

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



Dissertação de Mestrado

**EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA E DO OZÔNIO NO REPARO ÓSSEO
APÓS USO DE ÁCIDO ZOLEDRÔNICO: ESTUDO IN VIVO.**

Leonardo Nogueira de Miranda Pereira Pinto

Brasília, 27 de março de 2024

Leonardo Nogueira de Miranda Pereira Pinto

**EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA E DO OZÔNIO NO REPARO ÓSSEO
APÓS USO DE ÁCIDO ZOLEDRÔNICO: ESTUDO IN VIVO.**

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Flaviana Soares Rocha

Brasília, 2024

Leonardo Nogueira de Miranda Pereira Pinto

**EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA E DO OZÔNIO NO REPARO ÓSSEO
APÓS USO DE ÁCIDO ZOLEDRÔNICO: ESTUDO IN VIVO.**

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

Data de defesa: 27/03/2024.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Flaviana Soares Rocha (Orientadora)

Prof. Dr. Alessandro Lourenço Januário (Externo)

Prof. Dr. Sérgio Bruzadelli Macedo (Interno)

Prof. Dr. Daniel Rey de Carvalho (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida que me deu e por estar presente nesse mundo podendo fazer a diferença em diversos campos. Por ter me dado talentos que só Ele soube como me conduziu até aqui, podendo frutificar e multiplicar com obras tão produtivas para outras vidas. Só Ele sabe o tanto que eu me empenho para ser alguém cada vez mais fiel ao dom que me foi dado, podendo distribuir sorrisos e saúde por esse mundo.

Não menos importante, aos meus pais, Andrea Nogueira e José Jair de Miranda. Ambos responsáveis por terem me recebido nesse mundo com a missão mais linda de criar uma vida, missão a qual desempenham de maneira brilhante. Eu não poderia ser mais grato pelos pais que tenho, que sempre me deram muito amor e nunca faltaram com nada. São as pessoas quem eu mais me espelho, com quem eu preendi meus princípios de vida, e ainda o casal que eu tenho orgulho de viver o amor deles. A eles eu espero honrar todos os dias que eu acordo, até a hora que vou dormir.

Ao meu irmão, André Nogueira, que por horas fez papel de pai, por horas fez papel de irmão, e ainda faz papel de amigo. Admiro seu coração e sua vontade de espalhar alegria. Quem me ensinou a ter fé, quem me introduziu na igreja, e por isso não teria como ser mais grato pela sua vida.

À minha família que ainda está presente, e aos que se foram. Cada um teve e ainda tem um papel muito importante na minha vida. Aos meus primos David, Eduardo, Alexandre, Diego e Yohanne, aos meus tios e tias, aos meus avós e avôs.

Agradeço pela vida da Beatriz Neves que chegou mudando totalmente minha vida. Minha namorada que me ajudou a realizar coisas impossíveis, inclusive a escrever minha dissertação de mestrado. Sua vida tem um papel muito especial em me tornar um homem melhor. Obrigado por chegar bagunçando minha vida.

Agradeço ainda de forma muito especial ao meu tutor Alessandro Januário e sua esposa Daniela Januário. Após um convite de trabalho mudaram minha vida profissional por completo. A quem eu me inspiro todos os dias a me tornar cada vez mais completo como profissional. O que é um papel muito difícil pois a régua é muito alta. Admiro muito vocês como casal e a família que têm. Obrigado por me inserirem nesse contexto.

Aos meus colegas Paulo Victor Braz e Lucas Capeletti, que começou como colegas, depois amigos, e hoje tenho como verdadeiros irmãos. Andar com vocês ao meu lado me fez almejar novos caminhos e melhores resultados. Vocês são meus contemporâneos que mais me inspiram.

Aos meus incontáveis alunos que me ensinam dia a dia, com certeza muito mais do que eu posso dar a eles. Por eles tenho o dever de ser um professor melhor e estar cada vez mais atualizado e inserido num contexto de excelência profissional. Tenho muito carinho por vocês, obrigado por me permitirem exercer o dom que Deus me deu.

Aos meus amigos que eu denomino como amigos do lago norte. Rodolfo, Rubens, Matheus, Maurício, Pedro, Hiro, Lucas, Ana Luísa, Ana Orefice, Larissa e Karen. Que estão na minha vida desde que eu me conheço por gente, por isso acompanharam todas as fases da minha vida, e mesmo nas ruins foram os melhores amigos.

A todos os meus professores, desde o maternal até os dias de hoje. Sei hoje o quanto se dedicaram e o quanto são apaixonados pela docência, pois sem amor não há como se dedicar à essa profissão. Obrigado por terem insistido em mim, por terem me ensinado respeito, humildade, princípios de vida e tudo que eu sei sobre qualquer disciplina. Vocês foram todos minha maior fonte de motivação por quem eu queria me tornar, e hoje sou; professor.

Não poderia faltar, à minha orientadora desse mestrado, a professora Flaviana Soares Rocha. Sem você nada disso seria possível, e sei que não me escolheu como orientado e por isso mesmo agradeço por todo seu empenho e compreensão. Digo que foi mais que uma orientadora, foi uma mãe.

RESUMO

A remodelação óssea é um processo complexo influenciado por características intrínsecas dos ossos e por fatores externos. Atualmente, o uso de antirreabsortivos e antiangiogênicos tornou-se comum na prática clínica, indo além do tratamento de neoplasias com metástase óssea para incluir indivíduos com osteoporose. No entanto, esses medicamentos podem gerar efeitos indesejáveis como a Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicamentos (MRONJ). Portanto, há interesse crescente em terapias como a Oxigenação Hiperbárica (OH) e o Ozônio (OZ), que podem mitigar esses efeitos adversos. Este estudo visa compreender como o ácido zoledrônico afeta a reparação óssea alveolar e como tratamentos adjuvantes podem otimizar esse processo. Foram utilizados 54 ratos machos da linhagem Wistar, distribuídos aleatoriamente em grupos Controle, Osteonecrose, Osteonecrose+OZ, Osteonecrose+OH e Osteonecrose+OZ+OH, com avaliações realizadas em períodos de 14 e 28 dias pós-exodontia. Foram realizadas análises histológicas, histomorfométricas e microtomografia computadorizada para avaliar o reparo ósseo. O uso de ácido zoledrônico causou alterações significativas no reparo ósseo alveolar, mesmo na ausência de MRONJ clinicamente evidente. Essas alterações foram mais evidentes aos 14 dias após a extração dentária, um momento crítico no processo de reparação óssea. Os tratamentos com OH e OZ mostraram-se benéficos para o reparo ósseo, com a combinação das duas terapias resultando em melhorias no volume ósseo total. Todos os grupos apresentaram um aumento no volume ósseo ao longo do tempo, e a combinação das terapias manteve resultados próximos ao grupo controle. Os resultados demonstram que o ácido zoledrônico causa alterações significativas no reparo ósseo alveolar, e que os tratamentos com OH e OZ, especialmente quando combinados, favoreceram o reparo ósseo. Apesar dos benefícios observados, esses tratamentos não conseguiram reverter completamente os danos causados pelo ácido zoledrônico.

Palavras-chave: Osteonecrose; bisfosfonatos; modelos animais; Ozonioterapia; Oxigenação Hiperbárica

ABSTRACT

Bone remodeling is a complex process influenced by intrinsic bone characteristics and external factors. Currently, the use of antiresorptive and antiangiogenic agents has become common in clinical practice, extending beyond the treatment of neoplasms with bone metastasis to include individuals with osteoporosis. However, these medications can lead to undesirable effects such as Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ). Therefore, there is growing interest in therapies such as Hyperbaric Oxygenation (OH) and Ozone (OZ), which can mitigate these adverse effects. This study aims to understand how zoledronic acid affects alveolar bone repair and how adjunctive treatments can optimize this process. Fifty-four male Wistar rats were randomly assigned to Control, Osteonecrosis, Osteonecrosis+OZ, Osteonecrosis+OH, and Osteonecrosis+OZ+OH groups, with evaluations conducted at 14 and 28 days post-exodontia. Histological, histomorphometric, and computed tomography analyses were performed to assess bone repair. The use of zoledronic acid caused significant alterations in alveolar bone repair, even in the absence of clinically evident MRONJ. These changes were most pronounced at 14 days after tooth extraction, a critical time in the bone repair process. OH and OZ treatments were beneficial for bone repair, with the combination of both therapies resulting in improvements in total bone volume. All groups showed an increase in bone volume over time, and the combination of therapies maintained results close to the control group. The results demonstrate that zoledronic acid causes significant alterations in alveolar bone repair, and treatments with OH and OZ, especially when combined, favored bone repair. Despite the observed benefits, these treatments were unable to completely reverse the damage caused by zoledronic acid.

Keywords: Osteonecrosis; bisphosphonates; Ozone; Hyperbaric Oxygen

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Gráficos representativos dos valores de volume ósseo, número de trabéculas ósseas, espessura das trabéculas ósseas e espaçamento das trabéculas ósseas entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias. (* $p < 0,05$)

Figura 2: Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo Controle, nos períodos de 14 e 28 dias. HE.

Figura 3: Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo Osteonecrose, nos períodos de 14 e 28 dias. HE.

Figura 4: Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo Osteonecrose + Ozônio, nos períodos de 14 e 28 dias. HE.

Figura 5: Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo Osteonecrose + Oxigenação Hiperbárica, nos períodos de 14 e 28 dias. HE.

Figura 6: Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo Osteonecrose + Ozônio + Oxigenação Hiperbárica, nos períodos de 14 e 28 dias. HE.

Figura 7: Gráficos representativos dos valores de histomorfometria - neoformação óssea entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias. (* $p < 0,05$)

Figura 8: Gráficos representativos dos valores de histomorfometria – vasos sanguíneos entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias. (* $p < 0,05$)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Delineamento experimental.

TABELA 2: Valores de volume ósseo, número, espessura e espaçamento das trabéculas ósseas, entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias.

TABELA 3: Valores de histomorfometria – neoformação óssea, entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias.

TABELA 4: Valores de histomorfometria – vasos sanguíneos, entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOMS – Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais
ATA - Atmosfera Absoluta
ATP – Adenosina Trifosfato
BF – Bisfosfonato
BRONJ – Osteonecrose dos Maxilares Associada aos Bisfosfonatos
BV/TV - Volume Ósseo/Volume Total
CO – Monóxido de Carbono
CONCEA – Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DMAb – Denosumab
DRONJ – Osteonecrose dos Maxilares Associada ao Denosumab
EGF – Fator de Crescimento Epidérmico
FPPS – Farnesil Pirofosfato Sintase
GPx – Glutathione Peroxidase
HE – Hematoxilina e Eosina
HIF – Fator Induzível por Hipóxia
IA – Inteligência Artificial
IL-6 – Interleucina 6
MicroCT – Microtomografia Computadorizada
MRONJ - Osteonecrose dos Maxilares Associada aos Medicamentos
NBOT – Oxigênio Normobárico
NO - Óxido Nítrico
OH - Oxigenação Hiperbárica
OZ - Ozônio
RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio
ROI - Região de Interesse
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
SOD – Superóxido Dismutase
Tb.N* - Número de Trabéculas Ósseas
Tb.Sp* - Espaçamento das Trabéculas Ósseas
Tb.Th* - Espessura das Trabéculas Ósseas
TM – Tricrômio de Mallory
Treg – Células T Reguladoras
UHMS – Undersea and Hyperbaric Medical Society
UnB – Universidade de Brasília
UV – Luz Ultravioleta
VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial
ZA – Ácido Zoledrônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Bisfosfonatos	15
2.2 História e Epidemiologia	15
2.3 Farmacologia dos Bisfosfonatos.....	17
2.4 Modo de ação dos Bisfosfonatos.....	18
2.5 Indicações clínicas para o uso dos Bisfosfonatos.....	19
2.6 Osteonecrose dos Maxilares associada aos medicamentos (MRONJ) ..	20
2.7 Fatores de risco da MRONJ	21
2.8 Oxigenação Hiperbárica	22
2.8.1 Mecanismo de ação da Oxigenação Hiperbárica	23
2.8.2 Oxigenação Hiperbárica e Angiogênese	24
2.8.3 Efeitos antimicrobianos da Oxigenação Hiperbárica	25
2.8.4 Modulação imunológica da Oxigenação Hiperbárica	26
2.8.5 Efeitos celulares e moleculares da Oxigenação Hiperbárica	27
2.9 Ozonioterapia	29
2.9.1 Mecanismo de ação do ozônio terapêutico	30
2.9.2 Aplicações médicas do ozônio	32
2.9.3 Ozônio na Odontologia.....	33
2.9.4 Ozônio e MRONJ	34
3 HIPÓTESES	36
3 OBJETIVOS	37
4 METODOLOGIA	38
4.1 Caracterização da amostra.....	38
4.2 Indução da Osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos.....	38
4.3 Oxigenação hiperbárica	39
4.4 Ozônio	39
4.5 Obtenção das amostras.....	39
4.6 Análise Microtomográfica	40
4.7 Análise Histológica	41
4.8 Análise Histomorfométrica	41
4.9 Análise Estatística	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Análise Microtomográfica	43
5.2 Análise Histológica	46
5.3 Análise Histomorfométrica	51
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	58
8 REFERÊNCIAS	59
ANEXO I	70

1 INTRODUÇÃO

Os ossos desempenham funções fundamentais no organismo humano, contribuindo para a organização, sustentação e proteção de órgãos internos em conjunto com os músculos esqueléticos. Além disso, desempenham um papel crucial no armazenamento e equilíbrio de minerais e triglicerídeos, assim como na produção de células mesenquimais, eritrócitos, leucócitos e plaquetas através da medula óssea, um tecido conjuntivo especializado presente nos ossos longos.

Embora aparentem ser estruturas inertes e estáticas, os ossos são altamente dinâmicos, passando por um processo contínuo de formação e reabsorção conhecido como remodelação óssea. Alterações nesse processo resultam em mudanças nas propriedades estruturais e na composição óssea, impactando tanto a geometria macroscópica quanto a microarquitetura. A remodelação permite que o osso se adapte aos estímulos, ajustando a arquitetura do esqueleto em resposta ao desenvolvimento e ao estresse sofrido.

A remodelação óssea é um processo complexo e influenciado por características intrínsecas dos ossos, bem como fatores extrínsecos, como traumas, o uso de medicamentos/drogas, especialmente antirreabsortivos e antiangiogênicos, e terapias comumente indicadas para o tratamento de algumas patologias, como a radioterapia.

O emprego de antirreabsortivos e antiangiogênicos está cada vez mais difundido na rotina dos pacientes. O que outrora estava predominantemente associado ao tratamento de neoplasias com propensão à metástase óssea, agora é extensivamente utilizado por indivíduos com algum grau de osteoporose e, em certos casos, até mesmo em situações de osteopenia. Essas substâncias demonstram eficácia no tratamento de doenças caracterizadas pela reabsorção óssea, oferecendo segurança em casos de neoplasias, como cânceres de mama e próstata, que possuem potencial de metastatização para os tecidos ósseos(1)

Entretanto, tais medicamentos estão frequentemente associados a um efeito colateral importante, atualmente designado como Osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de medicamentos (MRONJ) (2). A MRONJ é uma condição patológica caracterizada pela exposição óssea persistente na região maxilofacial por mais de oito semanas, com histórico de tratamento com agentes antirreabsortivos ou

antiangiogênicos, excluindo casos com radioterapia nos maxilares ou metástase maxilar(1,3).

Anteriormente, a terminologia utilizada para esta patologia era Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Bisfosfonatos (BRONJ), pois os primeiros casos documentados estavam associados especificamente aos bisfosfonatos. Hoje, já se sabe que a terminologia MRONJ é mais apropriada visto que medicamentos como bisfosfonatos (Ex: alendronato, risedronato, neridronato ibandronato, pamidronato, ácido zoledrônico), inibidores do ligante RANK (Ex: denosumabe) e antiangiogênicos (Ex: sunitinib, sorafenib, bevacizumabe e sirolimus) estão associados ao desenvolvimento da osteonecrose (3). As causas da MRONJ ainda são obscuras, mas parecem advir de uma complexa interação entre o metabolismo ósseo, trauma local, infecção, hipovascularização e o uso desses medicamentos. Neste trabalho, o enfoque serão os bisfosfonatos, pois foram as medicações utilizadas para indução de MRONJ no experimento.

Os bisfosfonatos atuam impedindo a diferenciação e a atuação dos osteoclastos, resultando em inibição da reabsorção óssea e, por conseguinte, interrompendo o metabolismo ósseo local. Doenças que propiciam metástase óssea ou que causam um desequilíbrio no balanço do metabolismo ósseo, resultando em maior reabsorção que neoformação, como osteoporose e osteopenia, são particularmente beneficiadas por esses tratamentos (4). Entretanto, essas medicações podem desencadear o surgimento de áreas de tecido ósseo necrótico.

As áreas de osteonecrose podem permanecer assintomáticas enquanto recobertas pelos tecidos moles circundantes. Quando ocorre a ruptura da integridade dos tecidos moles, podendo iniciar-se como uma fístula, o osso necrótico é exposto, tornando-se um meio propício para a proliferação bacteriana (5), apresentando um desafio substancial para o cirurgião dentista.

Um desafio contemporâneo consiste no diagnóstico precoce de sítios necróticos, visando a prevenção da eventual exposição da osteonecrose. A identificação de aspectos imaginológicos, particularmente com o auxílio da Inteligência Artificial (IA), tem tornado cada vez mais real a perspectiva de diagnóstico e tratamento precoces. Certos achados imaginológicos podem ser valiosos quando correlacionados ao histórico do paciente, na busca por medidas preventivas em pacientes de risco, possibilitando um diagnóstico precoce antes do desenvolvimento

da MRJON. Contudo, essa abordagem ainda não está plenamente integrada à prática clínica odontológica (6).

