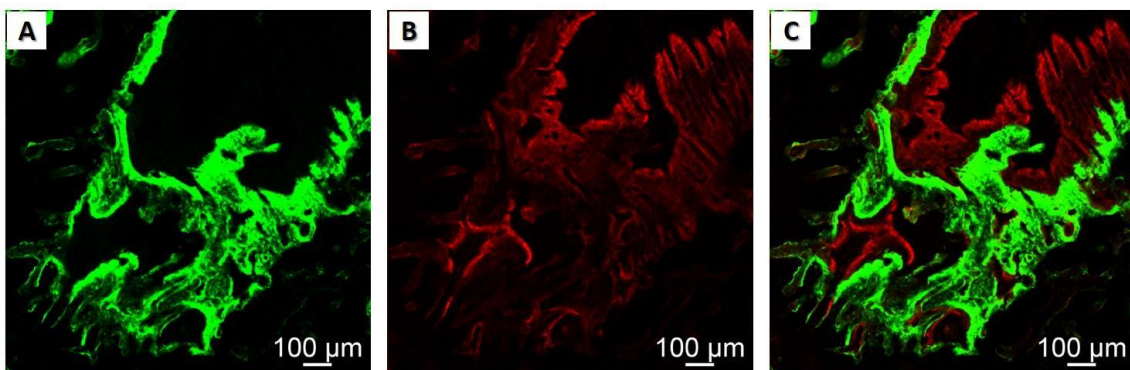


Fig. 20. Imagens do osso alveolar do grupo GOT, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

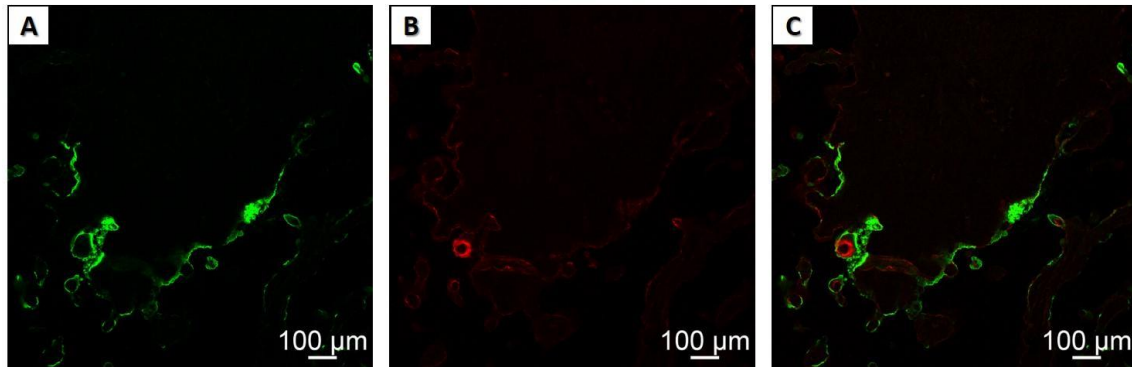


Fig. 21. Imagens do osso alveolar do grupo GOPT, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

4.3 Análise Histomorfométrica Mineralizada

4.3.1 Dinâmica Óssea:

A dinâmica dos tecidos presentes no interior do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito foi quantificada e organizada em 1) área óssea neoformada (%NBA), 2) tecido conjuntivo e 3) osso necrótico (Figura 22).

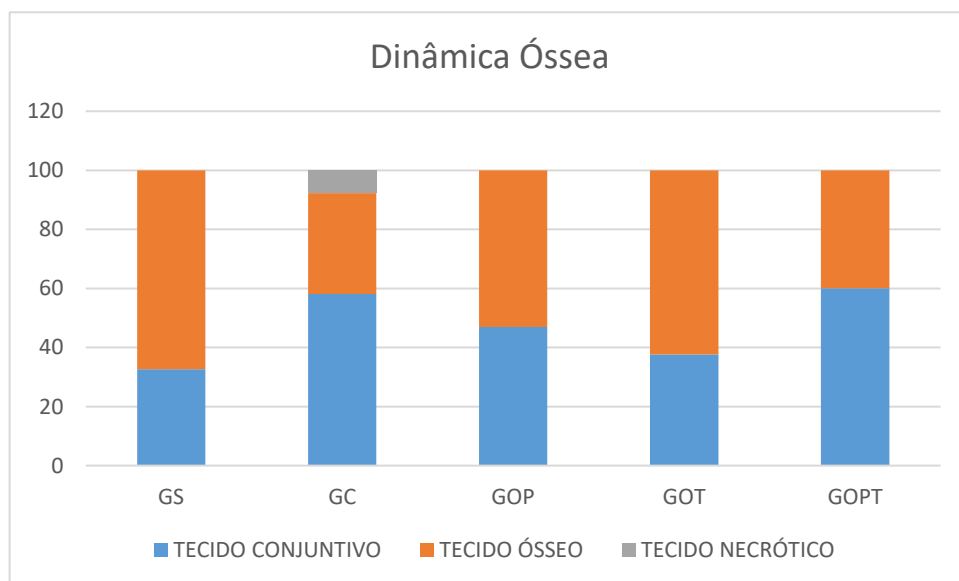


Fig. 22. Gráfico representativa da dinâmica/composição do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo. Os componentes avaliados foram Tecido Conjuntivo, Área óssea Neoformada e Tecido necrótico (osso não vital).

4.3.2 Porcentagem de área óssea neoformada (%NBA):

Na histometria pode-se observar a porcentagem da área óssea neoformada, com destaque para SAL que apresentou uma maior área de osso neoformado ($66,039 \pm 28,379\%$), quando comparado ao grupo ZOL ($21,353 \pm 22,340\%$) ($p=0,025$).

Quando avaliado as diferentes terapias com ozônio, o grupo GOT apresentou a maior média de %NBA ($68,322 \pm 25,296$), quando comparado ao grupo zoledronato ($p = 0,017$), seguido pelo grupo GOP ($60,856 \pm 28,425$). (Figura 23)

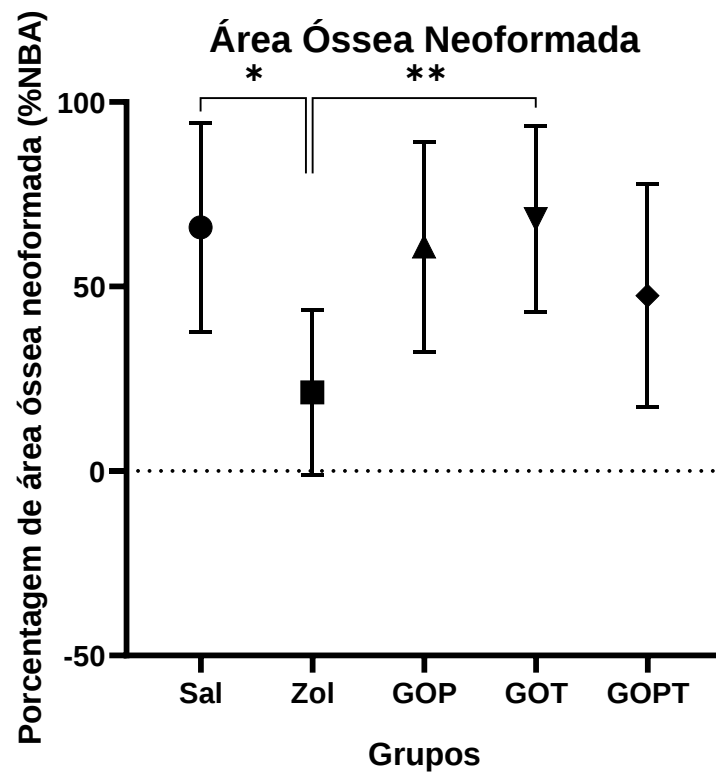


Fig. 23. Gráfico representativo das médias da porcentagem de área óssea neoformada de acordo com os grupos avaliados nesse estudo.