Diversas abordagens terapêuticas têm sido exploradas no contexto das MRONJs, desde intervenções mais invasivas, como remoção cirúrgica, até terapias conservadoras como agregados plaquetários, medicamentos com propriedades bactericidas e bioestimulantes, laser de baixa potência, ozônio e oxigenação hiperbárica. A combinação dessas terapias é frequentemente considerada para otimizar os resultados (7–9).

Nesse cenário de uso de medicamentos antirreabsortivos, prevenção e tratamento das MRONJs, diversos modelos de estudo *in vivo* foram propostos. Evidências robustas apoiam o uso de terapias com diferentes formas de ozônio (gás, diluído em água destilada ou na forma de óleo ozonizado, administrado local ou sistemicamente) para o tratamento e prevenção da MRONJ (10,11). Similarmente, existem evidências substanciais do uso oxigenação hiperbárica para a mesma finalidade, sendo empregada tanto na prevenção quanto no tratamento das MRONJ (12).

O presente estudo propôs um modelo de pesquisa *in vivo* visando identificar o potencial de neoformação óssea em animais que fizeram uso do ácido zolendrônico e foram submetidos à exodontia e tratados com ozonioterapia e/ou oxigenação hiperbárica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bisfosfonatos

A neoformação óssea representa um desafio significativo para a medicina contemporânea, especialmente em face do surgimento de medicamentos que apresentam, como efeito colateral, modificações no metabolismo ósseo (13). Condições clínicas comuns, como osteopenia e osteoporose, e mesmo patologias menos frequentes, como neoplasias com potencial de metástase óssea, têm se beneficiado do uso de medicamentos antirreabsortivos como os bisfosfonatos. Estas substâncias são empregadas para reduzir a reabsorção óssea, controlando o avanço de doenças reabsortivas no tecido ósseo (14).

Historicamente, os relatos mais antigos de osteonecrose estão associados ao uso de bisfosfonatos, levando à inicial correlação entre osteonecrose dos maxilares e esses medicamentos, com a terminologia Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Bisfosfonatos (BRONJ) (2). Atualmente, a nomenclatura foi ajustada para Osteonecrose dos Maxilares Relacionada ao Uso de Medicamentos (MRONJ), conforme sugerido pela Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais. Essa modificação ocorreu porque os antireabsortivos como bisfosfonatos (Ex: alendronato, risedronato, neridronato, ibandronato, pamidronato, ácido zoledrônico), inibidores do ligante RANK (Ex: denosumabe) e antiangiogênicos (Ex: sunitinib, sorafenib, bevacizumabe e sirolimus) estão associados ao desenvolvimento da osteonecrose (1,3).

2.2 História e Epidemiologia

Os bisfosfonatos foram inicialmente sintetizados na metade do século XIX com o propósito original de atuarem como agentes quelantes de cálcio e outros minerais. No entanto, somente na década de 1960, essas substâncias passaram a ser efetivamente empregadas no tratamento de doenças do metabolismo do cálcio (15).

No início dos anos 60, o biofísico Marion David Francis (17) demonstrou o potencial dos polifosfatos e bisfosfonatos, como etidronato e clodronato, em influenciar o processo fisicoquímico associado à calcificação (16). A química investigada desses fosfatos, juntamente com estudos de compostos fosfatados, como o pirofosfato, foram os precursores dos bisfosfonatos modernos.

Em 1962, Fleisch sintetizou o pirofosfato ao estudar moléculas endógenas presentes na urina e saliva com propriedades similares de quelar o cálcio (18). O primeiro uso terapêutico medicinal ocorreu em 1967, quando Francis e Fleisch colaboraram com o ortopedista Andrew Basset, de Nova York, para tratar com sucesso uma criança de 16 meses com fibrodysplasia ossificante progressiva, utilizando o etidronato (HEDP) (19). Apesar da publicação, a utilização de bisfosfonatos para o tratamento de doenças ósseas em humanos só foi autorizada na década de 1980 (16).

Os bisfosfonatos desenvolvidos até então compartilham a atividade anti-osteoclástica, sendo estudados e utilizados para tratar diversas condições, como doença de Paget dos ossos, hipercalcemia maligna, metástase óssea e diferentes tipos de osteoporose. Eles tornaram-se a escolha terapêutica para um amplo espectro de condições que afetam principalmente idosos, principalmente mulheres pós-menopausa (20).

Contudo, os efeitos adversos, tolerabilidade e toxicidade começaram a ser discutidos em meio a relatos de eventos adversos, incluindo a Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Bisfosfonatos (BRONJ) (21). A incidência de osteonecrose relacionada a medicamentos varia significativamente, dependendo do medicamento, dose, via de administração, tempo de uso e frequência. Pacientes com doenças que exigem doses elevadas de medicamentos antirreabsortivos, especialmente pela via endovenosa, como doenças malignas e metástase óssea, geralmente enfrentam um risco maior de desenvolver Osteonecrose dos Maxilares Relacionada ao Uso de Medicamentos (MRONJ).

As medicações mais frequentemente associadas ao desenvolvimento de osteonecrose são o ácido zoledrônico (ZA) e o denosumabe (DMAb). Segundo Rosella et al, de 52 a 61% dos pacientes com alguma incidência de MRONJ relatam ter passado por extração dentária como evento prévio à osteonecrose (3). A prevalência nesses casos para pacientes com uso de bisfosfonatos orais é de 0,5% e de até 14,5% com uso de bisfosfonatos de uso endovenoso após uma extração dental (3).

Khan et al, em 2015 trouxeram um resultado de incidência de até 12.222 por 100.000 pacientes por ano para BRONJ e 2.316 por 100.000 pacientes por ano para

DRONJ (denosumabe), de forma espontânea sem extração ou demais manipulações cirúrgicas (22).

Outra indicação comum para o uso de bisfosfonatos é o tratamento da osteoporose e osteopenia, geralmente realizados com bisfosfonatos orais como alendronato e risedronato. Essas medicações administradas por via oral apresentam menor risco de desenvolvimento de MRONJ, com prevalência relatada entre 0% e 0,04%, resultando em uma incidência de até 69 por 100.000 pacientes por ano (22).

Considerando que o denosumabe é uma medicação relativamente nova, novas evidências indicam que seu uso em terapia sequencial após o bisfosfonato pode aumentar a prevalência de MRONJ em comparação com o uso de um único medicamento (23).

2.3. Farmacologia dos Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos são análogos dos pirofosfatos, com a molécula de oxigênio na fórmula P-O-P substituída por uma molécula de carbono, resultando na formulação P-C-P. Essa estrutura está ligada a um radical livre denominado R' (24), proporcionando uma afinidade ótima à hidroxiapatita e, conseqüentemente, ao mineral ósseo. A cadeia lateral R' é responsável pela ação inibitória dos osteoclastos (25).

Em relação à farmacologia dos bisfosfonatos, eles podem ser classificados em dois tipos, divididos pela presença ou não de uma molécula de nitrogênio. Os bisfosfonatos nitrogenados, além de inibir os osteoclastos, induzem a apoptose celular ao se converterem em uma molécula análoga à adenosina trifosfato (ATP), ligando-se de forma irreversível e interrompendo várias vias dependentes de ATP (26).

Os bisfosfonatos são comumente administrados por via oral ou intravenosa. A absorção dos bisfosfonatos orais ocorre pelo transporte paracelular no trato gastrointestinal (14,27). Entre os bisfosfonatos orais mais prescritos estão os BPs ligados a nitrogênio, como alendronato, risedronato e ibandronato, cuja absorção é aproximadamente 2 a 2,5%. Em contraste, os bisfosfonatos sem um átomo de nitrogênio em sua cadeia, como clodronato e etidronato, apresentam uma absorção ligeiramente menor, em torno de 0,7% (13).

Uma vez absorvidos pelo trato gastrointestinal, os bisfosfonatos não são imediatamente excretados pelos rins, a principal via de excreção desses compostos.

Inicialmente, eles são distribuídos pelo corpo e absorvidos pelo tecido ósseo (28). Cerca de 50% do medicamento absorvido é rapidamente incorporado pelo tecido ósseo, embora essa proporção possa variar de acordo com o metabolismo ósseo individual (29,30).

A ligação dos bisfosfonatos não nitrogenados ao tecido ósseo é mais fraca e, consideravelmente mais forte nos nitrogenados, como risedronato, ibandronato, pamidronato, alendronato e zoledronato, justificando a permanência prolongada desses medicamentos no tecido ósseo (31).

Uma vez ligados ao tecido ósseo, os bisfosfonatos são dissolvidos da hidroxiapatita durante o processo de reabsorção óssea pelos osteoclastos, podendo ser reabsorvidos pelo tecido ósseo ou liberados na circulação. A quantidade de bisfosfonato no esqueleto pode ser ainda mais incorporada durante a formação óssea contínua. A peculiaridade da ligação dos bisfosfonatos ao osso, sua possível reincorporação durante o metabolismo ósseo e a constante exposição ao medicamento explicam a eliminação lenta e prolongada desses compostos do esqueleto (32). A maior parte da droga retida no tecido ósseo é liberada no sangue durante o processo de remodelação óssea. Entretanto, essas moléculas liberadas podem ser reabsorvidas pelo tecido ósseo e reutilizadas para inibir os osteoclastos, o que pode perdurar por mais de uma década em seres humanos (21).

2.4. Modo de ação dos Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos (BFs), após serem absorvidos, entram na corrente sanguínea e são rapidamente captados pelo tecido ósseo, resultando em um tempo reduzido de meia-vida do medicamento e minimizando a exposição a tecidos não alvo quando administrada uma dose correta (33). Com a dosagem recomendada, os bisfosfonatos se concentram na superfície óssea e dentro dos osteoclastos ativos, sendo necessário um processo de remodelação para serem novamente captados pelo tecido (34).

Demonstrou-se tanto *in vivo* como *in vitro* que os bisfosfonatos atuam nos osteoclastos, reduzindo sua atividade de formação, metabolismo e tempo de vida. Essa via de ação também impacta outras células ósseas, como os osteoblastos, devido à regulação co-dependente entre as atividades de osteoclastos e osteoblastos. A inibição dos osteoclastos resulta na diminuição da atividade de neoformação óssea dos osteoblastos devido a uma ação indireta, conhecida como feedback. Assim, a

diminuição da formação de osteoclastos produzida pelos bifosfonatos em cultura de tecidos também tem sido atribuída a uma ação sobre os osteoblastos, que apoiam a formação de osteoclastos (35).

O mecanismo molecular de ação dos bisfosfonatos dentro dos osteoclastos depende da presença do grupo amino em sua composição. Bisfosfonatos com esse grupo inibem a produção de ATP, levando indiretamente à morte celular ao interferir nos processos celulares dependentes de ATP. Isso ocorre pela inibição da síntese de enzimas, como a farnesil pirofosfato sintase (FPPS), essencial na via do mevalonato, parte do metabolismo do colesterol. A via ativa do mevalonato é necessária para a prenilação, impedindo o funcionamento das GTPases celulares e a via de tráfego de proteínas na célula óssea (36).

Os bisfosfonatos nitrogenados apresentam alta afinidade pela molécula de hidroxiapatita. Durante o metabolismo ósseo normal, os osteoclastos secretam enzimas que acidificam o meio e promovem a degradação do tecido ósseo, expondo as moléculas de hidroxiapatita para ligação aos bisfosfonatos. Essas moléculas queladas são fagocitadas pelos osteoclastos, desencadeando a apoptose dessas células (36).

As diferenças nos mecanismos moleculares de ação podem explicar as observações na histomorfometria óssea, onde pacientes que recebem aminobifosfonatos apresentam osteoclastos inativos “flutuando” acima das superfícies ósseas, enquanto o osso exposto ao clodronato exhibe um número reduzido de células ósseas (37).

2.5. Indicações clínicas para o uso dos Bisfosfonatos

Inicialmente, os bisfosfonatos (Bfs) encontraram aplicação no tratamento da doença de Paget, sendo posteriormente estendidos para o manejo da osteoporose e osteopenia. A prescrição desses medicamentos é indicada com base no risco de fraturas ósseas, especialmente relevante em pacientes mais idosos, notadamente mulheres pós-menopausa. A idade é um fator de risco significativo para quedas de altura própria, aumentando a probabilidade de fraturas acidentais. Nesse contexto, os Bfs demonstraram reduzir em até 40% a progressão da doença, estabilizando-a em um estágio relativamente menos propenso a fraturas em regiões como fêmur, quadril e vértebras, com baixa incidência de efeitos colaterais (15).

Diante de seu potencial para controlar o metabolismo ósseo e compreendendo seus mecanismos de ação, os Bfs passaram a ser prescritos para doenças ósseas associadas ao câncer. Essa abordagem visa prevenir metástases ósseas em casos de câncer com propensão a disseminação para os ossos, contribuindo para a redução de dores e complicações ósseas associadas. As primeiras investigações nesse sentido foram conduzidas em pacientes com mieloma múltiplo (38,39).

2.6 Osteonecrose dos maxilares associada aos medicamentos (MRONJ)

Os aminobisfosfonatos estão intimamente associados à osteonecrose pela sua elevada afinidade ao tecido ósseo e dificuldade de degradação/eliminação do organismo (40,41). O ácido zoledrônico, um representante desse grupo administrado por via endovenosa, é reservado geralmente para pacientes com risco de metástase óssea, enquanto outros aminobisfosfonatos menos agressivos são amplamente prescritos para condições como osteoporose e osteopenia (41).

O aumento da prescrição de medicamentos para prevenção de doenças sistêmicas e metabólicas acompanha o envelhecimento populacional global (42). Pacientes com tumores malignos avançados de mama, próstata ou pulmão são particularmente propensos a metastatizar para sítios ósseos, com prevalências significativas (73%, 68% e 36%, respectivamente). Diante desses diagnósticos, os bisfosfonatos são frequentemente indicados como parte do tratamento (43).

O entendimento completo da fisiopatologia das MRONJs permanece incompleto, sendo considerada uma condição multifatorial que envolve a diminuição da remodelação óssea fisiológica, falta de resposta inflamatória adequada, inibição de angiogênese, presença de processos infecciosos, trauma local e o uso desses medicamentos (5,44).

Dois processos, "inside-outside" e "outside-inside", são propostos para explicar a etiopatologia das MRONJs. O primeiro sugere que a inibição da atividade dos osteoclastos leva à diminuição do turnover ósseo, resultando na falta de reparo de pequenos danos aos ossos maxilares, culminando em necrose tecidual e exposição óssea. O segundo baseia-se na diminuição da vascularização local e depressão do sistema imune, criando um ambiente propenso a infecções locais, que, quando contaminam o tecido ósseo exposto, levam à osteonecrose interna (45).

Em 2014, a Associação Americana de Cirurgiões Maxilofaciais e Orais (AAOMS) modificou o termo de BRONJ para MRONJ, reconhecendo que a condição não está exclusivamente relacionada aos bisfosfonatos, mas também a qualquer droga com propriedades antirreabsortivas e antiangiogênicas. MRONJs podem resultar em graves desordens funcionais e mastigatórias, exercendo uma influência significativa na qualidade de vida e, em casos extremos, levando a complicações fatais (5).

2.7. Fatores de Risco da MRONJ

Embora a patogênese da MRONJ ainda não seja completamente compreendida, a condição parece estar ligada às características únicas da região maxilomandibular, incluindo a presença de dentes e uma microbiota oral complexa. Procedimentos odontológicos invasivos, doenças periodontais e periapicais, além da extração dentária, são considerados fatores de risco cruciais, sendo os mais significativos (46).

Apesar de diversos estudos destacarem a extração dentária como um dos principais fatores de risco, atualizações relevantes foram apresentadas por Soutome S. et al. Eles propõem uma possível reavaliação do papel da extração dentária como fator de risco isolado, sugerindo que a doença dentária inflamatória subjacente pode ser o verdadeiro agente de risco para a MRONJ, especialmente em pacientes tratados com altas doses de BFs e DMAb (47). Observou-se ainda que os bisfosfonatos podem interferir no processo de reparo, dificultando a reabsorção óssea necessária após uma extração dentária infectada, o que poderia promover a retenção de sequestros ósseos necróticos ou infectados (48).

Em contrapartida, a literatura também sugere que o tratamento odontológico preventivo, realizado antes do início do tratamento com medicações antirreabsortivas/antiangiogênicas, reduz de forma significativa os fatores de risco. Portanto, é prudente que os pacientes passem por uma avaliação clínica e radiográfica conduzida por um cirurgião dentista, conforme solicitado pelos médicos prescritores de bisfosfonatos. Isso pode incluir a eliminação de todos os focos infecciosos e inflamatórios, podendo necessitar até mesmo de extração profilática de dentes com alterações patológicas (49).

Em síntese, os estudos indicam que a MRONJ pode resultar de uma interação complexa entre o uso de medicamentos antirreabsortivos/antiangiogênicos, trauma ou infecção local e a resposta óssea à terapia. A identificação precisa dos fatores de risco e o manejo adequado dos pacientes em risco são essenciais, demandando investigações adicionais para otimizar as estratégias de prevenção e tratamento desta condição (44).

A literatura apresenta diversas opções terapêuticas com potencial preventivo e curativo para as Osteonecroses dos Maxilares Relacionadas a Medicamentos (MRONJs). Entre essas opções, destacam-se os agregados plaquetários, como o plasma rico em plaquetas e a fibrina rica em plaquetas, a terapia com laser de baixa potência, podendo ou não ser associada à terapia fotodinâmica com azul de metileno (PDT), bem como terapias que combinam diferentes abordagens para o fornecimento de oxigênio e ativação tecidual em nível celular, como a Oxigenação Hiperbárica e o Ozônio (50,51).