4.3.3 Porcentagem de tecido conjuntivo:

Quando analisado o tecido conjuntivo não foi observado nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos SAL e ZOL. Quando avaliado os grupos de ozonioterapia foi observado uma maior presença de tecido conjuntivo no grupo GOPT ($73,685 \pm 13,651$), o que apresenta ser inversamente proporcional a neoformação óssea, sendo estatisticamente significativo quando comparado ao o grupo SAL ($P < 0,050$). Neste sentido, o grupo SAL apresentou também a menor média de porcentagem de tecido conjuntivo ($31,969 \pm 26,807$), seguido do GOT ($41,901 \pm 28,625$). (Figura 24)

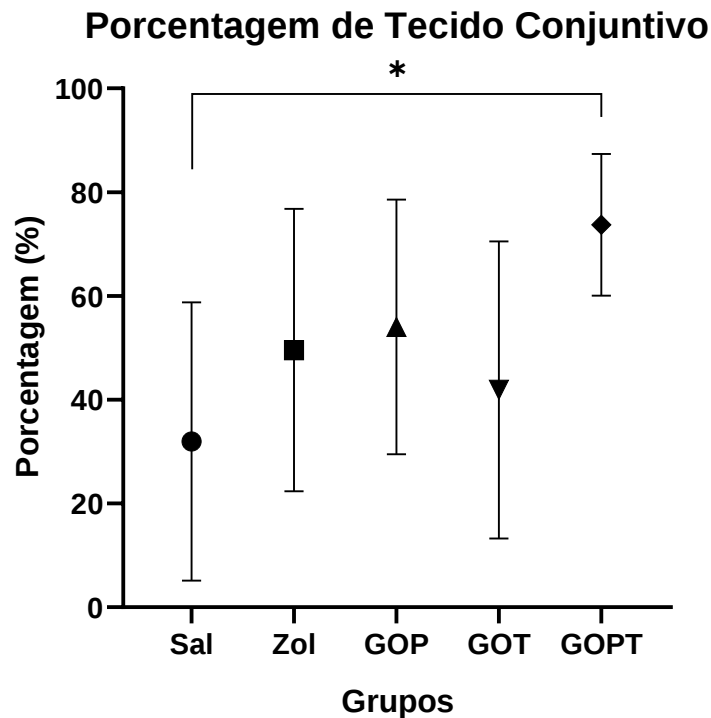


Fig. 24. Gráfico representativo das médias da porcentagem da área de tecido conjuntivo de acordo com os grupos avaliados nesse estudo. (*) diferença estatística $p < 0,05$.

4.3.4 Análise qualitativa:

Em uma análise qualitativa da neoformação óssea pode-se observar os diferentes reparos alveolares, submetidos aos diferentes tratamentos. (Figure 25). No grupo SAL (tratado apenas com NaCl), observa-se um reparo ósseo alveolar no terço apical e médio do alvéolo, com característica de tecido ósseo maduro e lacunas com osteócitos no seu interior (Figura 25A). Em contrapartida no grupo ZOL apresentou um alvéolo vazio, com ausência de tecido conjuntivo, irregularidades da superfície das trabéculas ósseas, presença de canal de Havers vazios, caracterizando um osso não vital. (Figura 25 B).

De modo bem semelhante os tratamentos na forma isolada (GOP e GOT) permitiram neoformação óssea nos terços média e apical, com osso vital, com uma característica mais trabecular (Figura 25 C e D, respectivamente), sendo observada maior formação em grupo GOT. No grupo GOPT foi observado um alvéolo com uma maior quantidade de tecido conjuntivo, e uma neoformação óssea no terço apical (Figura 25 E)