2.8. Oxigenação Hiperbárica

A Oxigenoterapia Hiperbárica (OH) é uma abordagem terapêutica que expõe os pacientes a concentrações puras de oxigênio (O₂) em uma pressão atmosférica elevada. A pressão dentro da câmara hiperbárica pode atingir ou exceder 1,4 atmosferas absolutas (ATA), sendo que todas as indicações aprovadas pela Undersea and Hyperbaric Medical Society (UHMS) requerem que os pacientes respirem quase 100% de oxigênio em uma câmara pressurizada a um mínimo de 2 ATA (52)

A OH fundamenta-se nos princípios da física dos gases e na fisiologia do transporte de oxigênio. Sob condições normais de pressão atmosférica, o oxigênio é transportado predominantemente ligado à hemoglobina nos glóbulos vermelhos. Entretanto, ao aumentar a pressão atmosférica e a concentração de oxigênio, uma quantidade maior de oxigênio pode ser dissolvida diretamente no plasma sanguíneo, conforme a Lei de Henry. Isso resulta em uma entrega significativamente maior de oxigênio aos tecidos, independentemente da hemoglobina (53,54).

A terapia é geralmente administrada em câmaras hiperbáricas, que podem ser *monoplace*, destinadas a um único paciente, ou *multiplace*, capazes de acomodar vários pacientes simultaneamente. Nas câmaras *monoplace*, a própria câmara é

pressurizada com oxigênio puro, enquanto nas câmaras *multiplace*, os pacientes respiram oxigênio por meio de máscaras faciais, capuzes ou tubos endotraqueais (55).

A OH tem diversas aplicações clínicas aprovadas, como embolia gasosa, anemia grave, certas doenças infecciosas e perda auditiva sensorial idiopática. Além disso, seu uso foi destacado como tratamento primário para condições como intoxicação por monóxido de carbono (CO) e como adjuvante em outras, como pé diabético, com evidências científicas moderadas (56,57).

Os benefícios potenciais da OH incluem melhorias na cicatrização de feridas, propriedades antimicrobianas, modulação imunológica e angiogênese (58). O estudo sugere que a inclusão da OH em pesquisas clínicas futuras pode oferecer suporte adicional no manejo de diversas patologias. É importante ressaltar que, apesar dos benefícios, a OH também apresenta efeitos adversos e contraindicações, devendo ser aplicada com cautela e sob supervisão médica adequada (59).

2.8.1 Mecanismo de ação da Oxigenação Hiperbárica

Ao incrementar substancialmente o suprimento de oxigênio aos tecidos e, por conseguinte, às células, a Oxigenoterapia Hiperbárica demonstra a capacidade de otimizar o desempenho metabólico de todos os tecidos, tornando-se particularmente importante para tecidos em processo de cicatrização e com elevada taxa metabólica (60,61).

Além de desencadear esses processos celulares, a OH induz a angiogênese, que é o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. Esse estímulo à angiogênese é observado pela produção primária de óxido nítrico (NO), subsequente à regulação positiva de fatores de crescimento como fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e endotelina-1 [Figura 1]. Esses fatores de crescimento contribuem para a formação de novos vasos sanguíneos e aprimoram a circulação em áreas com deficiência de fluxo sanguíneo, otimizando a cicatrização de feridas e a recuperação de tecidos isquêmicos (62).

A atividade antimicrobiana da OH também é um aspecto importante de seu mecanismo de ação. A terapia contribui para a morte bacteriana direta pela exposição ao oxigênio, remoção de biofilmes, redução da diapedese de células brancas do sangue e do recrutamento de neutrófilos, promovendo, assim, a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-10 [Figura 1]. Esse efeito

antimicrobiano é relevante no tratamento de infecções crônicas e na prevenção de complicações infecciosas em feridas (63).

Outro aspecto fundamental da OH é sua capacidade de modular a resposta imunológica. A terapia pode resultar na regulação negativa do fator de transcrição NFκB, desencadeando o desligamento da resposta pró-inflamatória (IL-6) e uma polarização de linfócitos Th17 para Treg [Figura 1]. Esse efeito imunomodulador pode ser benéfico em condições inflamatórias crônicas e autoimunes, auxiliando na restauração do equilíbrio imunológico (64).

Em síntese, a OH possui mecanismo de ação amplo, proporcionando benefícios substanciais em diversas condições médicas. Através do aumento da disponibilidade de oxigênio, estímulo à angiogênese, atividade antimicrobiana e modulação imunológica, a OH pode aprimorar a cicatrização de feridas, combater infecções e contribuir para a recuperação de tecidos danificados. A inclusão da OH em pesquisas clínicas futuras pode ampliar ainda mais seu potencial terapêutico e as indicações clínicas para seu uso (64).

2.8.2. Oxigenação Hiperbárica e Angiogênese

A angiogênese e a melhora da microcirculação representam aspectos essenciais da Oxigenoterapia Hiperbárica (60,61). A angiogênese refere-se à formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes, sendo um mecanismo crucial na cicatrização de feridas e na recuperação de tecidos isquêmicos.

A OH estimula a angiogênese predominantemente por meio do aumento dos níveis de óxido nítrico (NO), um gás solúvel com propriedades vasodilatadoras e angiogênicas. O NO desempenha um papel fundamental na sinalização endotelial e na formação de novos vasos sanguíneos. A terapia hiperbárica induz a produção de NO, resultando na regulação positiva de fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a endotelina-1. Esses fatores são essenciais para o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos e para aprimorar a circulação em áreas previamente comprometidas por hipóxia ou isquemia (62).

A melhora da microcirculação é outro benefício significativo da OH. Aumentando a concentração de oxigênio no sangue e nos tecidos, a terapia melhora a oxigenação e a nutrição celular, essenciais para a função endotelial e a saúde

vascular. A elevação dos níveis de VEGF está associada à angiogênese e vasculogênese, processos que aprimoram a microcirculação e a entrega de oxigênio e nutrientes aos tecidos (65).

Estudos clínicos e experimentais fornecem evidências do impacto da OH na angiogênese e microcirculação. Em um modelo animal de tecido irradiado, a OH demonstrou ser mais eficaz na indução de angiogênese em comparação ao oxigênio normobárico (NBOT). Resultados *in vivo* sugerem que a tensão exercida pelo oxigênio hiperbárico modula a taxa de proliferação de células mesenquimais, aprimorando o fornecimento local de oxigênio e nutrientes, além de potencializar a cicatrização celular (66,67).

Em um ensaio clínico com pacientes portadores de feridas crônicas não cicatrizadas, a prescrição de 20 sessões de OH resultou em aumento dos níveis de VEGF e interleucina-6 (IL-6), indicando ativação de fatores de crescimento, reparo de feridas e angiogênese (62).

Através da indução da angiogênese e do aprimoramento da microcirculação, a OH emerge como um meio terapêutico eficaz para tratar diversas condições médicas, especialmente aquelas caracterizadas por hipóxia tecidual e circulação sanguínea comprometida. Evidências clínicas e experimentais ressaltam o potencial da OH para aprimorar a cicatrização de feridas e a recuperação tecidual, consolidando-a como uma opção valiosa na gestão de condições médicas complexas (62).

2.8.3. Efeitos Antimicrobianos da Oxigenação Hiperbárica

Os benefícios antimicrobianos da Oxigenoterapia Hiperbárica têm sido extensivamente investigados. A OH manifesta seus efeitos antimicrobianos por meio de diversos mecanismos, como a amplificação da atividade leucocitária, a inibição direta do crescimento bacteriano e a sinergia com antibióticos (68). Especificamente, a OH otimiza a função dos leucócitos, notavelmente dos neutrófilos, que produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) para destruição de microrganismos invasores. A terapia, ao elevar os níveis de oxigênio nos tecidos, aprimora a capacidade dos neutrófilos de gerar ROS, resultando em uma resposta imune mais eficaz contra infecções (68,69).

Além de fortalecer a resposta imunológica, a OH exerce efeito direto na inibição do crescimento de patógenos específicos, como bactérias anaeróbias, que são

particularmente sensíveis ao oxigênio. A exposição a concentrações elevadas de oxigênio pode ser letal para esses microrganismos, o que torna a OH um tratamento adjuvante eficaz em infecções causadas por bactérias anaeróbias, como o *Clostridium perfringens*, associado a infecções necrotizantes (70).

Além disso, a OH aprimora a eficácia dos antibióticos, facilitando a penetração desses agentes em áreas infeccionadas, especialmente em tecidos com suprimento sanguíneo comprometido. A terapia também potencializa o efeito de antibióticos dependentes de oxigênio, como aminoglicosídeos e quinolonas (68).

Outro aspecto importante dos efeitos antimicrobianos da OH é a sua capacidade de reduzir a formação de biofilmes bacterianos. Biofilmes são comunidades de microrganismos que se aderem a superfícies e são envoltos por uma matriz extracelular protetora. Eles são particularmente resistentes aos antibióticos e à resposta imune, e a OH tem mostrado ser eficaz na redução da formação de biofilmes, o que pode ser interessante para o tratamento de infecções crônicas (69).

Em síntese, a OH apresenta efeitos antimicrobianos abrangentes, incluindo aprimoramento da atividade leucocitária, inibição direta do crescimento bacteriano, sinergia com antibióticos e redução de biofilme. Tais efeitos conferem à OH um papel valioso no tratamento de infecções, especialmente aquelas complicadas por hipóxia tecidual ou resistência a antibióticos. A contínua pesquisa e aplicação clínica da OH continuarão a desvendar seu potencial no manejo de infecções, contribuindo para a melhoria dos resultados clínicos (64).

2.8.4. Modulação Imunológica da Oxigenação Hiperbárica

A Oxigenoterapia Hiperbárica tem demonstrado um notável potencial na modulação imunológica, sendo um dos efeitos mais importantes a alteração na quantidade de linfócitos T CD4+ e CD8+ (71).

Os linfócitos T CD4+ desempenham papel central na coordenação da resposta imune, auxiliando outras células, como linfócitos T CD8+, linfócitos B e macrófagos. Essenciais na resposta contra patógenos extracelulares, também participam na modulação para prevenir reações autoimunes. Já os linfócitos T CD8+ são responsáveis pela eliminação de células infectadas e tumorais. A OH pode influenciar a atividade e proliferação dessas células, afetando expressão de citocinas,

diferenciação celular e sobrevivência das células T, otimizando a quantidade dessas células para a resposta imune desejada (71).

A terapia tem a capacidade de adaptar a proporção CD4+:CD8+ conforme necessário, sendo benéfica em condições que demandam resposta imune intensa e útil em condições autoimunes, onde a modulação é preferível. Na artrite reumatoide, por exemplo, a OH demonstrou eficácia ao polarizar células Th17 para células T reguladoras (Treg), reduzindo significativamente a hipóxia celular. Este efeito é relevante, visto que células Th17 contribuem para a inflamação e autoimunidade, enquanto células Treg mantêm a tolerância imunológica (72).

Outro efeito observado é a redução na proliferação de linfócitos. Essa característica pode ser benéfica em condições autoimunes e inflamatórias, contudo, alguns estudos destacam a necessidade de cautela na prescrição de OH para tais condições. O estudo conduzido por Xu et al. sugere um papel promissor da OH em certas doenças autoimunes, analisando seu efeito geral em populações imunes e subconjuntos específicos de linfócitos Th1 e B (71–73).

A OH também ativa neutrófilos, células essenciais na resposta imune inicial, promovendo sua migração para regiões hiperóxicas, o que intensifica a eficácia contra patógenos invasores (71).

Concluindo, a OH exerce efeitos imunomoduladores importantes, com potencial benefício em condições associadas a um sistema imunológico desregulado. A modulação da proporção CD4+:CD8+, redução da proliferação de linfócitos, ativação e migração de neutrófilos, bem como efeitos favoráveis em doenças autoimunes e artrite reumatoide, ilustram sua aplicabilidade em condições inflamatórias. Pesquisas clínicas adicionais são necessárias para uma compreensão abrangente dos mecanismos imunológicos associados à OH (71–74).

2.8.5. Efeitos celulares e moleculares da Oxigenação Hiperbárica

A modulação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS) é um aspecto complexo e fascinante da Oxigenoterapia Hiperbárica (OH) (75). O aumento da disponibilidade de oxigênio produzido pela OH impacta profundamente a produção e regulação de ROS e RNS, moléculas reativas com papéis críticos em diversos processos biológicos (53,54,76)

Níveis controlados de ROS e RNS são gerados como subprodutos naturais do metabolismo celular, especialmente durante a fosforilação oxidativa mitocondrial. Embora em excesso possam causar danos celulares, em níveis controlados, são vitais para a sinalização celular e defesa contra patógenos. A OH, ao elevar os níveis de oxigênio, pode aumentar a produção de ROS e RNS de maneira benéfica se cuidadosamente controlada (77).

A produção aumentada de ROS durante a OH pode beneficiar a angiogênese, estimulando a expressão de fatores de crescimento como o VEGF, especialmente útil em condições de cicatrização difícil e recuperação pós-lesão ou isquemia (78). Contudo, é crucial destacar que o excesso de ROS e RNS pode ser prejudicial, levando ao estresse oxidativo e inflamação exacerbados. Portanto, a OH deve ser aplicada de maneira a maximizar benefícios terapêuticos e minimizar danos. Isso é alcançado por meio de protocolos que determinam duração, frequência, pressão e concentração de oxigênio nas sessões de OH (79).

A capacidade da OH de modular ROS e RNS está ligada à sua influência em outros fatores moleculares, como a regulação do fator induzível por hipóxia (HIF1 α) e ativação de vias de sinalização como as vias de ERK1/ERK2. A via ERK1/ERK2 ativa processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência e motilidade celular. A OH também pode influenciar a atividade de HIF1 α , vital na resposta ao estresse oxidativo, metabolismo energético, angiogênese e sobrevivência celular (80,81). Por isso, a OH pode induzir a expressão do Fator Induzível por Hipóxia (HIF), um fator de transcrição que responde a níveis baixos de oxigênio. Este regula a expressão de genes envolvidos em respostas ao estresse oxidativo, metabolismo energético, angiogênese e sobrevivência celular (81).

Em síntese, a OH desempenha um papel delicado na modulação de ROS e RNS, equilibrando efeitos terapêuticos e prevenção de danos celulares. Por meio de uma manipulação cuidadosa dos níveis de oxigênio, a OH otimiza a sinalização celular e a resposta imune, contribuindo para sua eficácia clínica em diversas condições patológicas (64,82,83). Além disso, em conjunto com sua função estimuladora da vascularização através da angiogênese, a OH pode estimular o aumento de óxido nítrico (NO), melhorando ainda mais o fornecimento de nutrientes e oxigênio.

Estudos indicam que a OH pode agir na prevenção do encurtamento dos telômeros, retardando o envelhecimento celular. Esses estudos também destacam

efeitos benéficos como a limpeza de células imunes senescentes, aceleração da proliferação de células basais epidérmicas, expressão de antioxidantes e melhoria do fluxo sanguíneo cerebral. Entretanto, são necessários mais estudos para estabelecer protocolos aplicáveis a essa finalidade (81,84,85).

Em estudo relacionado à fibromialgia, a OH demonstrou benefícios diretos na atividade cerebral, dor crônica e disfunção imune, sugerindo sua utilidade em condições crônicas como a fibromialgia, caracterizada por dor muscular generalizada e sintomas sistêmicos (86). Esses efeitos celulares e moleculares interconectados destacam a amplitude da eficácia clínica da OH em diversas condições patológicas.

2.9. Ozonioterapia

O ozônio, uma molécula composta por três átomos de oxigênio, ocorre naturalmente como um gás e é encontrado em pequenas quantidades no ar e dentro dos organismos. Para aplicações médicas, é produzido ao submeter oxigênio puro a uma alta tensão elétrica, resultando em uma mistura de ozônio e oxigênio (87). Pode ser administrado na forma de gás, água ou óleo, sendo a escolha baseada nos objetivos do tratamento e na região a ser realizada a terapia.

Devido à sua maior densidade e solubilidade em água em comparação ao oxigênio, o ozônio, como forte oxidante, reage prontamente com biomoléculas presentes na saliva e outras soluções. Sua natureza instável e meia-vida breve impedem o armazenamento, pois o ozônio gerado é altamente instável, especialmente na forma gasosa, reagindo com o que estiver em seu caminho. Naturalmente presente na atmosfera em uma camada de baixa pressão atmosférica, o ozônio desempenha um papel vital na proteção contra a radiação ultravioleta, embora possa ser prejudicial aos pulmões devido à defesa limitada dos tecidos respiratórios contra oxidantes. A toxicidade pode ser gerenciada por meio de equipamentos precisos de geração de ozônio e conhecimento adequado das doses para uso terapêutico sem riscos (88).

Para uso clínico, é essencial um gerador de ozônio com espectrofotômetro para garantir a precisão da concentração dentro da faixa terapêutica (11). O uso de oxigênio atmosférico em vez de oxigênio medicinal pode resultar em subprodutos tóxicos (88). Ao entrar em contato com tecidos, o ozônio se decompõe rapidamente em oxigênio molecular e um átomo de oxigênio reativo (oxigênio singlete), que reage

com várias substâncias. Dependendo da dose, pode interagir com carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em espécies reativas de oxigênio e produtos de oxidação lipídica, que em doses controladas atuam como mensageiros secundários com efeitos terapêuticos e biológicos. Dessa forma, o ozônio medicinal, quando bem utilizado, é capaz de induzir cascatas metabólicas importantes com diversas funções terapêuticas (87,88).

A faixa terapêutica de 5 a 100 microgramas/ml é utilizada em várias condições clínicas como tratamento coadjuvante que pode potencializar a terapia convencional e melhorar a qualidade de vida do paciente (89). O ozônio pode ser administrado sistemicamente ou localmente, mas deve ser aplicado com cuidado para evitar toxicidade (90,91). Na odontologia, o uso mais convencional é local, principalmente no Brasil. Quando necessário associar o uso sistêmico, é interessante e aconselhável que o cirurgião dentista compreenda as normas vigentes para cada meio de administração.

O gás ozônio pode ser utilizado em diferentes concentrações para efeitos antimicrobianos ou anti-inflamatórios. A água ozonizada é empregada em irrigações e bochechos odontológicos, enquanto o óleo ozonizado, mais estável, é utilizado em tratamentos pós-operatórios para acelerar a cicatrização (94, 11).