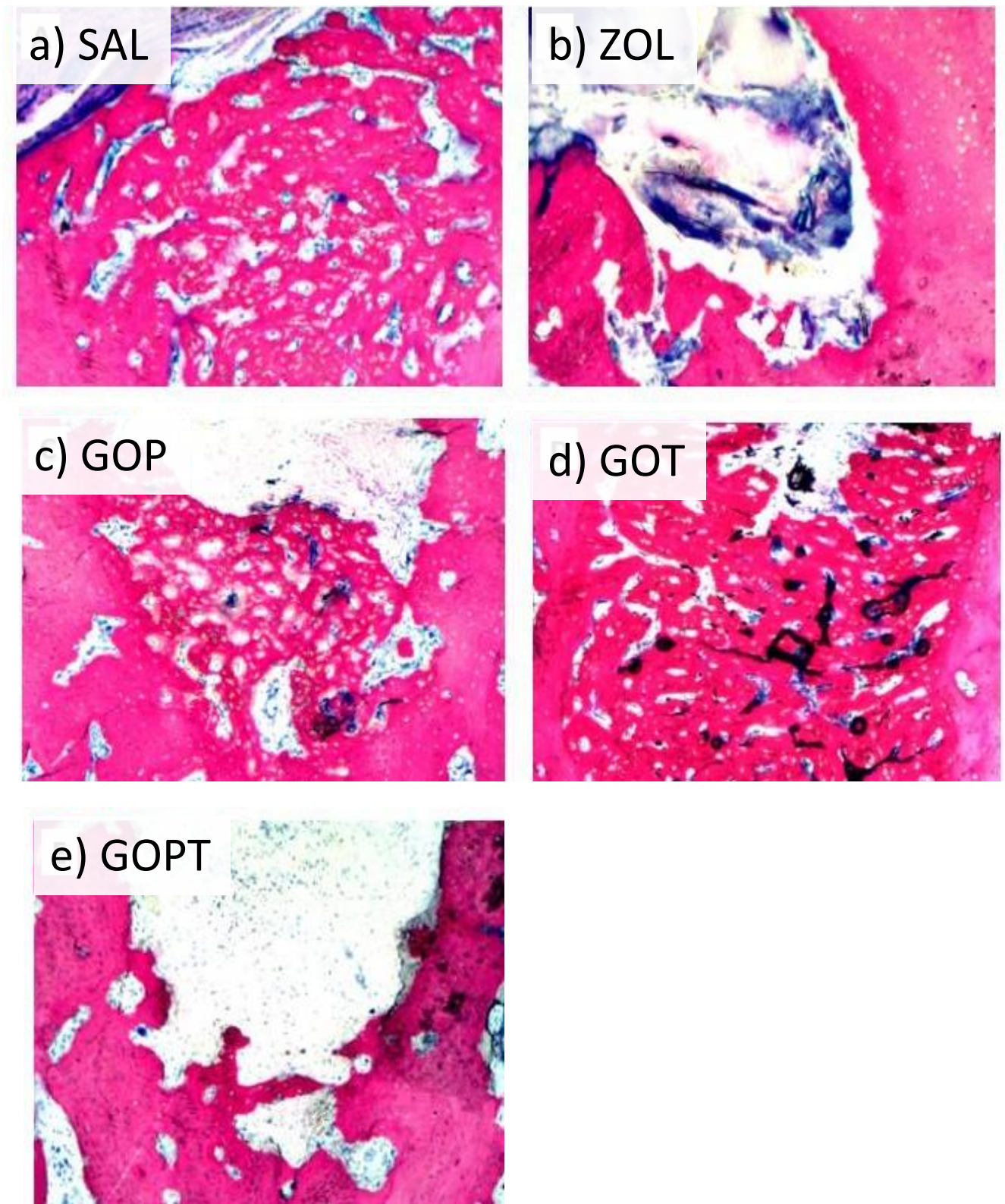


Fig. 25. Fotomicrográfica representativa do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo, corado em azul de Stevenel e Alizarina no aumento de 4x (azul – tecido conjuntivo; rosa – tecido mineralizado). Desse modo a imagem A) representa o grupo SAL; B) ZOL; C) GOP; D) GOT e E) GOPT.

4.4 Análise Histomorfométrica Desmineralizada

4.4.1 Dinâmica Óssea:

A dinâmica dos tecidos presentes no interior do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito nas avaliações desmineralizadas foram quantificadas e organizadas em 1) área óssea neoformada (%NBA), 2) tecido conjuntivo e 3) osso necrótico dos dois períodos (Figura 26 e Figura 27).

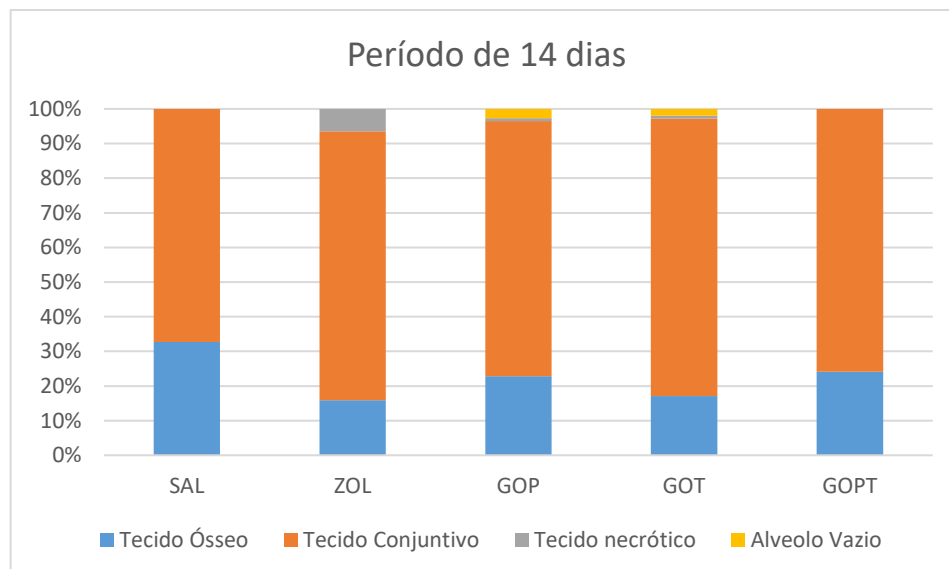


Fig. 26. Gráfico representativa da dinâmica/composição do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo após avaliação de HE (hematoxilina e eosina) em 14 dias. Os componentes avaliados foram Tecido Conjuntivo, Área óssea Neoformada e Tecido necrótico (osso não vital).

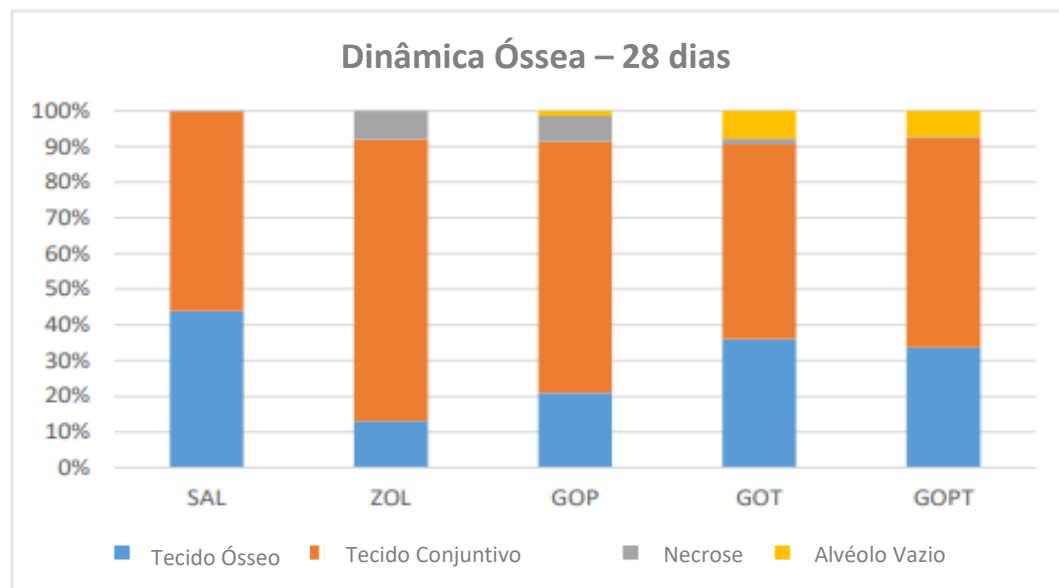


Fig. 27. Gráfico representativa da dinâmica/composição do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo após avaliação de HE (hematoxilina e eosina) em 28 dias. Os componentes avaliados foram Tecido Conjuntivo, Área óssea Neoformada e Tecido necrótico (osso não vital).

4.4.2 Área óssea neoformada:

Na histometria da análise desmineralizada foram observados os dois períodos, 14 e 28 dias. Em 28 dias observamos uma maior área óssea neoformada, com destaque para o grupo GOT, que apresentou uma maior área ($1,939 \pm 0,240 \text{ mm}^2$) sendo estatisticamente significativo quando comparado aos grupos ZOL, GOP e GOPT. ($p < 0,05$). (Figura 28)

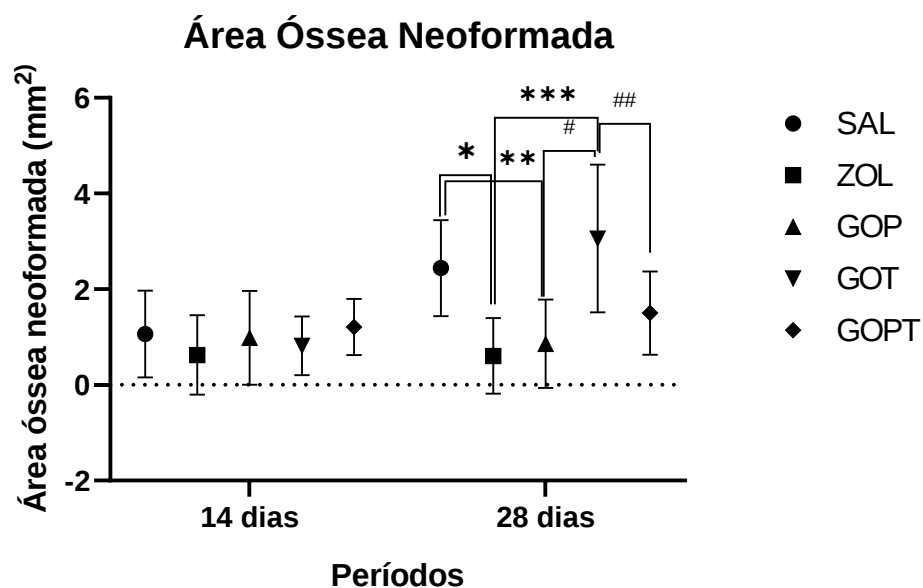


Fig. 28. Gráfico representativo das médias da área óssea neoformada de acordo com os grupos avaliados nesse estudo, com diferença estatística $p < 0,05$.

4.4.3 Área de tecido conjuntivo:

Quando analisado o tecido conjuntivo não foi observado nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos em 28 dias. Entretanto em 14 dias observa-se uma maior quantidade de tecido conjuntivo, assim como uma diferença estatística entre o grupo GOPT, e o grupo GOP e SAL. (Figura 29)

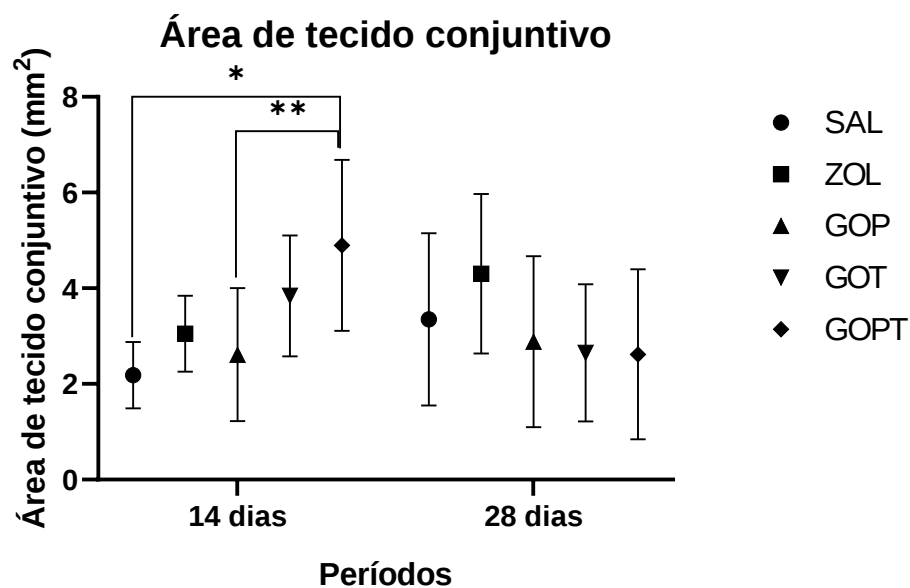


Fig. 29. Gráfico representativo a área de tecido conjuntivo de acordo com os grupos avaliados nesse estudo, com diferença estatística $p < 0,05$.

4.4.4 Análise qualitativa:

Em uma análise qualitativa da coloração das lâminas dos períodos de 14 e 28 dias foi observado a formação óssea, a presença de tecido ósseo necrótico, presença de vasos e tecido conjuntivo.

Em 14 dias observa-se nos grupos SAL e GOT uma continuidade do epitélio, um tecido ósseo mais desorganizado, presença de osteócitos. No grupo GOT pode-se observar ainda a falta de vitalidade em um tecido que não apresentava a presença do epitélio adjacente. O grupo ZOL, GOP e GOPT sugere uma falha no processo de reparo, assim como uma descontinuidade do epitélio. No grupo ZOL observamos lacunas vazias, sugerindo um tecido necrótico. Nos grupos GOP e GOPT observamos alguns pontos com lacunas vazias, sugerindo pontos de necrose.

Entretanto, nas lâminas de 28 dias, os grupos de GOP e GOPT apresentaram um discreto tecido epitelial, e presença de vasos. Entretanto no grupo GOP observamos ainda pontos de osso não vital. No grupo SAL e GOT observamos uma continuidade do epitélio, presença de reparo alveolar, tecido ósseo vital e presença de vasos. No grupo GOT nota-se alguns sequestros acima do tecido epitelial reparado.