O gás ozônio é produzido por um gerador a partir do gás oxigênio, que recebe uma descarga elétrica, resultando em um rearranjo de sua molécula e na adição de mais um átomo de oxigênio, gerando uma mistura gasosa contendo oxigênio e ozônio. A preparação da água ozonizada envolve o uso de um cilindro de vidro contendo água bidestilada, através do qual a mistura gasosa de O₃ deve ser borbulhada continuamente por, no mínimo, 5 minutos para atingir a saturação. O ozônio não utilizado flui através de um tubo de silicone para um destruidor e é convertido em oxigênio. Dessa forma a água ozonizada contém ozônio solubilizado. Por sua vez, o óleo ozonizado é produzido quando o gás ozônio é borbulhado no azeite de oliva, tornando-o mais estável e viscoso. Para sua fabricação, é necessário o borbulhamento contínuo por aproximadamente 2 dias. A ozonização do azeite de oliva resulta na formação de compostos químicos chamados ozonídeos e peróxidos, que possuem propriedades terapêuticas.

2.9.1. Mecanismo de ação do Ozônio terapêutico

O ozônio exerce seus efeitos terapêuticos principalmente por meio de reações de oxidação, manifestando-se de maneira distinta em microrganismos e células humanas, devido à capacidade antioxidante destas últimas (93,94). Em bactérias e fungos, o ozônio danifica membranas citoplasmáticas e paredes celulares, levando à destruição de componentes vitais, como glicoproteínas e lipoproteínas. Além disso, interfere no sistema enzimático regulatório, aumentando a permeabilidade da membrana e resultando em rápida morte celular (93,94).

O ozônio afeta enzimas essenciais para a defesa antioxidante, como superóxido dismutase e catalase. Em células humanas, a presença de antioxidantes pode neutralizar os efeitos oxidantes do ozônio, protegendo-as contra danos. No entanto, células microbianas, com menor capacidade antioxidante, são mais suscetíveis à ação do ozônio (93).

A interação do ozônio com essas enzimas desempenha um papel significativo na modulação do estresse oxidativo celular. Quando expostas ao ozônio, as células iniciam respostas bioquímicas, estimulando a via do fator nuclear eritroide 2 relacionado (Nrf2). Essa via é crucial na regulação da expressão gênica antioxidante, resultando no aumento da produção de enzimas antioxidantes essenciais, como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx). Essas enzimas desempenham papéis essenciais na minimização do potencial de dano oxidativo às células (93,95).

Além de estimular a produção de enzimas antioxidantes, o ozônio pode induzir um estado controlado de estresse oxidativo. Este fenômeno paradoxal fortalece o sistema antioxidante celular, com pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio e peróxidos lipídicos atuando como sinais para o aumento da expressão e atividade das enzimas antioxidantes. Esse ajuste fino do estresse oxidativo permite que as células fortaleçam suas defesas contra agressões futuras (95).

A terapia com ozônio mostrou benefícios em condições de estresse oxidativo aumentado, como no diabetes, aliviando o estresse oxidativo e preservando a funcionalidade das enzimas antioxidantes. Este aspecto sugere um papel protetor do ozônio na preservação da integridade celular e função diante de desafios oxidativos (95,96).

No entanto, a dosagem do ozônio é um fator crítico, determinando se o efeito será benéfico ou prejudicial. Uma dosagem adequada pode resultar em um aumento benéfico na expressão e atividade das enzimas antioxidantes, enquanto uma dosagem excessiva pode causar danos celulares devido ao estresse oxidativo exacerbado. O ozônio, assim, exibe um efeito dual: causando danos diretos por meio de sua ação oxidante e, simultaneamente, induzindo um aumento nas enzimas antioxidantes, protegendo as células contra o estresse oxidativo. Esse mecanismo exemplifica o princípio hormético, onde uma exposição controlada a um agente estressor pode ter efeitos benéficos para o organismo (97).

2.9.2. Aplicações Médicas do Ozônio

Na área médica, o ozônio é amplamente estudado em diversos países. Devido à sua acessibilidade, amplo espectro de aplicação e custo relativamente baixo em comparação a diversas outras técnicas, o ozônio é predominantemente utilizado e pesquisado em países de baixa e média renda. Suas aplicações incluem formas tópicas, como água ozonizada e óleos ozonizados, utilizadas para estimular a cicatrização de feridas e exercer efeitos germicidas.

Por exemplo, a água ozonizada é empregada na lavagem de feridas, enquanto os óleos ozonizados são aplicados diretamente em lesões cutâneas para acelerar a recuperação e reduzir infecções (98). Injeções de ozônio podem ser administradas diretamente no local da lesão ou área afetada, sendo comumente empregadas no tratamento de condições dolorosas, como hérnias de disco, artrite e outras doenças articulares. Nesses casos, o ozônio auxilia na redução da inflamação e promoção da cura (99).

O ozônio também pode ser administrado sistemicamente. A administração sistêmica do ozônio é realizada por métodos como a insuflação retal, onde uma mistura de ozônio e oxigênio é introduzida no cólon. Esse método é utilizado para tratar diversas condições, incluindo doenças virais crônicas e agudas, arteriopatas obstrutivas, insuficiência venosa e doenças degenerativas vasculares (95,100,101).

No ano de 2022, Galluccio propôs uma terapia combinada envolvendo aquecimento, ozonização e exposição à luz ultravioleta (UV), apresentando resultados promissores no manejo da síndrome de Raynaud, com redução ou interrupção dos episódios por pelo menos três meses (102).

A solução salina ozonizada demonstrou eficácia como solução de irrigação, minimizando o desenvolvimento de abscessos em comparação com solução salina convencional e irrigação com salina-cefalotina (103).

Um método específico, denominado "ozonioterapia em sacos", utiliza um saco hermético ao redor da área a ser tratada, preenchido com ozônio e oxigênio. A absorção cutânea do gás torna esse método eficaz no tratamento de feridas abertas e úlceras, incluindo úlceras varicosas, diabéticas e de pressão, devido ao seu efeito bactericida, notadamente contra infecções por estafilococos, estreptococos e proteus (7).

Essas são apenas algumas das aplicações médicas do ozônio. Destaca-se que a eficácia e segurança da terapia com ozônio dependem do rigoroso controle da concentração de ozônio e da adesão a protocolos estabelecidos. Os sistemas de entrega de ozônio utilizados na prática médica são avançados, equipados com reguladores precisos e mecanismos de monitoramento para garantir a execução e manutenção das concentrações desejadas durante a terapia (98).

2.9.3. Ozônio na Odontologia

A aplicação do ozônio na odontologia representa uma abordagem inovadora e eficaz para o tratamento de diversas condições bucais. As propriedades antimicrobianas do ozônio, aliadas à sua capacidade de estimular a cicatrização e promover a remineralização dentária, o destacam como uma ferramenta valiosa nesse contexto (11).

No tratamento de cáries, o ozônio demonstra ser uma poderosa ferramenta terapêutica. Estudos e ensaios clínicos, como os conduzidos por Holmes J. e colaboradores (2003), evidenciam sua capacidade de reverter a cárie radicular e oclusal. A terapia com ozônio possibilita a eliminação de lesões cáries de maneira não invasiva, dispensando a remoção mecânica do tecido dentário afetado. Esta aplicação abrange diferentes formas de ozônio, como a gasosa, aquosa ou em óleo. (104)

Após o tratamento com ozônio, observa-se a estímulo à remineralização do esmalte dentário. O ambiente bucal torna-se propício à absorção de íons de cálcio e fosfato, essenciais para a reparação do esmalte. Os dentistas podem aprimorar esse

processo mediante o uso de coadjuvantes, tais como fluoretos, xilitol, probióticos, entre outros (105).

A prevenção de cáries é outra aplicação relevante do ozônio na odontologia. A insuflação de ozônio ao redor de todos os dentes e gengivas, realizada periodicamente com o uso de moldeiras de arco completo, é uma prática adotada como medida preventiva (106).

No âmbito da periodontia, destaca-se o uso do ozônio no manejo de infecções gengivais. O tratamento da doença periodontal, que pode resultar em halitose e perda dentária, envolve a aplicação de ozônio para reduzir a carga microbiana e a inflamação (105).

Na endodontia, o ozônio apresenta-se como uma abordagem promissora para o tratamento de infecções internas dos dentes. Enquanto a terapia endodôntica convencional pode não ser completamente eficaz na erradicação de microrganismos, o ozônio penetra profundamente nos tecidos, eliminando bactérias como o *Enterococcus faecalis*, além de vírus e fungos (105–107).

Em síntese, a terapia com ozônio na odontologia é apresentada como uma abordagem interessante, oferecendo múltiplas aplicações para aprimorar a saúde oral dos pacientes e, conseqüentemente, sua saúde sistêmica. A odontologia com ozônio representa uma área de crescente interesse, com potencial para transformar a prática odontológica através de tratamentos menos invasivos e mais direcionados à preservação dos tecidos dentários (104–107)

2.9.4. Ozônio e no tratamento de MRONJs

A pesquisa de Agrillo et al. (2012) destaca o êxito da ozonioterapia como tratamento complementar para a osteonecrose dos maxilares relacionada a bisfosfonatos (BRONJ). Eles enfatizam a capacidade do ozônio em promover a expulsão espontânea de tecido necrótico, potencialmente reduzindo a necessidade de intervenções cirúrgicas adicionais (108). As propriedades antissépticas e a capacidade de estimular a proliferação celular do ozônio são reconhecidas por contribuir à formação de sequestros ósseos e à cicatrização de tecidos moles (108,109).

Goker et al. (2020), em seu estudo, aplicaram um protocolo de tratamento com ozônio/oxigênio, alcançando uma taxa de sucesso de 64,2%. A combinação dessa

terapia com debridamento cirúrgico demonstrou-se segura e eficaz para o tratamento de BRONJ, controlando a infecção e promovendo a cicatrização dos tecidos (8,108,109).

O estudo de Petrucci M.T. et al. (2007) investigou a eficácia da ozonioterapia em combinação com antibióticos e cirurgia para pacientes com lesões ósseas expostas relacionadas a BRONJ. Embora os mecanismos específicos não tenham sido detalhados, a pesquisa sugere que a ozonioterapia, conhecida por suas propriedades antimicrobianas e capacidade de estimular a cicatrização, desempenha um papel benéfico no manejo dos sinais e sintomas associados à BRONJ (110).

Kazancioglu et al. (2013) associaram a ozonioterapia ao tratamento de laser de baixa frequência, observando uma atividade osteoblástica efetiva e uma matriz óssea bem formada. A combinação das duas terapias resultou em maior formação óssea em comparação ao grupo controle, destacando a eficácia da ozonioterapia na promoção da cicatrização óssea (51).

A revisão de literatura de Fliefel et al. (2015) abordou tratamentos variados para BRONJ, incluindo abordagens médicas e cirúrgicas minimamente invasivas, além de terapias adjuvantes como laser, fatores de crescimento, oxigênio hiperbárico e ozônio. O estudo, que analisou um extenso período de literatura científica, destacou a ozonioterapia como tratamento adjuvante promissor. Dos 161 pacientes tratados, 57,8% apresentaram completa cicatrização das lesões, enquanto 16,8% mostraram cicatrização parcial, evidenciando resultados positivos (Fliefel et al., 2015).

Importante ressaltar que nenhum paciente tratado com ozonioterapia apresentou progressão da lesão, sugerindo um efeito estabilizador. No entanto, 5% tiveram lesões com cicatrização negligenciável ou nula, indicando que a ozonioterapia pode não ser eficaz para todos os pacientes ou em todos os estágios da doença (46). Estes achados oferecem perspectivas promissoras sobre o uso da ozonioterapia como tratamento adjuvante para osteonecroses relacionadas a medicamentos.

3 HIPÓTESES

A hipótese alternativa é que oxigenação hiperbárica e o ozônio, isoladamente ou em associação, otimizam a reparação óssea alveolar após uso de ácido zoledrônico. A hipótese nula é que não há diferença entre os tratamentos.

4 OBJETIVOS

Avaliar, em modelo experimental em ratos, por meio de parâmetros histológicos, histomorfométricos e microtomografia computadorizada, as alterações do reparo ósseo alveolar após uso de ácido zoledrônico e tratamento com oxigenação hiperbárica e/ou ozônio.

5 METODOLOGIA

5.1 Caracterização da amostra

Foram utilizados 54 ratos machos *Rattus norvegicus*, da linhagem *Wistar*, clinicamente sadios com peso entre 150 a 250g. Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em gaiolas apropriadas, climatizadas à temperatura de 22°C, ciclo claro-escuro de 12 horas, e tratados com ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas da Lei nº 11.794, decreto nº 6.899 e demais legislações complementares do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), com aprovação prévia do CEUA-UFU (Protocolo 036/17).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos distintos conforme Tabela 1.

Tabela 1- Delineamento experimental

Grupos	14 dias	28 dias
SEM OSTEONECROSE Controle Positivo	N=3	N=3
OSTEONECROSE Controle Negativo	N=6	N=6
OSTEONECROSE + OZ	N=6	N=6
OSTEONECROSE + OH	N=6	N=6
OSTEONECROSE + OZ + OH	N=6	N=6
TOTAL	54 animais	

5.2. Indução da osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos

A indução foi realizada seguindo protocolo desenvolvido na Universidade de Brasília (UnB), com aplicação de Ácido zoledrônico 66 µg/Kg, intraperitoneal três vezes por semana, durante três semanas.

Cinco dias após este ciclo, foi realizada a exodontia de um molar inferior, bilateralmente, para indução da osteonecrose mandibular, sob anestesia geral através da injeção intraperitoneal, contendo 0,07ml/100g (1,61mg/100g) do relaxante

muscular cloridrato de xilazina 2% e 0,1ml/100g (1mg/100g) do anestésico e analgésico cloridrato de quetamina 10%.

No período pós-operatório foi administrado paracetamol em gotas para analgesia (10 gotas em 20 ml de água), durante quatro dias. Imediatamente após o procedimento cirúrgico, foram iniciadas as sessões de oxigenação hiperbárica e/ou ozônio.

5.3. Oxigenação hiperbárica

Os animais receberam sessões de OH no interior de câmaras “*monoplaces*” experimentais Ecobar 400 (Ecotec Equipamentos e Sistemas Ltda®, Mogi das Cruzes, SP, Brasil) conforme descrito por Rocha et al., 2015. Inicialmente houve um período de compressão 0.3ATA/min até atingir a pressão necessária para a sessão. A sessão teve duração de 90 minutos sob pressão de 2,5 ATA (ATA = 1 atmosfera absoluta = 760mmHg). Após, seguiu um período de decompressão a 0.3ATA/min. As sessões foram iniciadas logo após extrações dentárias e realizadas diariamente durante 14 e 28 dias conforme o subgrupo a qual pertence cada animal.

5.4. Ozônio

Os animais receberam sessões de ozônio utilizando um aparelho gerador de ozônio (O&L 1.5RM, Ozone Life®, Brasil). Foi realizada insuflação retal de ozônio seguindo protocolo desenvolvido na UNB, através do uso de uma cânula de Nelaton número 8, na dose de 1 mg/Kg. As sessões foram iniciadas logo após as extrações dentárias e realizadas diariamente durante 14 e 28 dias conforme o subgrupo a qual pertence cada animal.

5.5. Obtenção das amostras

Os animais foram submetidos à eutanásia nos intervalos de 14 e 28 dias após o início das terapias, por meio de aprofundamento anestésico seguido por deslocamento cervical, até que a morte dos animais pudesse ser constatada pela ausência dos sinais vitais, seguindo os princípios da Declaração dos Direitos dos

Animais. As mandíbulas foram removidos por desarticulação e seccionadas utilizando brocas 702 em alta rotação, sob irrigação abundante com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%.

Foram removidos 2 fragmentos contendo a área das extrações e tecidos adjacentes, sendo um do lado direito e outro do lado esquerdo. Um deles foi removido e imediatamente congelado em freezer -20° para obtenção das imagens microtomográficas a serem utilizadas na análise da microarquitetura óssea. O outro fragmento foi imediatamente fixado em paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,1M por 48 horas. Em seguida, este fragmento foi desmineralizado com solução de EDTA a 10% pH 7,4, e então processado para inclusão em parafina pela técnica convencional para as análises histológica e histomorfométrica.

5.6. Análise Microtomográfica

As peças foram posicionados em dispositivo padrão e escaneadas para análise microtomográfica conforme descrito por Rabelo et al., 2017(111,112). A microtomografia (MicroCT) foi realizada no aparelho de alta resolução Skyscan® 1276 (Bruker, Bélgica), com os parâmetros: energia 80kV, intensidade 125mA, resolução $8\mu\text{m}$ e filtro de alumínio 1 mm. Sequências seriadas foram agrupadas formando um volume e organizadas a fim de aplicar técnicas de análise e reconstrução 3D nos softwares NRecon®, Data Viewer® e CTVOX® e CT Analyzer® (Bruker, Bélgica). Para o pré-processamento das imagens foi utilizado um filtro Gaussiano. A região de interesse (ROI) foi definida como a área do alvéolo dentário correspondente à exodontia. Foi realizada uma análise qualitativa utilizando a reconstrução tridimensional da região de interesse. Em seguida, a região de neoformação óssea na ROI foi segmentada, sendo separado do tecido medular, no esquema fatia-por-fatia e ambos os volumes foram limiarizados (*thresholding*), no processo de binarização, para delinear e diferenciar os voxels relativos ou não ao osso.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: volume ósseo (BV/TV, %); número de trabéculas ósseas (Tb.N*, 1/mm), espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th*, μm) e espaçamento entre elas (Tb.Sp*, μm), calculados utilizando o método da transformada distância.

5.7. Análise histológica

O estudo morfológico das lâminas foi realizado com o emprego da microscopia óptica (microscópio óptico modelo BX50 Olympus®, Olympus Imaging America Inc. Shinjuku-ku, Tóquio/Japão), visando análise descritiva das mesmas. Para tal, foram utilizados os aumentos microscópicos de 40X e 100X. Na avaliação do reparo ósseo, foram examinadas lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômio de Mallory (TM).