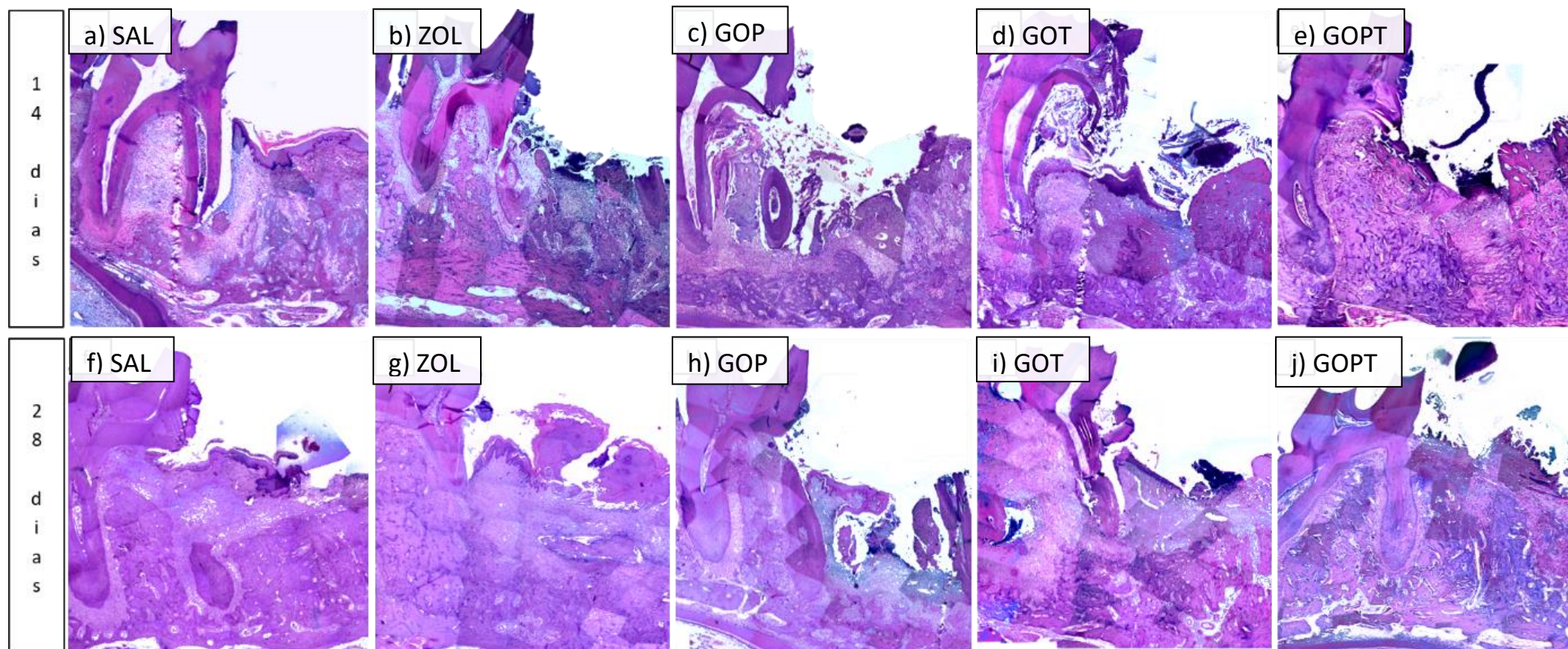


Fig. 30. Imagens representativas do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo, corado em Eosina e Hematoxilina no aumento de 4x. Desse modo a imagem A e F) representa o grupo SAL; B e G) ZOL; C e H) GOP; D e I) GOT e E e J) GOPT.

4.5 Análise de Imunoistoquímica

Na análise de imunoistoquímica foram separadas três lâminas que foram fotografadas na região de interesse, a fim de caracterizar as etapas de mineralização óssea, através da atividade osteoblástica (OC), assim como a atividade osteoclástica (TRAP), e a expressão dos osteoblastos na ativação da atividade osteoclástica (RANKL). Para cada um dos marcadores mensurou-se os scores de forma qualitativa ordinal, sendo classificado em discreta, moderada e intensa.

Nos resultados de 14 dias observou-se uma marcação intensa de OC no grupo GOPT, e uma marcação moderada em TRAP e RANKL, enquanto que nos outros grupos tratados com ozônio e soro (GOP, GOT e SAL) foi observado uma discreta marcação para OC e RANKL, e moderadas para TRAP. O grupo ZOL apresentou uma marcação intensa para TRAP, moderada para OC, e discreta para RANKL. Assim no grupo ZOL foi observado grande quantidade de osteoclasto, entretanto sem ativação da citocina liberada pelo osteoblasto, uma vez que houve marcação discreta para RANKL.

Interpretando os resultados obtidos na análise imunoistoquímica apresentados em 14 dias, houve uma intensa atividade osteoclástica no grupo ZOL e osteoblástica no grupo GOPT. Entretanto aos 28 dias, observou-se uma manutenção, equilíbrio das respostas do turnover ósseo apenas nos grupos tratados com ozônio (GOP, GOT e GOPT), os quais apresentaram moderadas imunomarcações tanto para OC quanto TRAP. (Fig. 31.)

Grupo	14dias			28dias	
	OC	TRAP	RANKL	OC	TRAP
SAL	1	2	1	1	2
ZOL	2	3	1	1	2
GOP	1	2	1	2	2
GOT	1	2	1	2	2
GOPT	3	2	2	2	2

Fig. 31. Imagem apresentando a distribuição dos escores de imunoistoquímica dos grupos. 1- leve; 2-moderado e 3-intensa.

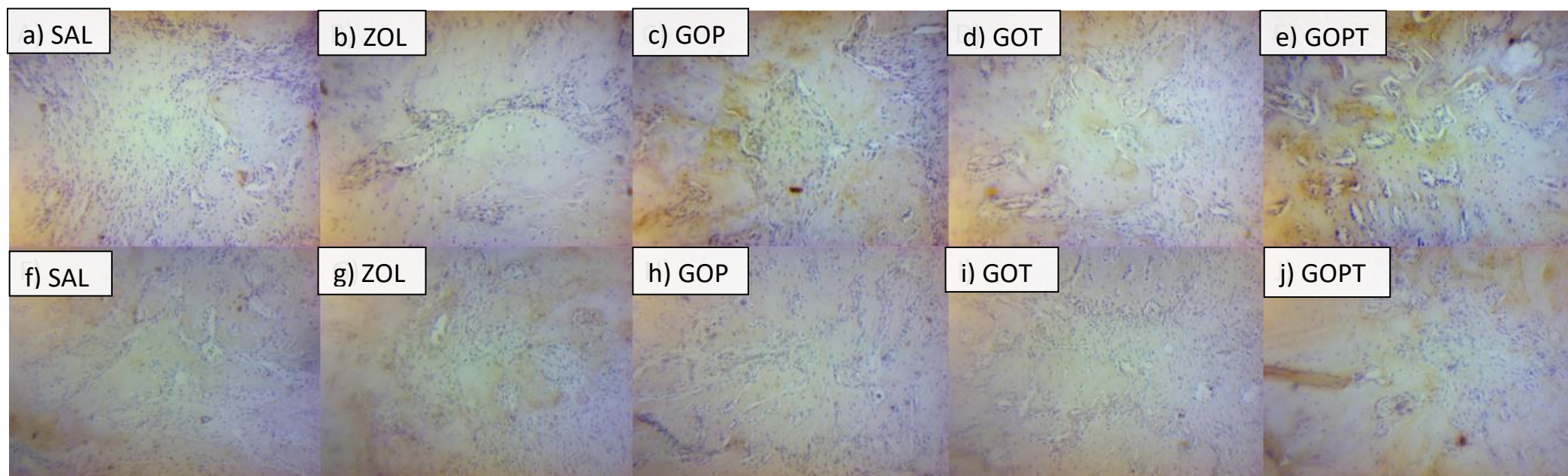


Fig. 32. Imagens representativas da análise imunoistoquímica de OC do ápice do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito em aumento de 10x. Imagens de 14 dias: A) SAL; B) ZOL; C) GOP; D) GOT; E) GOPT, Imagens de 28 dias: F) SAL; G) ZOL; H) GOP; I) GOT e J) GOPT

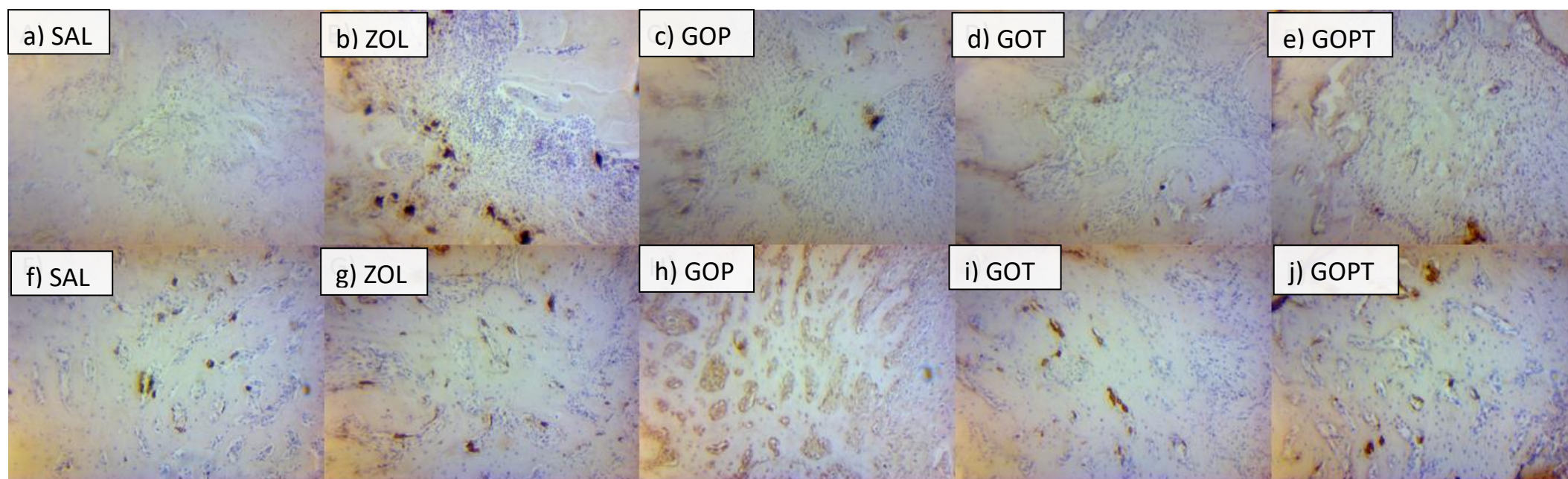


Fig. 33. Imagens representativas da análise imunoistoquímica de TRAP do ápice do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito em aumento de 10x. Imagens de 14 dias: A) SAL; B) ZOL; C) GOP; D) GOT; E) GOPT, Imagens de 28 dias: F) SAL; G) ZOL; H) GOP; I) GOT e J) GOPT

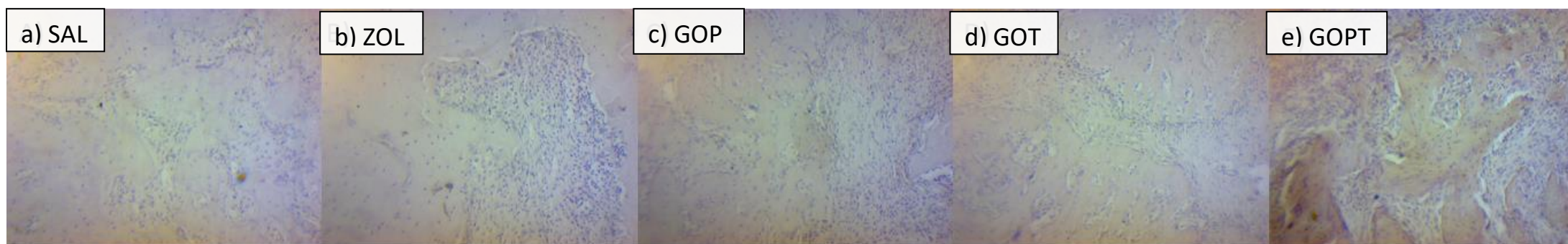


Fig. 34. Imagens representativas da análise imunoistoquímica de RANKL do ápice do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito em aumento de 10x. Imagens de 14 dias: A) SAL; B) ZOL; C)GOP; D)GOT; E) GOPT.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O efeito da ozonioterapia, apresentado clinicamente pela literatura científica, assim como a sua aplicabilidade em terapias para patologias ósseas como osteomielite motivou o delineamento desta pesquisa, questionando se a ozonioterapia modularia o reparo ósseo alveolar, após a exodontia, em animais tratados com ácido zoledrônico, como forma de induzir a OMIM. Diante desta hipótese foi avaliado os momentos clínicos da aplicabilidade desta terapia, e em quais momentos ela melhor modularia o reparo ósseo alveolar.

A administração dos bifosfonatos pode produzir um estresse [36], e continuar um processo de inflamação local, com ou sem infecção, e com isto levar a produção de EROs [41-43]. A ocorrência deste processo oxidativo leva a presença da OMIM que é caracterizada pela necrose óssea dos maxilares, devido ao uso do medicamento, entre eles o ácido zoledrônico, que promove alterações no turnover ósseo. Logo, além dos fatores biológicos, os fatores bioquímicos estão relacionados a ocorrência desta necrose óssea, como pode ser observado pelo EO [41]. Este EO é um dos processos iniciadores da OMIM, no qual acarreta o desequilíbrio entre a quantidade de EROs dentro de uma célula e a capacidade desta mesma remover esses peróxidos reativos e radicais livres [41].

No presente estudo foi encontrado, diante dos resultados obtidos no grupo ZOL o efeito deste estresse oxidativo, levando a ocorrência OMIM, comprovada pela avaliação microtomográfica, de forma qualitativa e quantitativa. Neste presente estudo foi encontrado também áreas de irregularidades ósseas e ausência de osso dentro do alvéolo no grupo ZOL. Achados tomográficos semelhantes foram encontrados em estudos previamente publicados em animais tratados com ácido zoledrônico [44-46]. O comprometimento deste reparo pode ser confrontado com o EO promovido pela OMIM, em que leva a ocorrência da alteração de estruturas celulares e sua viabilidade [20,47]. A grande produção de EROs promove uma modulação do metabolismo ósseo a partir de células precursoras osteoclásticas indiferenciadas, alterando as atividades de formação osteoblástica e reabsorção óssea osteoclástica, favorecendo a criação de um ambiente pró-reabsortivo [48]. Logo todos estes efeitos acabam por promover o atraso do reparo ósseo [49]. A falta de intervenção neste processo oxidativo, assim como estímulos ao reparo, levam a resultados, como alvéolos vazios e sequestrectomia, semelhante a achados histológicos encontrados no presente estudo. Com este modelo animal delineado nesta presente pesquisa pode-se confirmar a ocorrência e viabilidade de comparar os resultados dos efeitos da terapêutica proposta com a ozonioterapia, seja ela preventiva, curativa ou ambas.