5.8. Análise histomorfométrica

Na análise histomorfométrica foi quantificada a neoformação óssea e quantidade de vasos sanguíneos na região de interesse. As lâminas histológicas coradas em TM foram escaneadas utilizando o scanner digital Aperio AT Turbo® (Copyright© 2013 Leica Biosystems Imaging, Inc All Rights Reserved) no aumento de 20x. As imagens histológicas digitalizadas foram obtidas utilizando o programa de leitura de imagens Aperio ImageScope® (Copyright© Aperio Technologies, Inc 2003-2014. All rights reserved) da seguinte forma: em cada lâmina, foi delimitada dentro da ROI uma área de 1450µm X 800 µm com aumento de 20x, utilizando a ferramenta “Ruler Tool – F4”. Dessa forma, uma imagem contendo a área padronizada de 1.160.000µm² foi obtida com escala definida, para a mensuração da quantidade de vasos sanguíneos (em %) e neoformação óssea (em %), para cada lâmina avaliada.

A mensuração da quantidade de vasos sanguíneos foi realizada por um único examinador calibrado, no próprio software Aperio ImageScope®. Utilizando a ferramenta “Pen Tool F2”, foi realizada a demarcação do contorno individual dos vasos sanguíneos dentro da área padronizada na ROI. Em seguida, foi realizada a soma de todas as áreas individuais obtendo um valor final de área total de vasos sanguíneos da imagem. Por meio da razão entre a área total de vasos sanguíneos e área padronizada na ROI, foi obtida a quantidade de vasos sanguíneos (em %).

A mensuração da neoformação óssea foi realizada na mesma imagem, por um único examinador calibrado, utilizando o método descrito por Egan et al., (2012). Inicialmente, a imagem da área padronizada obtida no software Aperio ImageScope® foi transferida com escala para o software Adobe Photoshop® CS2 9.0 (Adobe®, Adobe System Inc., San Jose, CA/EUA). No Photoshop® foi realizada a segmentação,

obtendo-se imagens binárias em preto e branco, representando tecido ósseo e tecido não ósseo, respectivamente. Em seguida, as imagens binárias foram transferidas para o software ImageJ® (ImageJ 1.40g, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) para quantificação da área de tecido ósseo. Por meio da razão entre a área total de tecido ósseo e área padronizada na ROI, foi obtida a quantidade de neoformação óssea (em %).

5.9. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com o programa GraphPad Prism (GraphPad Prism® version 5.0 for Windows, San Diego, CA, USA). Inicialmente os valores obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, os parâmetros foram analisados utilizando os testes Kruskal-Wallis com correção de Dunns. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1. Análise microtomográfica

No intervalo de 14 dias, o Volume Ósseo (BV/TV) apresentou o maior percentual no grupo Controle. O grupo Osteonecrose mostrou o menor percentual. Os grupos experimentais Osteonecrose+OZ, Osteonecrose+OH e Osteonecrose+OZ+OH tiveram resultados similares. Entretanto, os tratamentos associados resultaram em maior volume ósseo entre os grupos experimentais, apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa. Em 28 dias, não houve diferença significativa no volume ósseo entre os grupos avaliados. Todos os grupos apresentaram um aumento percentual de volume ósseo quando comparado cada grupo ao longo do tempo (Tabela 2 e Figura 1).

A quantidade de trabéculas ósseas (Tb.N*) foi maior no grupo Controle em 14 dias seguido pelos grupos Osteonecrose+OH, Osteonecrose+OZ+OH, Osteonecrose e Osteonecrose+OZ. Em 28 dias, não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Quando comparado cada grupo ao longo do tempo, houve redução da quantidade de trabéculas ósseas nos grupos Controle, Osteonecrose+OH e Osteonecrose+OZ+OH, enquanto houve aumento nos grupos Osteonecrose e Osteonecrose+OZ (Tabela 2 e Figura 1).

A espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th*) foi maior nos grupos Osteonecrose+OZ e Osteonecrose+OZ+OH em 14 dias, seguido pelos grupos Controle, Osteonecrose+OH, e Osteonecrose, que apresentou os menores valores. Em 28 dias, não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Quando comparado cada grupo ao longo do tempo, houve aumento da espessura das trabéculas ósseas nos grupos Controle, Osteonecrose, Osteonecrose+OH e Osteonecrose+OZ+OH, enquanto houve redução no grupo Osteonecrose+OZ (Tabela 2 e Figura 1).

A separação entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp*) foi maior nos grupos Osteonecrose+OZ, seguido por Osteonecrose+OZ+OH e Osteonecrose em 14 dias. Os grupos Controle e Osteonecrose+OH, apresentaram os menores valores. Em 28 dias, não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Quando comparado cada grupo ao longo do tempo, houve aumento da separação entre as trabéculas ósseas nos grupos Controle e Osteonecrose+OH, enquanto houve redução nos

grupos Osteonecrose, Osteonecrose+OZ e Osteonecrose+OZ+OH (Tabela 2 e Figura 1).

Tabela 2- Valores de volume ósseo, número, espessura e espaçamento das trabéculas ósseas, entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias.

Grupos		14 dias	28 dias
Volume Ósseo (%)	SEM OSTEONECROSE Controle Positivo	71,53±0,98 ^(A,a)	82,63±0,65 ^(A,a)
	OSTEONECROSE Controle Negativo	16,07±0,33 ^(B,a)	57,64±17,25 ^(A,b)
	OSTEONECROSE + OZ	55,88±13,08 ^(A,a)	69,46±4,72 ^(A,a)
	OSTEONECROSE + OH	56,14±1,33 ^(A,a)	80,31±1,09 ^(A,a)
	OSTEONECROSE + OZ + OH	70,15±4,07 ^(A,a)	80,51±0,84 ^(A,a)
Número de trabéculas ósseas (1/mm)	SEM OSTEONECROSE Controle Positivo	0,0046±0,0002 ^(A,a)	0,0032±0,0002 ^(A,b)
	OSTEONECROSE Controle Negativo	0,0022±0,0003 ^(B,a)	0,0025±0,0002 ^(A,a)
	OSTEONECROSE + OZ	0,0021±0,0001 ^(B,a)	0,0030±0,0004 ^(A,b)
	OSTEONECROSE + OH	0,0038±0,0004 ^(A,a)	0,0027±0,0004 ^(A,b)
	OSTEONECROSE + OZ + OH	0,0031±0,0005 ^(AB,a)	0,0024±0,0001 ^(A,a)
Espessura das trabéculas ósseas (µm)	SEM OSTEONECROSE Controle Positivo	165,30±13,25 ^(AB,a)	307,50±3,76 ^(A,b)
	OSTEONECROSE Controle Negativo	61,67±1,00 ^(B,a)	223,80±68,24 ^(A,b)
	OSTEONECROSE + OZ	264,70±45,13 ^(A,a)	216,80±18,68 ^(A,a)
	OSTEONECROSE + OH	122,10±3,33 ^(AB,a)	319,40±57,04 ^(A,b)
	OSTEONECROSE + OZ + OH	257,30±59,43 ^(A,a)	352,00±5,58 ^(A,a)
Espaçamento entre as trabéculas ósseas (µm)	SEM OSTEONECROSE Controle Positivo	99,03±12,04 ^(A,a)	123,20±8,40 ^(A,a)
	OSTEONECROSE Controle Negativo	235,50±5,77 ^(B,a)	143,40±7,26 ^(A,a)
	OSTEONECROSE + OZ	254,90±52,64 ^(B,a)	217,90±64,18 ^(A,a)
	OSTEONECROSE + OH	144,20±5,77 ^(A,a)	164,90±14,57 ^(A,a)
	OSTEONECROSE + OZ + OH	244,30±29,14 ^(B,a)	102,90±8,84 ^(A,b)

Obs: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos de tratamento (p<0,05); Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística intragrupo ao longo do tempo (p<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

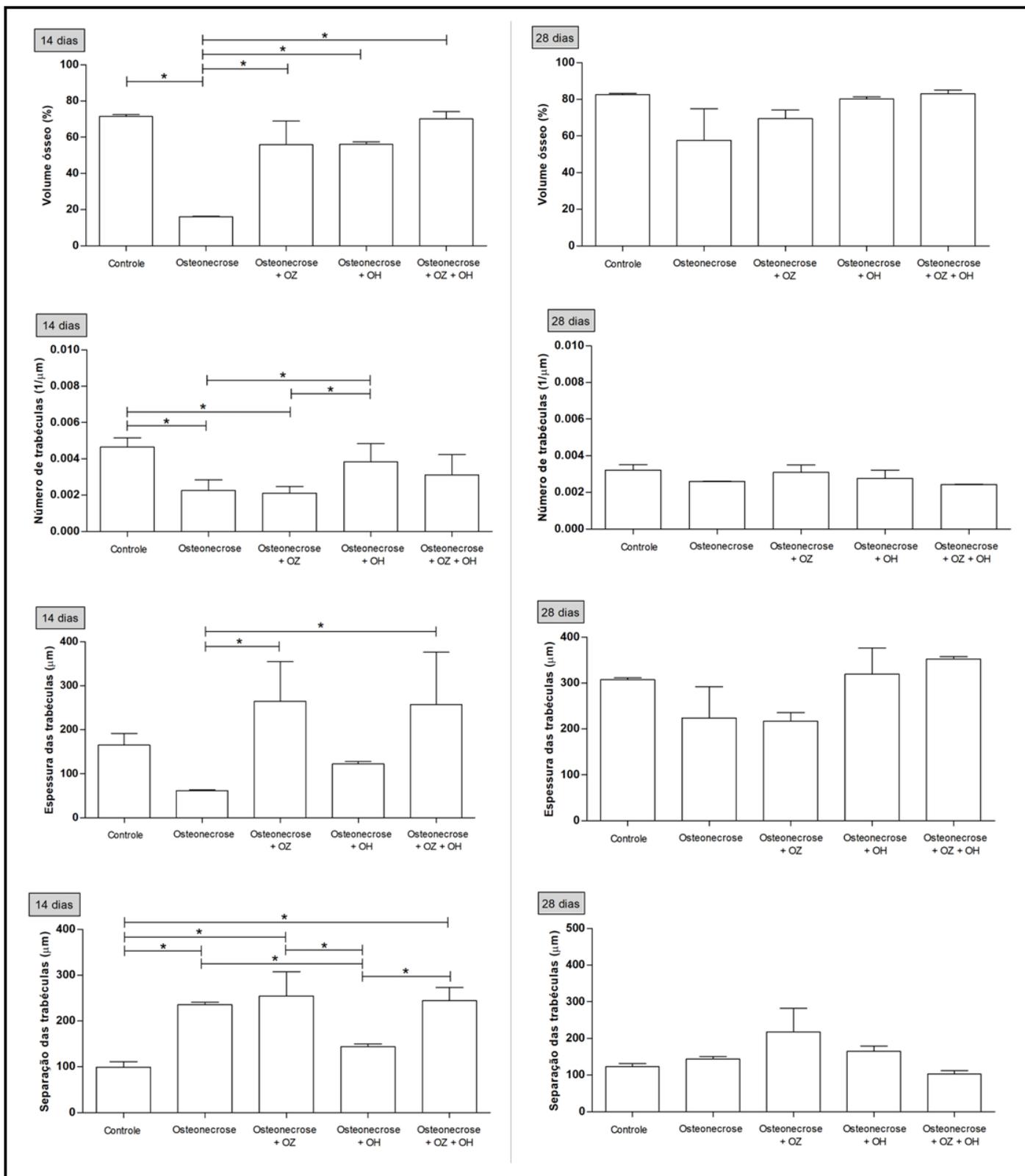


Figura 1: Gráficos representativos dos valores de volume ósseo, número de trabéculas ósseas, espessura das trabéculas ósseas e espaçamento das trabéculas ósseas entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias. (* $p < 0,05$)

6.2. Análise histológica

A análise morfológica mostrou no grupo Controle aspecto morfológico normal, com predominância de tecido ósseo do tipo primário preenchendo o alvéolo. Ele apresentava disposição não lamelar, formando trabéculas que delimitavam as cavidades de tecido medular e vasos sanguíneos. Grande número de osteócitos incluídos na matriz foram observados, além de osteoblastos cúbicos com basofilia citoplasmática revestindo a matriz óssea neoformada, que apresentava superfície regular. Áreas de tecido ósseo secundário foram observadas apenas após 28 dias, com trabéculas já bem-organizadas e definidas evidenciando avanço no processo de remodelação (Figura 2).

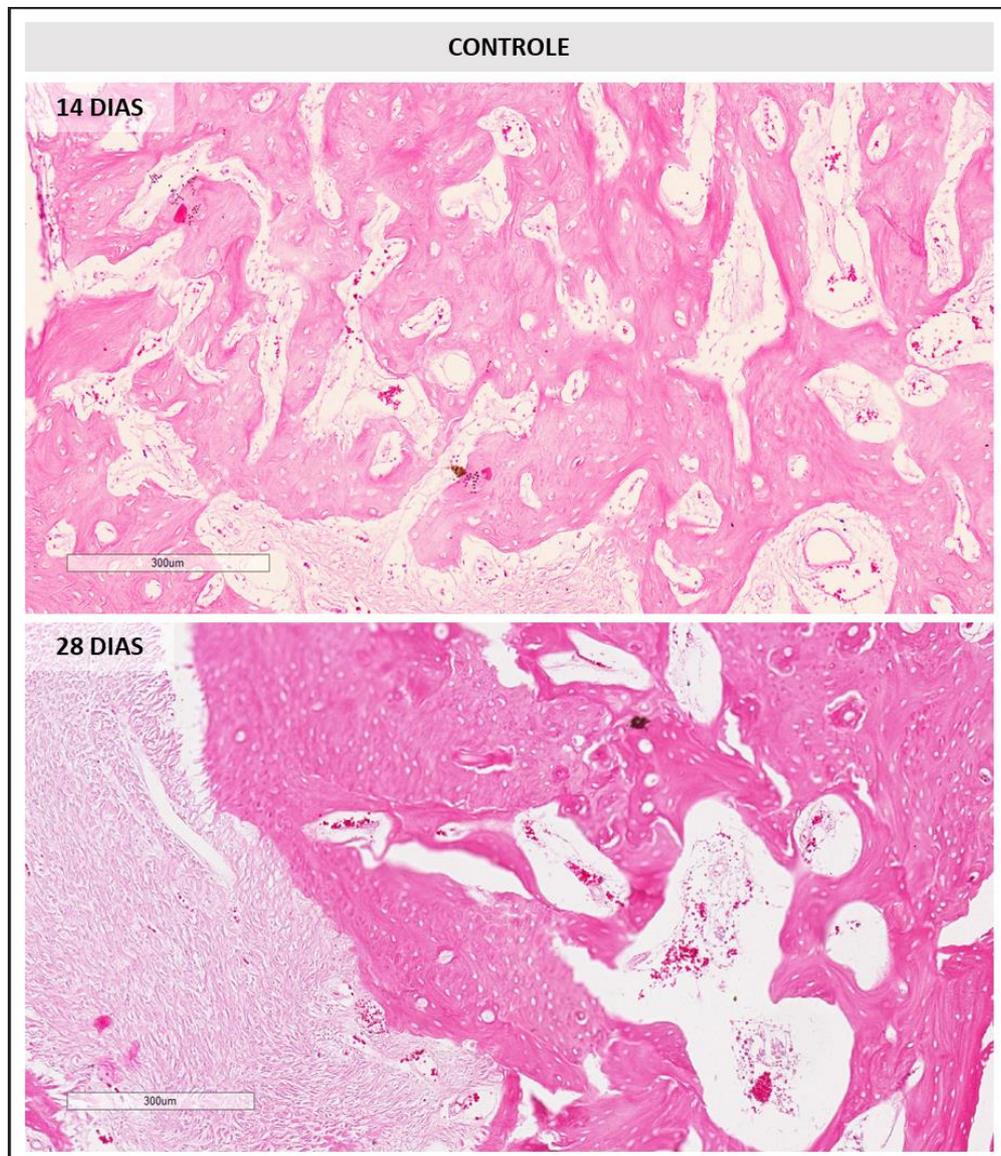


Figura 2: Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo Controle, nos períodos de 14 e 28 dias. HE.

No grupo osteonecrose foram observadas regiões de tecido conjuntivo e tecido ósseo primário pouco celularizado com aspecto morfológico “desorganizado e corroído”, por vezes com espaços semelhantes a “fissuras” e superfície irregular. Poucos osteoclastos foram observados, embora grande quantidade de lacunas de Howship na superfície da matriz óssea foram encontradas. Entre as trabéculas foi observado tecido medular pouco celularizado. Áreas discretas de tecido ósseo secundário, também desorganizadas foram observadas somente após 28 dias (Figura 3).

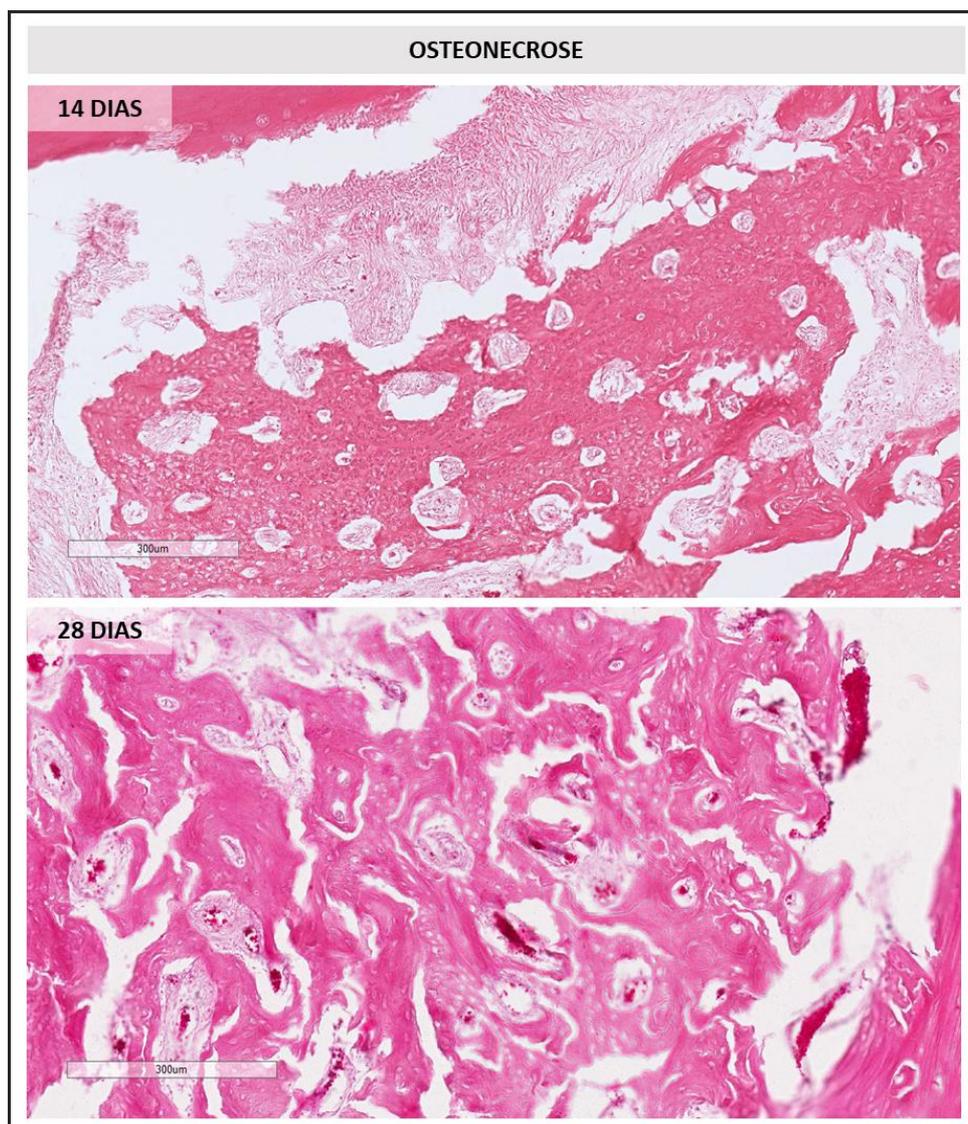


Figura 3: Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo Osteonecrose, nos períodos de 14 e 28 dias. HE.

Nos grupos Osteonecrose tratados com Ozônio, Oxigenação Hiperbárica ou a combinação dos tratamentos foi observada predominância de tecido ósseo do tipo

primário com aspecto morfológico menos desorganizado quando comparado ao grupo Osteonecrose sem nenhum tratamento. Lacunas de Howship vazias, tecido conjuntivo e irregularidades na superfície da matriz óssea ainda estavam presentes, mas foram menos frequentemente observadas quando comparado com o grupo Osteonecrose. Osteócitos incluídos na matriz foram observados. Entre as trabéculas foi observado tecido medular celularizado e por vezes, com presença de vasos sanguíneos, especialmente nos grupos tratados com Ozônio ou a combinação dos tratamentos. Áreas de tecido ósseo secundário, foram observadas após 28 dias (Figuras 3, 4 e 5).

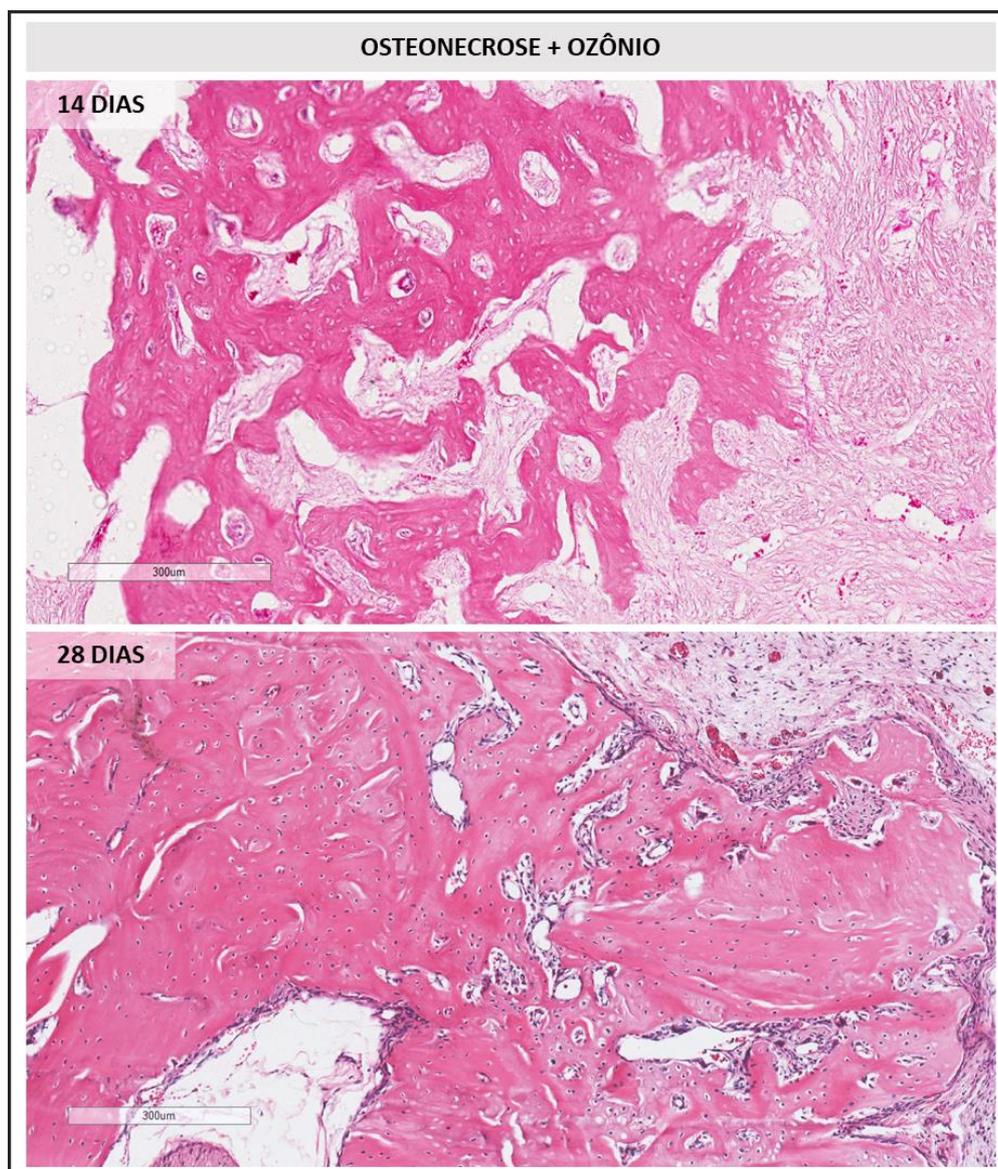


Figura 4: Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo Osteonecrose + Ozônio, nos períodos de 14 e 28 dias. HE.

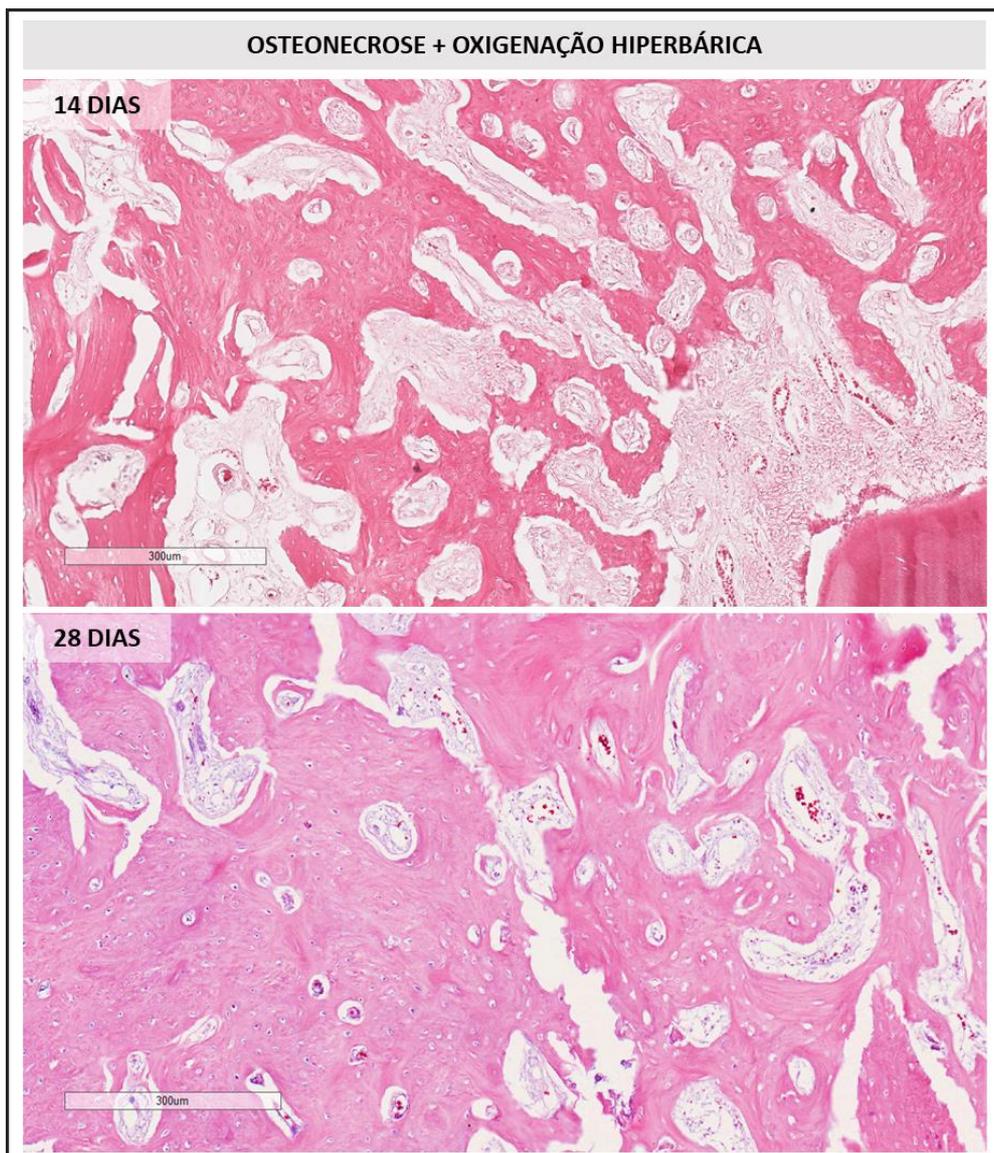


Figura 5: Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo Osteonecrose + Oxigenação Hiperbárica, nos períodos de 14 e 28 dias. HE.

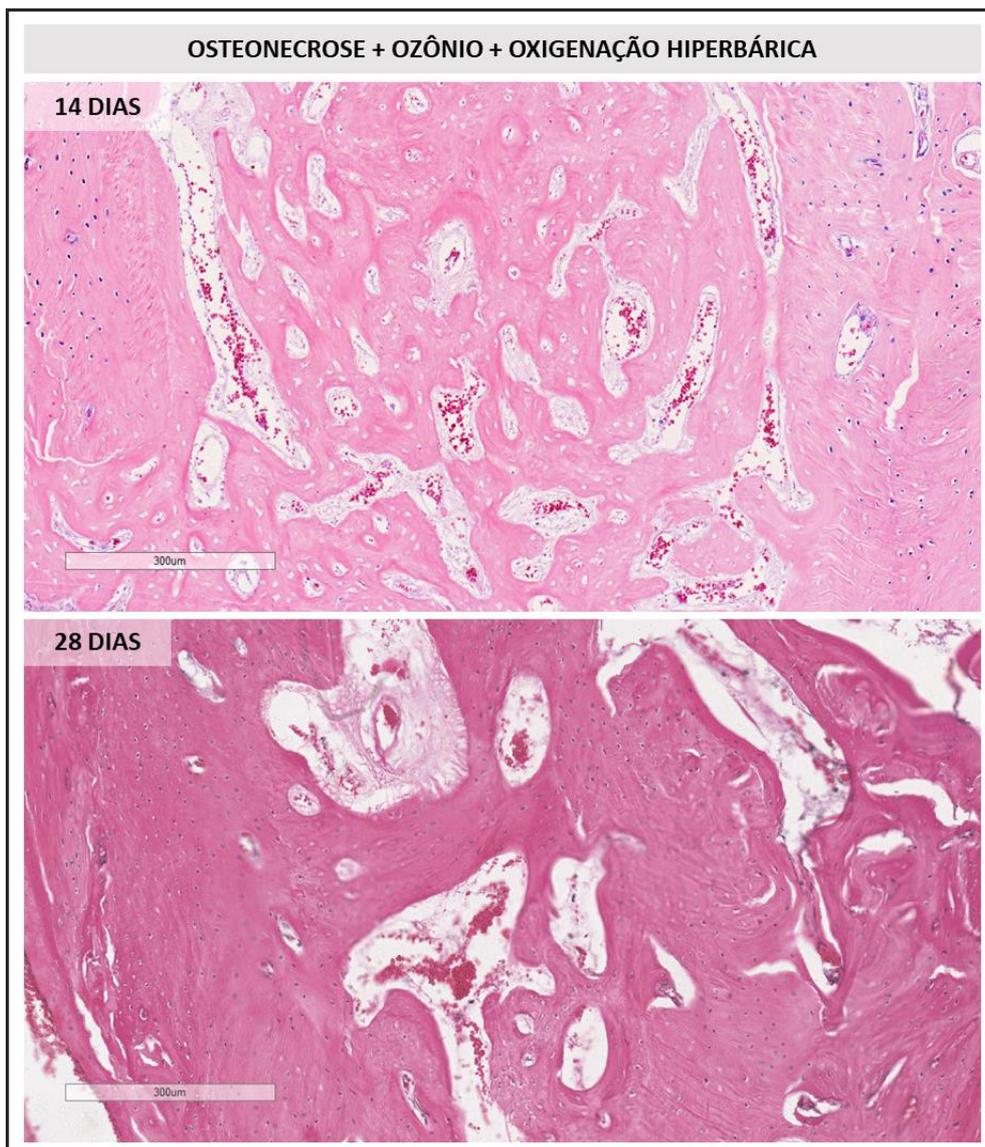


Figura 6: Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo Osteonecrose + Ozônio + Oxigenação Hiperbárica, nos períodos de 14 e 28 dias. HE.

6.3. Análise histomorfométrica

Não houve diferença significativa na neoformação óssea entre os grupos avaliados em 14 dias e 28 dias. Todos os grupos apresentaram um aumento da porcentagem de neoformação óssea quando comparado cada grupo ao longo do tempo, entretanto este aumento só foi significativo para os grupos Controle e Osteonecrose+OZ+OH (Tabela 3 e Figura 7).

Tabela 3- Valores de histomorfometria – neoformação óssea, entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias.

Grupos		14 dias	28 dias
Neoformação Óssea (%)	SEM OSTEONECROSE Controle Positivo	71,59±2,38 ^(A,a)	85,38±4,64 ^(A,b)
	OSTEONECROSE Controle Negativo	64,51±7,89 ^(A,a)	70,91±4,04 ^(A,a)
	OSTEONECROSE + OZ	57,91±5,28 ^(A,a)	65,18±3,30 ^(A,a)
	OSTEONECROSE + OH	68,99±5,23 ^(A,a)	81,94±4,02 ^(A,a)
	OSTEONECROSE + OZ + OH	65,57±8,99 ^(A,a)	82,66±1,47 ^(A,b)

Obs: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,05$); Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística intragrupo ao longo do tempo ($p < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

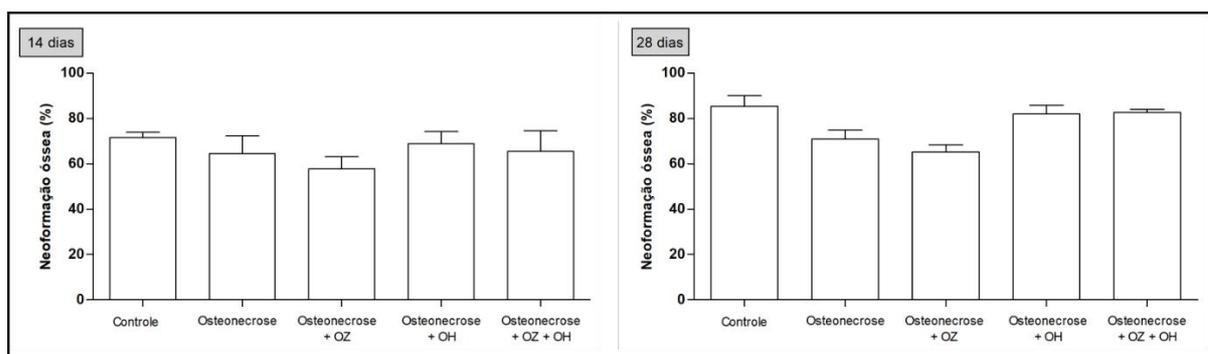


Figura 7: Gráficos representativos dos valores de histomorfometria - neoformação óssea entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias. (* $p < 0,05$)

Não houve diferença significativa na quantidade de vasos sanguíneos entre os grupos avaliados em 14 dias e 28 dias. Houve uma redução na quantidade de vasos sanguíneos ao longo do tempo nos grupos Osteonecrose+OZ, Osteonecrose+OH e Osteonecrose+OZ+OH, mas essa diferença foi significativa apenas para o grupo Osteonecrose+OZ. Os grupos Controle e Osteonecrose apresentaram um aumento

na quantidade de vasos sanguíneos ao longo do tempo, entretanto este aumento não foi significativo (Tabela 4 e Figura 8).