Na análise da microestrutura quando comparado os grupos de ozonioterapia (GOP, GOT, GOPT) com o grupo ZOL observou-se alvéolos com reparo ósseo mais adiantado, fato comprovado por meio do parâmetro de volume ósseo, embora nos demais parâmetros de espessura trabecular, espaço trabecular e porosidade total os grupos de ozonioterapia foram maiores, porém sem diferenças estatísticas significantes. Foi encontrado também no parâmetro de espaço trabecular (Th.Sp) que o grupo GOT foi maior estatisticamente comparado a GOP. Embora pareça resultado contraditório, este achado tomográfico pode ser explicado pelo fato do GOT apresentar reparo ósseo alveolar mais adiantado, com presença de trabéculas ósseas em toda extensão do alvéolo, achado comprovado pela análise histológica qualitativa mineralizada. Assim a distância entre as trabéculas foi maior em GOT.

A administração do ácido zoledrônico promove a inibição dos osteoclastos, suprime a angiogênese, osteogênese, e apresenta toxicidade para células epiteliais e fibroblastos [50,51]. Estas alterações celulares levam a alterações no aspecto ósseo, apresentando um aspecto mais compacto, e este processo acarreta, portanto ao EO na presença da osteonecrose [44]. A porosidade total (Poto) maior encontrada no grupo ZOL em comparação ao grupo SAL comprova os efeitos adversos da administração do ácido zoledrônico e sua alteração celular por meio da diminuição da diferenciação dos osteoblastos, interferindo negativamente no reparo ósseo alveolar.

A ozonioterapia tem sido aplicada com o objetivo de buscar um equilíbrio do EO, através de um mecanismo parecido com a oxigenação hiperbárica, no controle deste processo oxidativo [52]. A administração do ozônio diante de um meio com EO visa a desencadear um fenômeno chamado “pré condicionamento”, que seria a administração de doses atóxicas e repetidas do gás ozonizado, levando a uma adaptação ao estresse oxidativo. E esta adaptação ocorre por meio indução de enzimas ou por ativação de vias metabólicas que mantêm um equilíbrio, tais como a indução da enzima superóxido dismutase (SOD), aumento de níveis de glutathione (GSH) e redução da peroxidação [53]. Com as terapias apresentadas infere-se que em diferentes momentos da administração do ozônio, este pode apresentar um pré condicionamento, apresentando diferentes repercussões no reparo alveolar. Este fato pode ser comprovado no presente estudo pela aceleração do reparo ósseo alveolar no grupo GOT, comprovado pela análise histométrica mineralizada e desmineralizada aos 28 dias pós-operatórios.

Além da indução das enzimas, este condicionamento reverte a hipóxia promovida pela OMIM, favorecendo a reparação [1,20,22], e vascularização dos tecidos, como encontrado nos

grupos GOT e GOP que apresentaram maior neoformação óssea na avaliação histométrica mineralizada ($p < 0,025$) e maior taxa de aposição mineral (MAR) ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo ZOL. Assim, neste trabalho de uma forma geral a ozonioterapia promoveu um controle do EO ocasionado pela OMIM nos grupos tratados com ozônio (GOP, GOT e GOPT). Merece destaque o grupo GOT, visto que na avaliação de microestrutura e histométrica mineralizada e desmineralizada o mesmo apresentou resultados favoráveis, resultados semelhantes encontrados nos animais não submetidos a indução da OMIM com ácido zoledrônico (SAL), o que demonstra um condicionamento do EO.

Os animais pertencentes ao grupo GOPT receberam maior quantidade de ozônio quando comparado a GOP e GOT. Neste sentido esperava-se que estes animais tivessem melhor reparo ósseo alveolar, devido a manutenção do equilíbrio do EO. No entanto, o grupo GOPT não apresentou reparo ósseo alveolar melhor quando comparado a GOP e GOT em 28 dias na análise histométrica mineralizada. Os autores inferem pelos resultados encontrados que em um primeiro momento houve um equilíbrio do EO, visto que na análise histométrica desmineralizada, o grupo GOPT apresentou neoformação óssea superior aos demais grupos ozônio (GOP e GOT) e com maior atividade osteoblástica, entretanto sem diferença significativa. Entretanto, aos 28 dias o mesmo não foi encontrado, logo não evidenciando a manutenção deste possível equilíbrio do EO por maior quantidade de ozônio aplicado.

Em trabalho prévio publicado em que a ozonioterapia foi utilizada de forma preventiva e durante a ocorrência da osteonecrose (tratamento) por via retal resultados favoráveis não foram encontrados e por este fato os autores sugeriram a via intraperitoneal para administração do ozônio [54]. Esta sugestão levou os autores empregarem neste presente estudo a via intraperitoneal e encontraram resultados diferentes entre os grupos de ozonioterapia (GOP, GOT e GOPT). O grupo em que foi administrado o Ácido Zoledrônico concomitante ao Ozônio (GOP) os resultados não foram favoráveis quando comparado ao Ozônio tratamento (GOT). Logo a resposta sistêmica ao “pré condicionamento” esperado pelo ozônio em doses ideais, pode ser comprometido com o Zoledronato administrado simultaneamente a indução, acarretando então um desequilíbrio maior, que o condicionamento.

Trabalho prévio publicado apresentou resultados favoráveis quando administrado O_3 uma semana antes da exodontia, e mantido após a exodontia, em 14 aplicações. No presente estudo foi realizado 16 aplicações previamente a exodontia, e mantido 14 aplicações pós-operatórias (GOPT) como descrito previamente [35]. Devido a não haver metodologias prévias, como as descritas no presente estudo, acredita-se que o EO promovido pelo ácido zoledrônico,

assim como o estresse temporário pelo ozônio, não levaram a um pré condicionamento, que permitisse um melhor e mais adiantado reparo do alvéolo, no entanto, permitiu o controle da ocorrência da osteonecrose, quando comparado ao grupo ZOL.

Os resultados encontrados no grupo GOPT não descartam um equilíbrio, ou controle no processo de osteonecrose induzida, visto não ter apresentado sequestrectomias ou tecido ósseo não vital. Apesar de não ter havido uma maior neoformação óssea, acarretando em aceleração do reparo alveolar, quando comparado aos grupos GOP e GOT, acredita-se que o equilíbrio oxidativo sistêmico associado a terapias locais, poderia promover melhores resultados de reparo com terapias osteocondutoras, promotoras e indutoras na região do alvéolo [33]. A otimização da terapia local associada à sistêmica pode ser observada em trabalho prévio publicado, em que ozônio tópico isolado no pré e pós operatório de exodontia não apresentou resultados satisfatórios no reparo, entretanto o uso da terapia sistêmica no pós operatório associado a terapia local possibilitou o aumento da formação de osso trabecular em 28 dias [35]. A administração de ozônio sistemicamente pode promover equilíbrio/controle sistêmico, regulando positivamente a capacidade antioxidante endógena e de desintoxicação, aumentando a proteção celular contra o dano do estresse oxidativo, logo este controle poderia acarretar na otimização das demais terapias locais [35].