Tabela 4- Valores de histomorfometria – vasos sanguíneos, entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias.

Grupos		14 dias	28 dias
Vasos Sanguíneos (%)	SEM OSTEONECROSE Controle Positivo	8,12±1,31 ^(A,a)	10,36±2,93 ^(A,a)
	OSTEONECROSE Controle Negativo	8,56±2,68 ^(A,a)	10,98±0,34 ^(A,b)
	OSTEONECROSE + OZ	13,34±4,06 ^(A,a)	8,26±1,80 ^(A,b)
	OSTEONECROSE + OH	8,74±0,84 ^(A,a)	6,90±1,94 ^(A,a)
	OSTEONECROSE + OZ + OH	14,14±1,91 ^(A,a)	11,85±1,17 ^(A,a)

Obs: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos de tratamento ($p < 0,05$); Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística intragrupo ao longo do tempo ($p < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

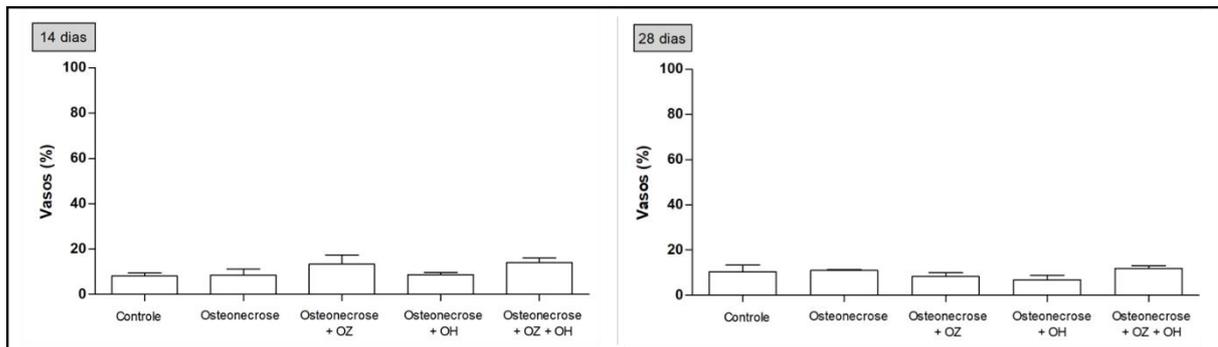


Figura 8: Gráficos representativos dos valores de histomorfometria – vasos sanguíneos entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias. (* $p < 0,05$)

7 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a administração do ácido zoledrônico gera alterações importantes no reparo ósseo alveolar de ratos. O ozônio e a oxigenação hiperbárica favoreceram o reparo ósseo nessas condições, especialmente em combinação, entretanto, eles não foram suficientes para reverter completamente os prejuízos causados pelo ácido zoledrônico.

Como muitos aspectos da etiopatogenia da MRONJ ainda não foram esclarecidos, os modelos animais são uma alternativa viável para o estudo da doença. A maioria dos modelos animais descritos na literatura que induziram clinicamente a MRONJ submeteram os animais ao uso do ácido zoledrônico e extração dentária (113) como utilizado em nosso estudo. Ainda assim há diferenças nos protocolos de indução de MRONJ, com diferenças entre os medicamentos, além de variações na dose e tempo de uso do ácido zoledrônico. Abtahi et al., (2012) mostrou lesões maiores de MRONJ após uso de 200 µg/kg do alendronato de sódio diariamente durante 2 semanas (114). Kikuri et al., (2010) por sua vez mostrou incidência de MRONJ em apenas 10% dos animais após uso de 125 µg/kg do ácido zoledrônico associado à dexametasona 2x por semana durante 2 semanas (115). Howie et al., (2015) mostrou MRONJ em 100% dos animais após uso de 80 µg/kg do ácido zoledrônico 1x por semana durante 13 semanas e múltiplas exodontias com uso de ostectomia (113).

De acordo com Howie et al., (2015) a indução consistente da manifestação de MRONJ requer extrações cirúrgicas repetidas ou trauma persistente. Segundo os autores, a extração dentária simples e/ou o uso de um único procedimento cirúrgico resulta em incidência variável e graus variáveis de lesões MRONJ que seriam inconsistentes entre os animais. Ainda assim, vale ressaltar que as primeiras alterações da MRONJ parecem surgir antes mesmo da exposição óssea clinicamente evidente da lesão (114). Possivelmente, os bisfosfonatos dificultam a reabsorção do osso já alterado pelo medicamento e, após trauma ou infecção persistentes a exposição óssea acontece (113). Portanto, o desenvolvimento da MRONJ seria resultado de uma alteração do turnover ósseo associada às características particulares dos ossos dos maxilares, como revestimento mucoso, risco frequente de infecção e potencial constante de trauma. Talvez estes sejam alguns dos fatores

pelos quais não tenhamos encontrado nenhum animal com sinais clínicos evidentes de MRONJ, mesmo na presença de osso de pior qualidade evidenciado nas avaliações histológicas e microtomográficas nos grupos que utilizaram o ácido zoledrônico. Esses resultados confirmam que a ausência de manifestação clínica da doença da MRONJ não exclui a existências de alterações no reparo ósseo alveolar após uso dessa medicação.

Os aspectos imaginológicos são muito importantes porque em pacientes nem sempre é possível avaliação diagnóstica da MRONJ por outros meios, como análise histopatológica. Entretanto, é importante ressaltar que apesar da microtomografia computadorizada fornecer uma reconstrução tridimensional interessante das estruturas analisadas, os diferentes tecidos são identificados e, posteriormente mensurados, apenas pela variação de densidade, sugerindo a formação óssea ou ausência dela (BV/TV, %), dentro de uma janela de densidade sugerida pelo software. Por isso, a experiência do operador é importante para obtenção de resultados mais precisos (111). Outras variáveis como número de trabéculas ósseas (Tb.N*, 1/mm), espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th*, μm) e espaçamento entre elas (Tb.Sp*, μm) quando postas juntas podem auxiliar na avaliação da qualidade tecidual sugerindo uma possibilidade de maior ou menor vascularização e, conseqüentemente, maior ou menor maturação da neoformação óssea. Por isso, o método de microtomografia é complementar, e sempre que possível deve ser correlacionado a outros métodos de análise.

Em nosso trabalho, a análise da microtomografia óssea mostra alterações na microestrutura óssea provocadas pelo ácido zoledrônico, especialmente no período de 14 dias pós-exodontia. Considerando que durante os períodos iniciais do reparo ósseo alveolar os eventos formativos são predominantes, é esperado encontrar alterações nesse período experimental. Na região do alvéolo pós-exodontia foi evidenciado material hiperdenso compatível com a formação de trabéculas de matriz óssea em todos os grupos, sendo em menor quantidade, com menor espessura e maior distanciamento entre elas no grupo Osteonecrose. Isso indica um possível atraso no processo de reparo ósseo alveolar em decorrência do uso do ácido zoledrônico, com persistência de tecido menos denso em 14 dias. Interessante acrescentar que o OZ e a OH resultaram em melhora dos parâmetros microtomográficos analisados em 14 dias, sendo que a OH otimizou principalmente

número de trabéculas e reduziu o distanciamento entre elas, enquanto o ozônio otimizou a espessura das trabéculas ósseas. É mais interessante ainda verificar que as terapias combinadas resultaram em melhora do volume ósseo como um todo. Isso nos leva a crer que, os eventos iniciais do reparo ósseo pós-exodontia são cruciais para o sucesso ao longo do tempo. Em 28 dias, todos os grupos apresentaram um aumento percentual de volume ósseo. Apesar da ausência de diferença estatística entre os grupos, observamos que a combinação das terapias manteve bons resultados, se aproximando dos valores encontrados no grupo Controle. Aparentemente, o uso de OZ e OH, principalmente em combinação, foi interessante para reduzir os malefícios do ácido zoledrônico.

Os resultados qualitativos da análise morfológica/histológica corroboram com os resultados observados na MicroCT. O grupo Controle apresentou reparo ósseo alveolar normal, com predominância de tecido ósseo primário com disposição não lamelar e a presença de osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. Após 28 dias, notamos uma maturação tecidual, caracterizada pela presença de trabéculas ósseas bem-organizadas e definidas, além de áreas de tecido ósseo secundário. No grupo Osteonecrose percebemos dificuldades no reparo ósseo, com comprometimento importante da qualidade da neoformação óssea, que mostrou aspecto quebradiço evidenciado por fissuras e uma estrutura óssea desorganizada. Ainda assim, em nosso estudo houve reparação satisfatória dos tecidos moles após exodontia, que foi o único procedimento cirúrgico realizado nos animais, o que pode ter contribuído para o controle da contaminação microbiana dos alvéolos, diminuindo as chances de exposição óssea característica da MRONJ. Ainda nesse sentido, análise morfológica/histológica também mostrou que o tratamento com OH, OZ ou a combinação de ambos, apesar de não terem revertido completamente os danos decorrentes do uso do ácido zoledrônico, resultaram em uma redução dos efeitos deletérios no reparo ósseo alveolar mencionados anteriormente.

Analisando os resultados obtidos pela análise histomorfométrica observamos que, em relação à neoformação óssea (%), os resultados foram bastante semelhantes entre os grupos avaliados em cada período experimental. No entanto, em comparação intra-grupo entre os períodos de 14 e 28 dias, apenas os grupos Controle e Osteonecrose+OZ+OH apresentaram um aumento significativo na porcentagem de osso neoformado. Esse aumento ao longo do tempo havia sido observado na

microCT, embora sem significância estatística como mencionado anteriormente. Isso sugere que a combinação desses tratamentos parece ter realmente melhorado não apenas a qualidade da neoformação óssea, mas também a quantidade ao longo do tempo. Apesar disso vale ressaltar a necessidade de cautela nesta interpretação visto que a mensuração da porcentagem de neoformação óssea na histomorfometria utilizou uma imagem representativa da região de neoformação óssea, e não a imagem completa do alvéolo dentário como na microCT, o que pode influenciar os resultados.

A presença de vasos sanguíneos é fundamental para o fornecimento de nutrientes e células osteogênicas, e a sua quantificação (% de área ocupada por vasos sanguíneos na ROI) pode ser um indicador de melhora do reparo tecidual. A análise histomorfométrica dos vasos sanguíneos, de modo geral, mostrou resultados semelhantes entre os grupos avaliados em cada período experimental. Observou-se também a redução na quantidade de vasos sanguíneos ao longo do tempo nos grupos Osteonecrose+OZ, Osteonecrose+OH e Osteonecrose+OZ+OH. Corroborando com a análise morfológica/histológica, o ozônio e a oxigenação hiperbárica parecem ter favorecido o reparo tecidual, especialmente nas fases iniciais da cicatrização, com aumento da angiogênese e possivelmente do tecido de granulação. Por isso observamos maior porcentagem de vasos sanguíneos nesses grupos em 14 dias. Em outras palavras, inicialmente, houve uma densidade aumentada de vasos sanguíneos nesses grupos, o que proporciona mais aporte de oxigênio e nutrientes para as células, otimizando a neoformação óssea nessa fase inicial. Isso foi essencial para reduzir os malefícios do uso de ácido zoledrônico ao reparo ósseo alveolar nesses grupos. No entanto, em 28 dias, em um estágio mais avançado de remodelação tecidual, a presença desses vasos e do tecido de granulação naturalmente diminuiu, dando lugar à matriz óssea neoformada.

É importante destacar que a metodologia empregada, incluindo a utilização de técnicas de análise de imagem avançadas juntamente com análise histológica confere robustez ao estudo. Apesar dos resultados promissores, há limitações que precisam ser mencionadas. Dentre elas pode ser citada a dificuldade na determinação da região de interesse para análise histomorfométrica visto que não há uma área específica indicada como ideal ou referência para a análise. Além disso, a mandíbula possui complexidade anatômica e não é fácil a seleção de áreas homogêneas representativas, embora evitássemos englobar regiões com variações morfológicas.

Outra limitação é a falta de análises moleculares como Imunohistoquímica, que permitiriam a avaliação do metabolismo tecidual e funcionamento das células envolvidas nesse processo.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a influência do ozônio e da oxigenação hiperbárica no reparo ósseo alveolar após uso de ácido zoledrônico em ratos, e demonstrou que, mesmo na ausência de MRONJ clinicamente evidente, a administração dessa medicação foi suficiente para induzir alterações importantes. Além disso, observamos o Ozônio e a Oxigenação hiperbárica favoreceram o reparo ósseo, especialmente em combinação, sendo capazes de reverter parcialmente os prejuízos causados pelo ácido zoledrônico no tecido ósseo.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw - 2014 update. Vol. 72, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. W.B. Saunders; 2014. p. 1938–56.
2. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic [1]. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2003 Sep 1;61(9):1115–7.
3. Rosella D, Papi P, Giardino R, Cicalini E, Piccoli L, Pompa G. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and practical guidelines. Vol. 6, *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*. Wolters Kluwer (UK) Ltd.; 2016. p. 97–104.
4. Fleisch H. Einführung in die Bisphosphonate. *Orthopade* [Internet]. 2007;36(2):103–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00132-006-1040-9>
5. Limones A, Sáez-Alcaide LM, Díaz-Parreño SA, Helm A, Bornstein MM, Molinero-Mourelle P. Medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) in cancer patients treated with denosumab VS. zoledronic acid: A systematic review and meta-analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020;e326–36.
6. Borah B, Ritman EL, Dufresne TE, Jorgensen SM, Liu S, Sacha J, et al. The effect of risedronate on bone mineralization as measured by micro-computed tomography with synchrotron radiation: Correlation to histomorphometric indices of turnover. *Bone*. 2005 Jul;37(1):1–9.
7. Bocci V, Zanardi I, Huijberts MSP, Travagli V. Diabetes and chronic oxidative stress. A perspective based on the possible usefulness of ozone therapy. Vol. 5, *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. 2011. p. 45–9.
8. Goker F, Grecchi E, Grecchi F, Francetti L, Del Fabbro M. Treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021 Mar;25(6):2662–73.
9. Govaerts D, Piccart F, Ockerman A, Coropciuc R, Politis C, Jacobs R. Adjuvant therapies for MRONJ: A systematic review. Vol. 141, *Bone*. Elsevier Inc.; 2020.
10. Ozone in nature.

11. Valacchi G, Fortino V, Bocci V. The dual action of ozone on the skin. Vol. 153, *British Journal of Dermatology*. 2005. p. 1096–100.
12. Sacco R, Leeson R, Nissan J, Olate S, de Castro CHBC, Acocella A, et al. A systematic review of oxygen therapy for the management of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ). Vol. 9, *Applied Sciences (Switzerland)*. MDPI AG; 2019.
13. CLM Cremers S, Pillai G, Papapoulos SE. Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Bisphosphonates Use for Optimisation of Intermittent Therapy for Osteoporosis. Vol. 44, *Clin Pharmacokinet*. 2005.
14. Cocquyt V, Kline WF, Gertz BJ, Van Belle SJP, Holland SD, DeSmet M, et al. Pharmacokinetics of intravenous alendronate. *J Clin Pharmacol*. 1999;39(4):385–93.
15. Russell RGG. Bisphosphonates: The first 40 years. Vol. 49, *Bone*. 2011. p. 2–19.
16. Ebetino FH, Hogan AML, Sun S, Tsoumpra MK, Duan X, Triffitt JT, et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. Vol. 49, *Bone*. 2011. p. 20–33.
17. Francis MD. The Inhibition of Calcium Hydroxyapatite Crystal Growth by Polyphosphonates and Polyphosphates. Vol. 3, *Calc. Tiss. Res*. 1969.
18. Fleisch H. Isolation from urine of pyrophosphate. / a calcification inhibitor?'" [Internet]. 1962. Available from: www.physiology.org/journal/ajplegacy
19. Bassett CALA, Donath F, Macagno R, Preisig H, Fleisch MDF. Letters to the Editor DIPHOSPHONATES IN THE TREATMENT OF MYOSITIS OSSIFICANS.
20. Johansen A, Stone M, Rawlinson F. Bisphosphonates and the Treatment of Bone Disease in the Elderly. Vol. 8, *DRUG THERAPY Drugs & Aging*. 1996.
21. Adami S, Mian M, Gatti P, Rossini M, Zamberlan N, Bertoldo F, et al. Effects of Two Oral Doses of Alendronate in the Treatment of Paget's Disease of Bone. Vol. 15. 1994.
22. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: A systematic review and international consensus. Vol. 30, *Journal of Bone and Mineral Research*. John Wiley and Sons Inc.; 2015. p. 3–23.

23. Srivastava A, Nogueras Gonzalez GM, Geng Y, Won AM, Cabanillas ME, Naing A, et al. Prevalence of medication related osteonecrosis of the jaw in patients treated with sequential antiresorptive drugs: systematic review and meta-analysis. Vol. 29, Supportive Care in Cancer. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 2305–17.
24. Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanisms of action. J Clin Invest. 1996 Jun 15;97(12):2692–6.
25. Lacy ME, Bevan JA, Boyce RW, Geddes AD. Calcified Tissue Clinical Investigations Antiresorptive Drugs and Trabecular Bone Turnover: Validation and Testing of a Computer Model. Vol. 54, Calcif Tissue Int. 1994.
26. Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. Vol. 6, Current Opinion in Pharmacology. 2006. p. 307–12.
27. Porras AG, Holland SD, Gertz BJ. Pharmacokinetics of alendronate. Clin Pharmacokinet. 1999 May;36(5):315–28.
28. Monkkonen J, Ylitalo P. The tissue distribution of clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) in mice. The effects of vehicle and the route of administration. EUROPEAN JOURNAL OF DRUG METABOUSM AND PHARMACOKINETICS. 1990.
29. Papapoulos SE. Bisphosphonates: how do they work? Vol. 22, Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism. 2008. p. 831–47.
30. Landman JO, Hamdy NAT, Pauwels EKJ, Papapoulos SE. Skeletal Metabolism in Patients with Osteoporosis after Discontinuation of Long Term Treatment with Oral Pamidronate*. Vol. 0, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Copyright. 1995.
31. Cremers S, Farooki A. Biochemical markers of bone turnover in osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis and advanced cancer involving the bone. Ann N Y Acad Sci. 2011;1218(1):80–7.
32. Khan SA, Vasikaran S, Mccloskey E V, Beni-ton MNC, Rogers S, Coulton L, et al. Alendronate in the Treatment of Paget's Disease of Bone. Vol. 20, Bone. 1997.

33. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest.* 1991 Dec;88(6):2095–105.
34. Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. Comparison of the Distribution of 3H-Alendronate and 3H-Etidronate in Rat and Mouse Bones. Vol. 19. *ELSEVIER Bone*; 1996.
35. Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ. Bisphosphonates Act on Rat Bone Resorption through the Mediation of Osteoblasts. Vol. 91, *Clin. Invest.* 1993.
36. Weinstein RS, Roberson PK, Manolagas SC. Giant Osteoclast Formation and Long-Term Oral Bisphosphonate Therapy. *New England Journal of Medicine.* 2009 Jan;360(1):53–62.
37. Burger EH, Boonekamp PM, Nijweide PJ. Osteoblast and osteoclast precursors in primary cultures of calvarial bone cells. *Anat Rec.* 1986 Jan;214(1):32–40.
38. Musto P. The role of bisphosphonates for the treatment of bone disease in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 1998;31(5–6):453–62.
39. Farrell KB, Karpeisky A, Thamm DH, Zinnen S. Bisphosphonate conjugation for bone specific drug targeting. Vol. 9, *Bone Reports.* Elsevier Inc; 2018. p. 47–60.
40. Hasegawa T, Hayashida S, Kondo E, Takeda Y, Miyamoto H, Kawaoka Y, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in cancer patients: a multicenter retrospective study. *Osteoporosis International.* 2019 Jan 18;30(1):231–9.
41. Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology.* 2011 Mar 20;29(9):1125–32.
42. Vos T, Abajobir AA, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet [Internet].* 2017 Sep;390(10100):1211–59. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617321542>

43. Coleman RE, McCloskey E V. Bisphosphonates in oncology. Vol. 49, Bone. 2011. p. 71–6.
44. McGowan K, McGowan T, Ivanovski S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: A systematic review. Vol. 24, Oral Diseases. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 527–36.
45. Lombard T, Neirinckx V, Rogister B, Gilon Y, Wislet S. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: New Insights into Molecular Mechanisms and Cellular Therapeutic Approaches. Vol. 2016, Stem Cells International. Hindawi Limited; 2016.
46. Fliefel R, Tröltzsch M, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: A systematic review. Vol. 44, International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. Churchill Livingstone; 2015. p. 568–85.
47. Soutome S, Hayashida S, Funahara M, Sakamoto Y, Kojima Y, Yanamoto S, et al. Factors affecting development of medication-related osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving high-dose bisphosphonate or denosumab therapy: Is tooth extraction a risk factor? PLoS One. 2018 Jul 1;13(7).
48. Soundia A, Hadaya D, Esfandi N, de Molon RS, Bezouglaia O, Dry SM, et al. Osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice after extraction of teeth with periradicular disease. Bone. 2016 Sep 1;90:133–41.
49. Kajizono M, Sada H, Sugiura Y, Soga Y, Kitamura Y, Matsuoka J, et al. Incidence and Risk Factors of Osteonecrosis of the Jaw in Advanced Cancer Patients after Treatment with Zoledronic Acid or Denosumab: A Retrospective Cohort Study. Vol. 38, Biol. Pharm. Bull. 1850.
50. Valente NA, Chatelain S, Alfonsi F, Mortellaro C, Barone A. Medication-related osteonecrosis of the jaw: The use of leukocyte-platelet-rich fibrin as an adjunct in the treatment. Journal of Craniofacial Surgery. 2019;30(4):1095–101.
51. Kazancioglu HO, Ezirganli S, Aydin MS. Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. Journal of Craniofacial Surgery. 2013 Nov;24(6):2141–6.
52. Harlan NP, Ptak JA, Rees JR, Cowan DR, Fellows AM, Kertis JA, et al. Development of an International, Multicenter, Hyperbaric Oxygen Treatment

- Registry and Research Consortium: Protocol for Outcome Data Collection and Analysis. *JMIR Res Protoc*. 2020 Aug 17;9(8):e18857.
53. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. Vol. 106, *Journal of Applied Physiology*. 2009. p. 988–95.
 54. Thom SR. Hyperbaric oxygen: Its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Jan;127(SUPPL. 1 S).
 55. John Kirby by P, Snyder J, Schuerer DJ, Peters JS, Bochicchio G V, Kirby Md JP, et al. *Essentials of Hyperbaric Oxygen Therapy: 2019 Review*.
 56. Ohguri T, Imada H, Narisada H, Yahara K, Morioka T, Nakano K, et al. Systemic chemotherapy using paclitaxel and carboplatin plus regional hyperthermia and hyperbaric oxygen treatment for non-small cell lung cancer with multiple pulmonary metastases: Preliminary results. *International Journal of Hyperthermia*. 2009;25(2):160–7.
 57. Zhao D, Luo S, Xu W, Hu J, Lin S, Wang N. Efficacy and Safety of Hyperbaric Oxygen Therapy Used in Patients With Diabetic Foot: A Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. Vol. 39, *Clinical Therapeutics*. Excerpta Medica Inc.; 2017. p. 2088-2094.e2.
 58. Verghese G, Verma R, Bhutani S. Hyperbaric oxygen therapy in the battlefield. Vol. 69, *Medical Journal Armed Forces India*. *Medical Journal Armed Forces India*; 2013. p. 94–6.
 59. Lin SS, Ueng SW, Niu CC, Yuan LJ, Yang CY, Chen WJ, et al. Effects of hyperbaric oxygen on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014 Feb 25;15(1).
 60. Edwards ML. Hyperbaric oxygen therapy. Part 1: History and principles. Vol. 20, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2010. p. 284–8.
 61. Edwards ML. Hyperbaric oxygen therapy. Part 2: Application in disease. Vol. 20, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2010. p. 289–97.
 62. Sureda A, Batle JM, Martorell M, Capó X, Tejada S, Tur JA, et al. Antioxidant response of chronic wounds to hyperbaric oxygen therapy. *PLoS One*. 2016 Sep 1;11(9).
 63. Kadam S, Shai S, Shahane A, Kaushik KS. Recent advances in non-conventional antimicrobial approaches for chronic wound biofilms: Have we found the “chink in the armor”? Vol. 7, *Biomedicines*. MDPI AG; 2019.

64. Ortega MA, Fraile-Martinez O, García-Montero C, Callejón-Peláez E, Sáez MA, Álvarez-Mon MA, et al. A general overview on the hyperbaric oxygen therapy: Applications, mechanisms and translational opportunities. Vol. 57, *Medicina (Lithuania)*. MDPI; 2021.
65. Boykin J V., Baylis C. Hyperbaric oxygen therapy mediates increased nitric oxide production associated with wound healing: a preliminary study. *Adv Skin Wound Care*. 2007 Jul;20(7):382–8.
66. Marx RE, Ehler WJ, Tayapongsak P, Pierce LW. Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue. *Am J Surg*. 1990 Nov;160(5):519–24.
67. Peña-Villalobos I, Casanova-Maldonado I, Lois P, Prieto C, Pizarro C, Lattus J, et al. Hyperbaric oxygen increases stem cell proliferation, angiogenesis and wound-healing ability of WJ-MSCs in diabetic mice. *Front Physiol*. 2018;9.
68. Memar MY, Yekani M, Alizadeh N, Baghi HB. Hyperbaric oxygen therapy: Antimicrobial mechanisms and clinical application for infections. Vol. 109, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2019. p. 440–7.
69. Sanford NE, Wilkinson JE, Nguyen H, Diaz G, Wolcott R. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy in bacterial biofilm eradication. *J Wound Care*. 2018 Jan 1;27(Sup1):S20–8.
70. Gibson A, Davis FM. Hyperbaric oxygen therapy in the management of *Clostridium perfringens* infections. *N Z Med J*. 1986 Aug 27;99(808):617–20.
71. Brenner I, Shephard RJ, Shek PN. Immune function in hyperbaric environments, diving, and decompression. *Undersea Hyperb Med*. 1999;26(1):27–39.
72. Harnanik T, Soeroso J, Suryokusumo MG, Juliandhy T. Effects of hyperbaric oxygen on t helper 17/regulatory t polarization in antigen and collagen-induced arthritis: Hypoxia-inducible factor-1 α as a target. *Oman Med J*. 2020 Jan 1;35(1).
73. Xu X, Yi H, Kato M, Suzuki H, Kobayashi S, Takahashi H, et al. Differential sensitivities to hyperbaric oxygen of lymphocyte subpopulations of normal and autoimmune mice. *Immunol Lett*. 1997 Nov;59(2):79–84.
74. Chen SY, Chen YC, Wang JK, Hsu HP, Ho PS, Chen YC, et al. Early hyperbaric oxygen therapy attenuates disease severity in lupus-prone autoimmune (NZB x NZW) F1 mice. *Clin Immunol*. 2003 Aug;108(2):103–10.

75. Calvert JW, Cahill J, Zhang JH. Hyperbaric oxygen and cerebral physiology. *Neurol Res.* 2007 Mar 19;29(2):132–41.
76. Camporesi EM, Bosco G. Mechanisms of action of hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med.* 2014;41(3):247–52.
77. Godman CA, Joshi R, Giardina C, Perdrizet G, Hightower LE. Hyperbaric oxygen treatment induces antioxidant gene expression. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* Blackwell Publishing Inc.; 2010. p. 178–83.
78. Gao J, Liu S, Xu F, Liu Y, Lv C, Deng Y, et al. Trilobatin Protects Against Oxidative Injury in Neuronal PC12 Cells Through Regulating Mitochondrial ROS Homeostasis Mediated by AMPK/Nrf2/Sirt3 Signaling Pathway. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jul 30;11.
79. Baldim LB, Nejo R, Souza MEJ, Gomes MCJ, Picinato MANC, Fina CF, et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on liver function during intermittent ischemia. *Acta Cir Bras.* 2013;28 Suppl 1:61–5.
80. Kamat SM, Mendelsohn AR, Larrick JW. Rejuvenation Through Oxygen, More or Less. *Rejuvenation Res.* 2021 Apr;24(2):158–63.
81. Hadanny A, Efrati S. The Hyperoxic-Hypoxic Paradox. *Biomolecules.* 2020 Jun 25;10(6).
82. Brouwer RJ, Lalieu RC, Hoencamp R, van Hulst RA, Ubbink DT. A systematic review and meta-analysis of hyperbaric oxygen therapy for diabetic foot ulcers with arterial insufficiency. Vol. 71, *Journal of Vascular Surgery.* Mosby Inc.; 2020. p. 682-692.e1.
83. Schottlender N, Gottfried I, Ashery U. Hyperbaric oxygen treatment: Effects on mitochondrial function and oxidative stress. Vol. 11, *Biomolecules.* MDPI; 2021.
84. Hachmo Y, Hadanny A, Abu Hamed R, Daniel-Kotovsky M, Catalogna M, Fishlev G, et al. Hyperbaric oxygen therapy increases telomere length and decreases immunosenescence in isolated blood cells: a prospective trial. *Aging.* 2020 Nov 18;12(22):22445–56.
85. Nishizaka T, Nomura T, Higuchi K, Takemura A, Ishihara A. Mild hyperbaric oxygen activates the proliferation of epidermal basal cells in aged mice. *Journal of Dermatology.* 2018 Sep 1;45(9):1141–4.

86. Bellato E, Marini E, Castoldi F, Barbasetti N, Mattei L, Bonasia DE, et al. Fibromyalgia syndrome: Etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. Vol. 2012, Pain Research and Treatment. 2012.
87. Bocci V. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1996;10(2–3):31–53.
88. Hernandez F, Mebrndez S, Wong R. 0891-5849(94)00201-0 DECREASE OF BLOOD CHOLESTEROL AND STIMULATION OF ANTIOXIDATIVE RESPONSE IN CARDIOPATHY PATIENTS TREATED WITH ENDOVENOUS OZONE THERAPY. Vol. 19, *Radical Biology & Medicine*. 1995.
89. Csonka C, Pataki T, Kovacs P, M“ullerm“uller SL, Schroeter ML, Tosaki A, et al. Original Contribution EFFECTS OF OXIDATIVE STRESS ON THE EXPRESSION OF ANTIOXIDATIVE DEFENSE ENZYMES IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RAT HEARTS. 2000.
90. Freiburger JJ, Padilla-Burgos R, McGraw T, Suliman HB, Kraft KH, Stolp BW, et al. What is the role of hyperbaric oxygen in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: A randomized controlled trial of hyperbaric oxygen as an adjunct to surgery and antibiotics. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012 Jul;70(7):1573–83.
91. Ripamonti CI, Maniezzo M, Pessi MA, Boldini S. Treatment of osteonecrosis of the jaw (ONJ) by medical ozone gas insufflation. A case report. *Tumori*. 2012;98(3):72e–5e.
92. Pleiner-Duxneuner J, Zwettler E, Paschalis E, Roschger P, Nell-Duxneuner V, Klaushofer K. Treatment of osteoporosis with parathyroid hormone and teriparatide. Vol. 84, *Calcified Tissue International*. Springer New York; 2009. p. 159–70.
93. Re K, Gandhi J, Liang R, Patel S, Joshi G, Smith NL, et al. Clinical utility of ozone therapy and hyperbaric oxygen therapy in degenerative disc disease. *Med Gas Res*. 2023;13(1):1–6.
94. Cardoso MG, de Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2008 Mar;105(3).

95. Hidalgo-Tallón FJ, Torres-Morera LM, Baeza-Noci J, Carrillo-Izquierdo MD, Pinto-Bonilla R. Updated Review on Ozone Therapy in Pain Medicine. Vol. 13, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
96. Alfaro MF, Walby WF, Adams WC, Schelegle ES. Breath condensate levels of 8-isoprostane and leukotriene B4 after ozone inhalation are greater in sensitive versus nonsensitive subjects. *Exp Lung Res*. 2007 Apr;33(3–4):115–33.
97. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol*. 2005 Oct 31;523(1–3):151–61.
98. El Meligy OA, Elemam NM, Talaat IM. Ozone Therapy in Medicine and Dentistry: A Review of the Literature. Vol. 11, *Dentistry Journal*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
99. Fuccio C, Luongo C, Capodanno P, Giordano C, Scafuro MA, Siniscalco D, et al. A single subcutaneous injection of ozone prevents allodynia and decreases the over-expression of pro-inflammatory caspases in the orbito-frontal cortex of neuropathic mice. *Eur J Pharmacol*. 2009 Jan 28;603(1–3):42–9.
100. Ahmed LA, Salem HA, Mawsouf MN, Attia AS, Agha AM. Cardioprotective effects of ozone oxidative preconditioning in an in vivo model of ischemia/reperfusion injury in rats. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012 Sep 6;72(5):345–54.
101. Dobkin VG, Sadovnikova SS, Kuz'min GP, Bondarev GB. [Local ozone therapy in the complex surgical treatment of pulmonary and pleural tuberculosis patients]. *Probl Tuberk*. 2001;(7):18–20.
102. Galluccio F. Rapid and Sustained Effect of Ozone Major Autohemotherapy for Raynaud and Hand Edema in Systemic Sclerosis Patient: A Case Report. *Cureus*. 2022 Nov 23;
103. Takahashi H, Fujimoto C, Matsui H, Igarashi T, Shiwa T, Ohara K, et al. Anterior chamber irrigation with an ozonated solution as prophylaxis against infectious endophthalmitis. *J Cataract Refract Surg*. 2004 Aug;30(8):1773–80.
104. Holmes J. Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontology*. 2003 Dec;20(2):106–14.
105. Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine. *Prim Dent Care*. 2005 Apr;12(2):47–52.

106. Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine. Part 2. Ozone and root caries. *Prim Dent Care*. 2006 Jan;13(1):37–41.
107. V Seidler ILHHHSRSJM. Ozone and its usage in general medicine and dentistry. A review article. *Prague Med Rep*. 2008;109:5–13.
108. Agrillo A, Nastro Siniscalchi E, Facchini A, Filiaci F, Ungari C. Osteonecrosis of the jaws in patients assuming bisphosphonates and sunitinib: two case reports. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012 Jul;16(7):952–7.
109. Agrillo A, Petrucci MT, Tedaldi M, Mustazza MC, Marino SMF, Gallucci C, et al. New therapeutic protocol in the treatment of avascular necrosis of the jaws. *J Craniofac Surg*. 2006 Nov;17(6):1080–3.
110. Petrucci MT, Gallucci C, Agrillo A, Mustazza MC, Foà R. Role of ozone therapy in the treatment of osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2007 Sep;92(9):1289–90.
111. Irie MS, Spin-Neto R, Teixeira LHS, Rabelo GD, De Araújo Reis NT, Soares PBF. Effect of micro-CT acquisition parameters and individual analysis on the assessment of bone repair. *Braz Oral Res*. 2023;37.
112. Irie MS, Rabelo GD, Spin-Neto R, Dechichi P, Borges JS, Soares PBF. Use of Micro-Computed Tomography for Bone Evaluation in Dentistry. *Braz Dent J*. 2018;29(3):227–38.
113. Howie RN, Borke JL, Kurago Z, Daoudi A, Cray J, Zakhary IE, et al. A Model for Osteonecrosis of the Jaw with Zoledronate Treatment following Repeated Major Trauma. *PLoS One*. 2015 Jul 17;10(7).
114. Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, Aspenberg P. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2012 Jul;41(6):494–9.
115. Kikuri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, et al. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010 Jul;25(7):1668–79.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 131/17 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 036/17

Projeto Pesquisa: "Efeitos de diferentes terapias no controle da osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos".

Pesquisador Responsável: Flaviana Soares Rocha

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: A CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 20 de julho de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU
Portaria nº 665/17