O controle bioquímico pelo emprego do ozônio viabilizará a função das respostas celulares, que podem otimizar os resultados do reparo ósseo alveolar. Além disto, o ozônio permite diminuição de área fibrótica, proliferação de vasos sanguíneos, número de osteoblastos, osteoclastos, nova área de osso mineralizado, que acredita ser devido ao oxigênio nos tecidos por mais tempo [2,4,5]. Esta área óssea neoformada pode ser vista através da análise histométrica e histológica qualitativa nas metodologias mineralizada e desmineralizada em que mostrou que os grupos GOT apresentaram melhores resultados quando comparado ao ZOL em 28 dias pós-operatórios. Assim, o presente trabalho corrobora com trabalhos prévios publicados, onde o ozônio em baixas concentrações apresentou propriedade de reparação tecidual e em alta concentração ação bactericida [4,28]. Em estudo prévio publicado onde foram extraídos incisivos centrais de ratos, e estes foram submetidos a ozonioterapia sistêmica e tópica, os resultados mostraram reparo alveolar acelerado em relação ao grupo zoledronato que não recebeu a terapia [35]. As atividades de turnover ósseo puderam ser observadas através da imunoistoquímica, os quais evidenciou-se a atividade osteoblástica intensa no grupo GOPT em 14 dias pós-operatórios, e a manutenção dos imunomarcadores TRAP e OC nos grupos tratados com ozônio (GOP, GOT e GOPT) em 28 dias pós-operatórios. Os resultados da

imunoistoquímica corroboram com a avaliação histométrica desmineralizada em que foi observado de uma forma geral a presença de um melhor reparo ósseo alveolar nos grupos tratados com ozonioterapia, assim como um melhor equilíbrio do turnover ósseo. Destaca-se que o grupo GOT apresentou maior neoformação óssea estatisticamente significativa aos 28 dias pós-operatórios quando comparado ao grupo ZOL, fato não encontrado nos grupos GOP e GOPT.

Além das atividades dos osteoblastos e osteoclastos, a presença e a viabilidade dos fibroblastos e células endoteliais são essenciais para o processo de reparo alveolar [55-57]. O ácido zoledrônico alterara a migração celular, suprime angiogênese e osteogênese, além de apresentar toxicidade para células epiteliais e fibroblastos [58-60]. A inibição dessas células impede a formação de um tecido vascularizado, inibe neoformação óssea, impede a homeostasia do tecido ósseo, retardando o reparo alveolar. Estas alterações puderam ser observadas na análise histométrica em tecidos mineralizados em que o grupo ZOL apresentou menor neoformação óssea estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo SAL ($p=0,025$), com presença de lacunas vazias nos osteócitos o que leva a inferir que houve a ação do ácido zoledrônico. Quando analisado os grupos GOP e GOT, o grupo GOT apresentou uma maior porcentagem de neoformação óssea, quando comparado ao ZOL ($p=0,017$), seguida pelo grupo GOP, que apesar de não ter apresentado diferença significativa, em uma avaliação qualitativa observou-se um osso neoformado, vital com lamelas ósseas.

A ozonioterapia proporciona a produção de H_2O_2 que se difunde pelo plasma e permite a ativação de vias bioquímicas em eritrócitos, leucócitos, plaquetas as quais desencadeiam a liberação de fatores de crescimento, assim como viabilizam a microvascularização destes tecidos [4,23]. Destaca-se na análise histológica qualitativa desmineralizada o fechamento primário do alvéolo que pode ser observado nos grupos GOT e SAL por meio de uma neoformação epitelial completa. Trabalhos prévios publicados têm demonstrado que a não comunicação do alvéolo com o meio bucal permite um maior controle de contaminação, evitando assim a OMIM [59,60]. Foi possível observar também histologicamente que o tecido que não apresentava-se envolto por epitélio mostrou sinais de necrose, como lacunas dos osteócitos, reforçando o estímulo promovido pelo ozônio para a resposta deste epitélio, assim como o tecido ósseo [17,19]. Na análise histológica os tecidos tratados com ozônio apresentaram além da neoformação óssea e epitélio a presença de vascularização, corroborando com os benefícios promovidos pela ozonioterapia. [4,23].

Apesar dos resultados apresentados com a ozonioterapia serem encorajadores, novas análises devem ser realizadas, a fim de demonstrar e elucidar melhor os resultados encontrados. Dentre estas análises, a avaliação do estresse oxidativo enriqueceria os resultados apresentados, podendo demonstrar em quais momentos da administração do ozônio promoveria um melhor “pré-condicionamento” do estresse oxidativo. Portanto, estudos futuros devem ser propostos para que seja avaliado o processo oxidativo, e em quais terapias ocorrem de fato o “pré-condicionamento”, assim como a utilização de terapias locais associadas a terapia sistêmica de ozonioterapia, a fim de modular e otimizar o reparo alveolar.

CONCLUSÃO

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. Ocsosvzki, 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,

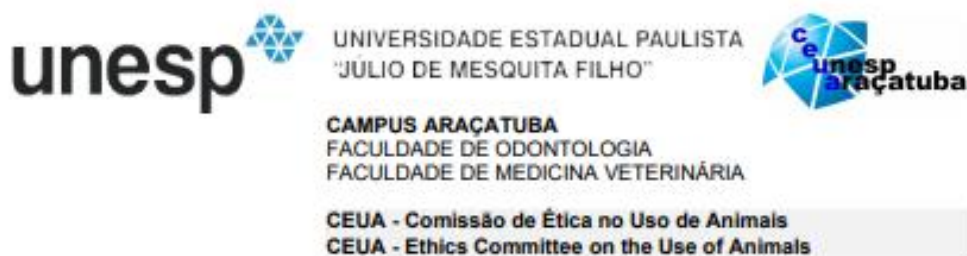
- M.C. Monteiro, C.S. Ferraz Maia, R.R. Lima, Blood oxidative stress modulates alveolar bone loss in chronically stressed rats, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 3728, <https://doi.org/10.3390/ijms21103728>.
49. V. Domazetovic, G. Marcucci, T. Iantomasi, M.L. Brandi, M.T. Vincenzini, Oxidative stress in 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>.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA)



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Estudo in vivo do efeito da ozonioterapia como prevenção e/ou tratamento da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos"**, Processo FOA nº 0236-2021, sob responsabilidade de Francisley Ávila Souza apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 22 de Outubro de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 28 de Fevereiro de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 28 de Março de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"In vivo study of the ozone therapy effect in medication-related osteonecrosis of the jaw as prevention and/or treatment"**, Protocol FOA nº 0236-2021, under the supervision of Francisley Ávila Souza presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 22, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 28, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 23, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator