



Universidade de Brasília

Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Departamento de Odontologia

Ana Luísa Nunes Cantuário

**Efeito da oxigenação hiperbárica e do ozônio no reparo ósseo após uso de bisfosfonatos –
Análise histomorfométrica**

Brasília

2024

Ana Luísa Nunes Cantuário

**Efeito da oxigenação hiperbárica e do ozônio no reparo ósseo após uso de bisfosfonatos –
Análise histomorfométrica**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial
para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Flaviana Soares Rocha

Brasília

2024

Ana Luísa Nunes Cantuário

**Efeito da oxigenação hiperbárica e do ozônio no reparo ósseo após uso de bisfosfonatos –
Análise histomorfométrica**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia, Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em: 19 de novembro de 2024.

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Flaviana Soares Rocha (Orientadora)

Prof. Dr. Sérgio Bruzadelli Macedo

Dra. Soraya da Silva Oliveira

Aos meus maiores mestres: à minha família e às pessoas com câncer.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por todas as graças alcançadas.

À minha família, pelo apoio incondicional, que me conduz da forma mais sublime e amorosa, e que me torna capaz de desafiar o que parece impossível. Em especial, aos meus pais Francisco e Maria, à minha irmã Juliana e ao meu irmão David, por celebrarem as minhas alegrias e abraçarem as minhas fragilidades.

À exímia professora Flaviana Rocha, a quem admiro pela sua humanidade, simplicidade e dedicação e por abraçar a docência, exercendo-a com maestria. Foi uma honra tê-la como minha orientadora, agradeço imensamente pelas oportunidades e pela confiança, por me guiar fielmente nesta longa e árdua jornada na Cirurgia Bucomaxilofacial, com paciência, comprometimento e cumplicidade, e por ter contribuído para o meu desenvolvimento pessoal, intelectual e profissional.

Ao professor Sérgio Bruzadelli, por sua generosidade e leveza, sua vivacidade e alegria contagiantes são uma fonte constante de inspiração. Expresso minha profunda gratidão por ter me recebido no projeto de Ozonioterapia de forma tão gentil, sob seu olhar cuidadoso e acolhedor, pelos momentos de descontração e compartilhamento de experiências e conhecimentos.

À Dra. Maria Maiolini, o seu coração enorme e caloroso faz com que qualquer ambiente se torne mais acolhedor. Cada tarde no projeto de Ozonioterapia ao seu lado foi um presente repleto de carinho, afeto e bondade. Agradeço por todo profissionalismo e pela sabedoria transmitida.

À amada professora Aline Úrsula, sempre tão doce, por seu entusiasmo pela Odontologia e pela vida, por todo cuidado e carinho ao longo desses anos de graduação e pelos incontáveis e acolhedores abraços nos corredores da clínica, que sempre trouxeram paz e conforto. O seu amor pela educação, pelos alunos e pacientes, é memorável.

À Dra. Soraya Oliveria, uma pessoa encantadora e com uma expertise inestimável. A sua verdadeira grandeza reside no impacto positivo que causa na vida daqueles que estão ao seu redor. Ser inspirada pela Soraya é um privilégio, que preenche a minha caminhada com significado e gratidão. Como disse Érico Veríssimo: “A inteligência é o farol que nos guia, mas

é a vontade que nos faz caminhar”. Com todo meu carinho e admiração, sou imensamente grata por tê-la conhecido, muito obrigada pelas palavras afetuosas e de incentivo.

À professora Érica Negrini, sua presença acalma, encoraja e traz harmonia. A sua alma brilha! Muito obrigada por ser a minha luz guia nos meus dias mais turbulentos, obrigada por cada momento compartilhado, por cada gesto, por cada palavra proferida, e por me mostrar novas perspectivas e possibilidades. Sou profundamente grata a você e ao seu marido Eduardo, por me acolherem como filha, e por terem me dado suporte e coragem.

Às professoras Ana Luiza Magalhães, Eliana Nakagawa e ao professor Newton Chagas, meu eterno agradecimento por tantos momentos de aprendizado, pelas valiosas reflexões e discussões que ultrapassaram os limites acadêmicos.

Às minhas queridas amigas de infância Lana e Joyce e ao meu amigo Antônio, que partilham a vida comigo há 14 anos. À minha segunda família, Amanda, Simone e Wanda, por todas as orações, conversas e amparo. À minha amiga Ada, por sua escuta sensível, pelo incansável incentivo, pelas palavras de carinho e compreensão. Às minhas amigas de curso Isabelle, Marta, Priscila, Sarah, Mariana, e Lorrane, e ao meu amigo Gustavo, agradeço a presença constante e por compartilharem comigo as alegrias e desafios desta jornada.

A todos os colaboradores da Unidade de Saúde Bucal do Hospital Universitário de Brasília (USB-HUB) que tornam possível realizar um atendimento humanizado e de qualidade, especialmente à Tereza, à Maria Vitória e ao Ronaldo.

*“Precisamos aceitar a nossa existência em todo o seu alcance;
tudo, mesmo o inaudito, tem de ser possível nela. No fundo, esta
é a única coragem que se exige de nós: sermos corajosos diante
do que é estranho, maravilhoso e inexplicável
entre tudo o que nos deparamos.”*

Rainer Maria Rilke

RESUMO

CANTUÁRIO, ALN. Efeito da oxigenação hiperbárica e do ozônio no reparo ósseo após uso de bisfosfonatos – Análise histomorfométrica. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

A osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de medicamentos, *Medication Related Osteonecrosis of the jaw* (MRONJ), caracteriza-se como um dos eventos adversos mais graves após uso de terapias antirreabsortivas, e que tem sido fortemente associada à utilização prolongada de bisfosfonatos nitrogenados administrados por via endovenosa, especialmente o ácido zoledrônico. Nessa perspectiva, apesar da relevância desta complicação, a prática clínica carece de recomendações baseadas em evidências sobre o uso de terapias adjuvantes, como a oxigenação hiperbárica (OH) e o ozônio (OZ), que podem reduzir a possibilidade de ocorrência da MRONJ. Este estudo teve como objetivo, avaliar, em modelo experimental em ratos, por meio de parâmetros histológicos, histomorfométricos e microtomografia computadorizada, as alterações do osso previamente submetido ao uso de bisfosfonatos, e tratado com oxigenação hiperbárica e/ou ozônio. Trata-se de um estudo experimental *in vivo* randomizado. 54 ratos machos da linhagem Wistar foram distribuídos aleatoriamente em grupos: Controle, Osteonecrose, Osteonecrose+OZ, Osteonecrose+OH e Osteonecrose+OZ+OH. A osteonecrose foi induzida por injeção intraperitoneal de ácido zoledrônico 66 µg/Kg, três vezes por semana, durante três semanas, seguida de exodontia de um molar inferior, bilateralmente. Os ratos foram então submetidos a tratamento com OH e/ou OZ e eutanasiados após 14 ou 28 dias após início das terapias. Análises histológicas, histomorfométricas e de microtomografia computadorizada foram realizadas para avaliar o reparo ósseo. Os testes Kolmogorov-Smirnov e Kruskal-Wallis com correção de Dunns foram aplicados ($p < 0,05$). A administração de ácido zoledrônico causou mudanças significativas no reparo ósseo alveolar, mesmo na ausência de osteonecrose clinicamente evidente. No grupo de Osteonecrose, foram observadas áreas de tecido conjuntivo e tecido ósseo primário pouco celularizado, com morfologia "desorganizada e corroída", frequentemente com fissuras e superfície irregular. Essas alterações foram mais pronunciadas aos 14 dias após a extração dentária, um período crítico no processo de reparo ósseo. Os tratamentos com OH e OZ isoladamente ou em combinação demonstraram benefícios no reparo ósseo, com morfologia menos desorganizada em comparação com o grupo de Osteonecrose sem tratamento. A combinação das duas terapias resultou em melhorias no volume ósseo total, mantendo resultados próximos ao grupo controle. Este estudo evidenciou que o ozônio e a oxigenação hiperbárica podem otimizar a neoformação óssea, especialmente em relação ao aumento do volume ósseo, revertendo parcialmente os danos causados pelo ácido zoledrônico.

Palavras-chave: Bisfosfonatos, Osteonecrose, Oxigenação hiperbárica, Ozônio.

ABSTRACT

CANTUÁRIO, ALN. Effect of hyperbaric oxygenation and ozone on bone repair after the use of bisphosphonates – Histomorphometric analysis. 2024. Course Completion Work (Graduation in Dentistry) – Department of Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasília.

Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ) is characterized as one of the most severe adverse events following the use of antiresorptive therapies. It has been strongly associated with the prolonged use of nitrogen-containing bisphosphonates administered intravenously, especially zoledronic acid. From this perspective, despite the relevance of this complication, clinical practice lacks evidence-based recommendations on the use of adjunct therapies, such as hyperbaric oxygen (HBO) and ozone (OZ), which may reduce the likelihood of MRONJ occurrence. This study evaluated bone changes in an experimental rat model, previously subjected to bisphosphonate use and treated with hyperbaric oxygen and/or ozone, through histological, histomorphometric parameters, and micro-computed tomography. This is a randomized in vivo experimental study. Fifty-four male Wistar rats were randomly distributed into groups: Control, Osteonecrosis, Osteonecrosis+OZ, Osteonecrosis+HBO, and Osteonecrosis+OZ+HBO. Osteonecrosis was induced by intraperitoneal injection of zoledronic acid 66 µg/Kg, three times a week for three weeks, followed by extraction of a lower molar, bilaterally. The rats were then subjected to treatment with HBO and/or OZ and euthanized 14 or 28 days after the start of therapies. Histological, histomorphometric, and micro-computed tomography analyses were performed to evaluate bone repair. Kolmogorov-Smirnov and Kruskal-Wallis tests with Dunn's correction were applied ($p < 0.05$). The administration of zoledronic acid caused significant changes in alveolar bone repair, even in the absence of clinically evident osteonecrosis. In the Osteonecrosis group, areas of connective tissue and poorly cellularized primary bone tissue with "disorganized and corroded" morphology, often with fissures and irregular surfaces, were observed. These changes were more pronounced 14 days after tooth extraction, a critical period in the bone repair process. Treatments with HBO and OZ, either alone or in combination, demonstrated benefits in bone repair, with less disorganized morphology compared to the untreated Osteonecrosis group. The combination of the two therapies resulted in improvements in total bone volume, achieving results similar to those observed in the control group. This study demonstrated that ozone and hyperbaric oxygenation could optimize bone neoformation, particularly regarding increased bone volume, partially reversing the damage caused by zoledronic acid.

Keywords: Bisphosphonates, Osteonecrosis, Hyperbaric oxygenation, Ozone.

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: Imagens histológicas dos intervalos de 14 e 28 dias nos grupos Controle; Osteonecrose; Osteonecrose + Oxigenação Hiperbárica; Osteonecrose + Ozônio; Osteonecrose + Ozônio + Oxigenação Hiperbárica.

Figura 3: Gráficos representativos dos valores de histomorfometria - neoformação óssea 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.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATA – Atmosfera Absoluta

BF – Bisfosfonato

BV/TV – Volume ósseo/Volume total

CONCEA – Comissão de Ética na Utilização de Animais

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetraacético

HE – Hematoxilina e Eosina

MicroCT – Microtomografia Computadorizada

MRONJ – Medication Related Osteonecrosis of the jaw

OH – Oxigenação Hiperbárica

OZ – Ozônio

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PPi – Pirofosfato Inorgânico

ROI – Região de Interesse

Tb.N* – Número de Trabéculas Ósseas

Tb.Sp* – Espaçamento entre as Trabéculas Ósseas

Tb.Th* – Espessura das Trabéculas Ósseas

TGF- β – Fator de Crescimento Transformador Beta

TM – Tricômio de Mallory

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAIS E MÉTODO	25
2.1 Delineamento	25
2.2 Aspectos éticos	25
2.3 Caracterização da amostra.....	25
2.4 Indução da osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos	25
2.5 Oxigenação hiperbárica.....	26
2.6 Ozônio	26
2.7 Obtenção das amostras e análises.....	26
2.7.1 Análise microtomográfica computadorizada.....	27
2.7.2 Análise histológica	27
2.7.3 Análise histomorfométrica	27
2.7.4 Análise estatística.....	28
3. RESULTADOS	28
3.1 Análise microtomográfica	28
3.2 Análise histológica	30
3.3 Análise histomorfométrica (neoformação óssea)	33
4. DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BFs) são análogos sintéticos do pirofosfato inorgânico (PPi), um composto que apresenta dois grupos fosfatos ligados por esterificação (1). O oxigênio é substituído por um átomo de carbono não hidrolisável (P-C-P) com dois grupos adicionais, denominados R1 e R2 (1, 2). O grupo hidroxila R1 estabelece a afinidade dos bisfosfonatos aos cristais de hidroxiapatita, assim a interação entre os grupos fosfato e hidroxila permitem que os bisfosfonatos apresentem uma notável especificidade ao tecido ósseo mineralizado (3). Por sua vez, o grupo R2, podendo ser nitrogênio (N2) ou amina (NH3), é o principal determinante da potência do fármaco e da inibição da reabsorção óssea mediada por osteoclastos (1, 2).

Estes medicamentos são utilizados para o manejo clínico de condições relacionadas ao câncer, como hipercalcemia maligna e lesões osteolíticas metastáticas associadas a tumores sólidos, como cânceres de mama, próstata e pulmão, e mieloma múltiplo (4). Entretanto, estão fortemente associados a eventos adversos graves, dentre os quais a osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de medicamentos, *Medication Related Osteonecrosis of the jaw* (MRONJ) (1).

A MRONJ, caracteriza-se como exposição óssea na região maxilofacial, que não cicatriza em um período de oito semanas, em pacientes submetidos ao uso de medicamentos como antirreabsortivos ou agentes antiangiogênicos, e que não apresentam histórico de radioterapia de cabeça e pescoço (1). A prevalência da MRONJ é variável, em que está relacionada ao medicamento, indicação terapêutica, dose e duração do tratamento (5). Em ensaios clínicos randomizados e em metanálises, a frequência da osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de medicamentos em pacientes com câncer, expostos ao ácido zoledrônico intravenoso, variou entre 0,3% a 5% (6, 7, 8, 9). As lesões de MRONJ ocorrem mais comumente na mandíbula em relação à maxila, além disso são mais prevalentes em áreas de mucosa fina sobre proeminências ósseas e crista milo-hióidea (10).

Embora os bisfosfonatos apresentem especificidade ao tecido ósseo mineralizado, a toxicidade aos tecidos moles foi relatada (4). Em um estudo *in vitro*, observou-se que o BF induz a apoptose de fibroblastos gengivais e queratinócitos humanos, por meio da ativação da expressão gênica de múltiplos genes envolvidos na morte celular programada, incluindo famílias TNF, BCL-2, CASPASE, IAP, TRAF e DEATH DOMAIN (11). Estudos clínicos demonstraram que, em pacientes com MRONJ, há o comprometimento de tecidos moles da cavidade oral e que a reparação pós exodontia em pacientes expostos a BFs orais e intravenosos foi significativamente mais longa em relação ao grupo controle (12, 13).

A MRONJ afeta negativamente a qualidade de vida, produzindo morbidade significativa (2). Dada a gravidade e a complexidade da osteonecrose, os principais objetivos do tratamento são reduzir a dor, controlar infecções secundárias e retardar a progressão da doença (14).

As diretrizes da *American Cancer Society* indicam desde protocolos clínicos conservadores às estratégias cirúrgicas para o manejo de lesões de MRONJ (2). Apesar de encontrarmos diversas pesquisas sobre essa condição potencialmente debilitante, os mecanismos de ação dos tratamentos ainda não são totalmente compreendidos (15). As terapias adjuvantes, entre elas a oxigenação hiperbárica e a ozonioterapia, emergem como abordagens promissoras para o manejo da MRONJ.

A oxigenação hiperbárica (OH) envolve a inalação de oxigênio a 100% sob uma pressão superior a 1 atmosfera (atm), o que eleva o gradiente de difusão do O₂ e a oxigenação dos tecidos ao redor de áreas hipóxicas, favorecendo a formação de colágeno e a angiogênese (16, 17). Apesar da evidência de que essa abordagem possa ter um efeito terapêutico interessante, ainda não há evidências suficientes para concluir que a oxigenação hiperbárica é eficaz para o tratamento da MRONJ (18).

O gás ozônio (O₃) apresenta elevado potencial oxidante e antimicrobiano (bactericida, viricida e fungicida). Possui propriedades imunoestimulantes, analgésicas e hemostáticas, bem como apresenta atividade anti-inflamatória, por promover a degradação metabólica de citocinas, como bradicinina, histamina e quinina (18). Uma revisão sistemática demonstrou que o ozônio tem um alto nível de biocompatibilidade com células epiteliais orais humanas, fibroblastos gengivais e células periodontais (19). Em um estudo prospectivo de fase II, dez pacientes com MRONJ foram submetidos em média entre três a dez aplicações de ozônio, em que foi observado que todos apresentaram reparação completa do tecido oral e nenhuma toxicidade foi relatada (19).

Nessa perspectiva, a oxigenação hiperbárica e a ozonioterapia são tratamentos promissores, entretanto, são necessários mais estudos que auxiliem o estabelecimento de protocolos para otimizar o resultado clínico e aumentar a qualidade de vida dos pacientes com osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de medicamentos.

Diante do exposto, o presente estudo avaliou, em modelo experimental em ratos, por meio de parâmetros histológicos, histomorfométricos e microtomográficos, as alterações do osso previamente submetido ao uso de bisfosfonatos, e tratado com oxigenação hiperbárica e/ou ozônio.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Delineamento

Trata-se de um estudo experimental *in vivo* randomizado.

2.2 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo 036/17), e foi conduzido de acordo com o disposto na Lei nº 11.794, Decreto nº 6.899 e normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.3 Caracterização da amostra

A amostra foi composta por 54 ratos machos *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, clinicamente sadios com peso entre 150 e 250g, mantidos em gaiolas apropriadas, climatizadas à temperatura de 22°C, ciclo claro-escuro de doze horas e tratados com ração e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos distintos, conforme a 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	

OZ, Ozônio; OH, Oxigenação Hiperbárica.

2.4 Indução da osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos

A indução foi realizada 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 por meio de 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%. Este procedimento foi executado por um único cirurgião.

No período pós-operatório foi administrado paracetamol em gotas para analgesia (10 gotas em 20 ml de água), durante quatro dias.

2.5 Oxigenação hiperbárica

Os animais receberam sessões de oxigenação hiperbárica 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 OH. A sessão teve duração de 90 minutos sob pressão de 2,5 ATA (ATA = 1 atmosfera absoluta = 760mmHg). Em seguida, foi realizada descompressão a 0.3ATA/min. As sessões foram iniciadas logo após a conclusão do protocolo de indução da osteonecrose e realizadas diariamente durante 14 e 28 dias conforme o subgrupo a qual pertence cada animal.

2.6 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 Universidade de Brasília (UnB), por meio do uso de uma cânula de Nelaton número 8, na dose de 1 mg/Kg. As sessões foram iniciadas logo após a conclusão do protocolo de indução da osteonecrose e realizadas diariamente durante 14 e 28 dias conforme o subgrupo a qual pertence cada animal.

2.7 Obtenção das amostras e análises

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 o óbito dos animais fosse constatado pela ausência dos sinais vitais, seguindo os princípios da Declaração dos Direitos dos Animais. As mandíbulas foram removidas 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 dois fragmentos contendo a área das extrações e tecidos adjacentes, bilateralmente. 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 ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) a 10% pH 7,4, e então processado para inclusão em parafina pela técnica convencional para as análises histológica e histomorfométrica.

2.7.1 Análise microtomográfica computadorizada

As peças foram posicionadas em um dispositivo padrão e escaneadas para análise microtomográfica conforme descrito por Irie et al. (2018). A microtomografia (MicroCT) foi realizada no aparelho de alta resolução Skyscan® 1276 (Bruker, Bélgica), com os parâmetros: energia 80kV, intensidade 125mA, resolução 8µm 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.

2.7.2 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 delas. 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).

2.7.3 Análise histomorfométrica

Na análise histomorfométrica foram quantificadas as áreas de neoformação óssea 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 $1450\mu\text{m} \times 800\mu\text{m}$ com aumento de 20x, utilizando a ferramenta “*Ruler Tool – F4*”. Dessa forma, uma imagem contendo a área padronizada de $1.160.000\mu\text{m}^2$ foi obtida com escala definida, para a mensuração da neoformação ossea (em %), para cada lâmina avaliada.

A mensuração da neoformação óssea foi realizada 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 %).

2.7.4 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 $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 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 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).

O número 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, respectivamente. 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. Por sua vez, houve aumento nos grupos Osteonecrose e Osteonecrose + OZ, sendo estatisticamente significativo no grupo 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. No intervalo de 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 que houve redução no grupo Osteonecrose + OZ (Tabela 2 e Figura 1).

O espaçamento 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 que houve redução nos grupos Osteonecrose, Osteonecrose + OZ e Osteonecrose + OZ + OH, porém sem significância estatística (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)

Observação: 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.

3.2 Análise histológica

A análise histológica 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. Foi observado muitos osteócitos incluídos na matriz, 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 organizadas e definidas, evidenciando avanço no processo de remodelação (Figura 2).

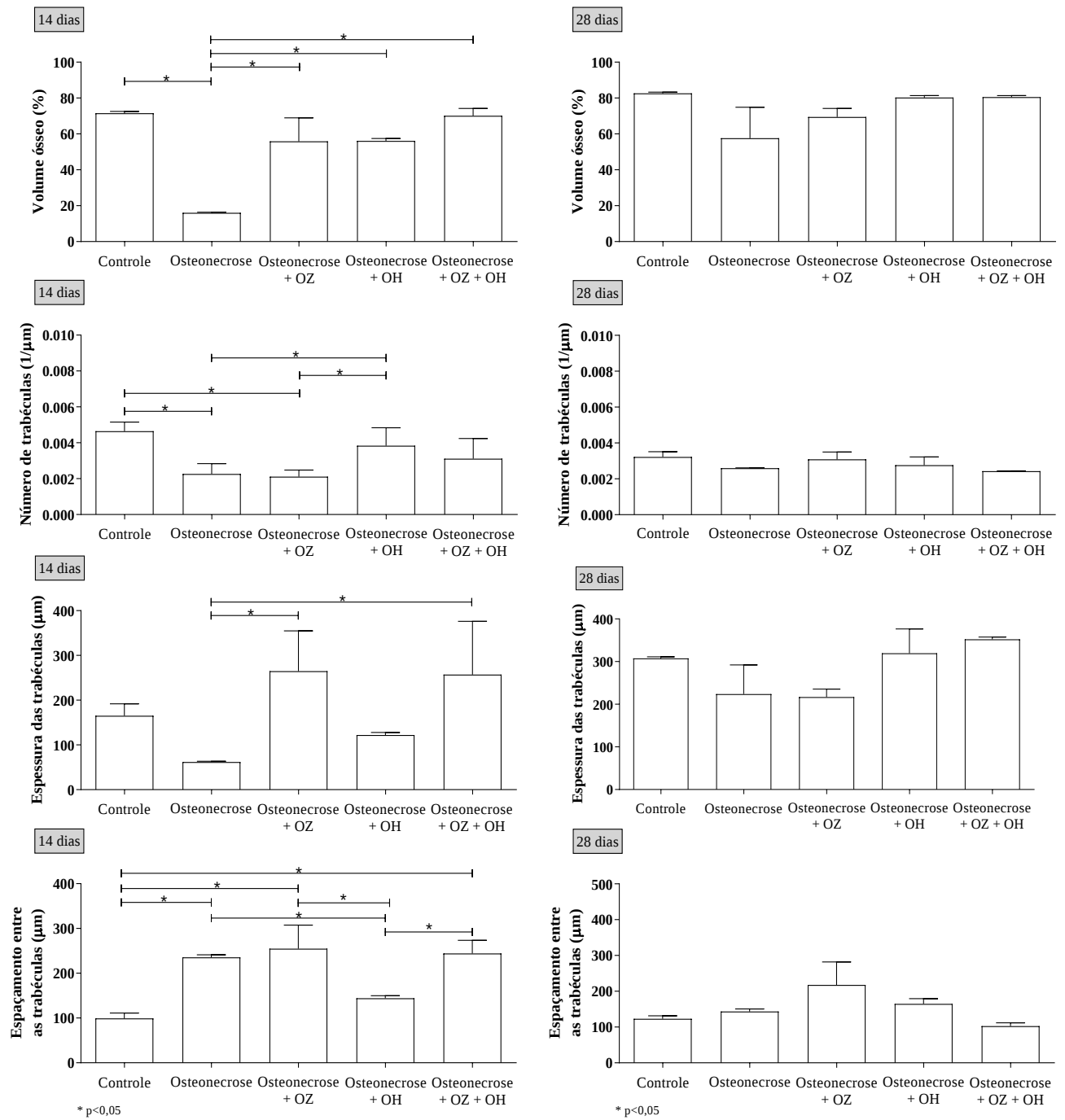


Figura 1: Gráficos representativos dos valores de volume ósseo, número de trabéculas ósseas, espessura das trabéculas ósseas e espaçamento das trabéculas ósseas entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias. (*p<0,05).

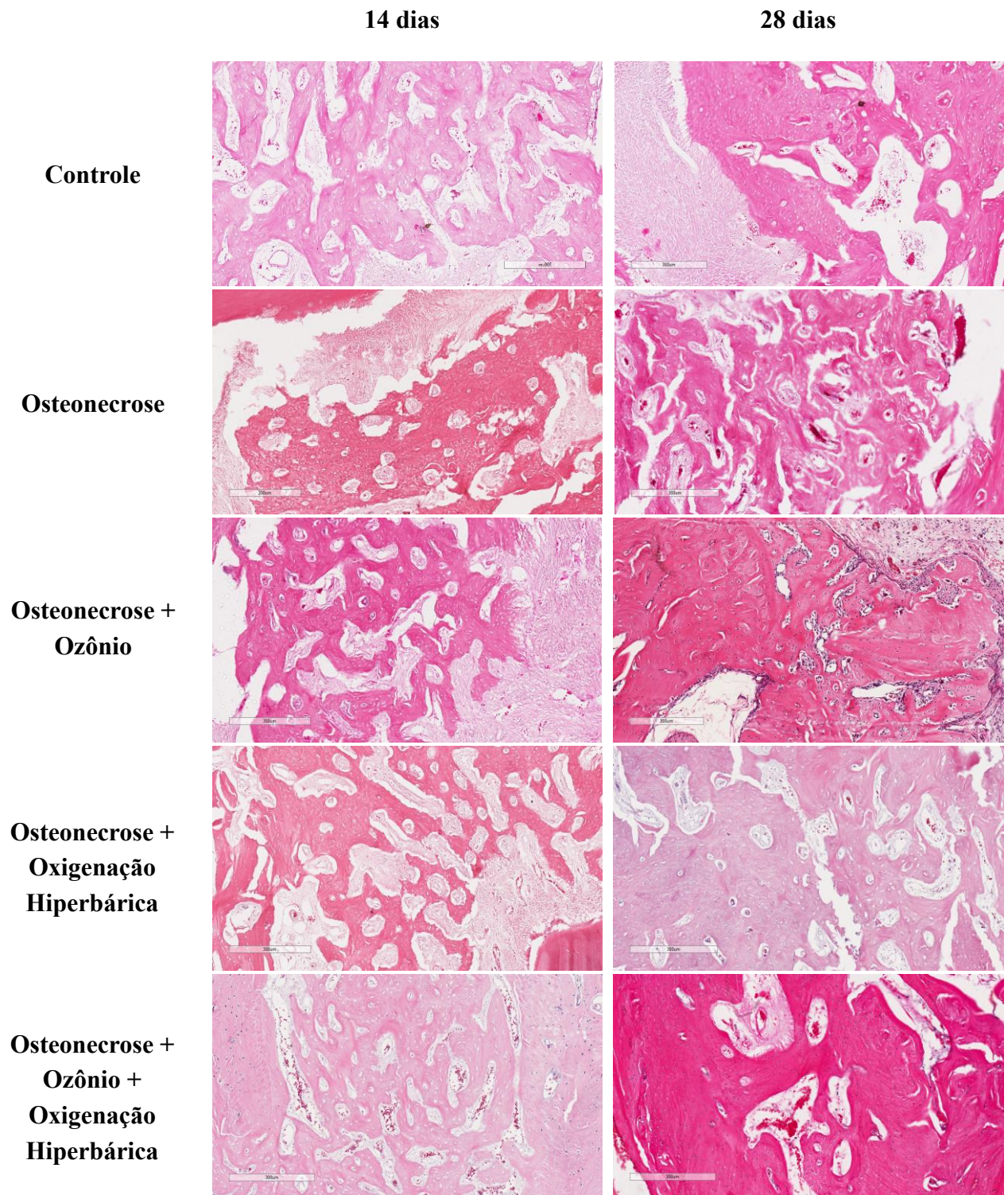


Figura 2: Imagens histológicas dos intervalos de 14 e 28 dias nos grupos Controle; Osteonecrose; Osteonecrose + Oxigenação Hiperbárica; Osteonecrose + Ozônio; Osteonecrose + Ozônio + Oxigenação Hiperbárica.

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, enquanto que entre as trabéculas ósseas, havia tecido medular pouco celularizado. Um número reduzido de osteoclastos foi observado, embora uma grande quantidade de lacunas de Howship na superfície da matriz óssea foram encontradas. Áreas discretas de tecido ósseo secundário, também desorganizadas foram observadas somente após 28 dias (Figura 2).

Nos grupos Osteonecrose tratados com Ozônio, Oxigenação Hiperbárica ou a associação 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, tecido conjuntivo e irregularidades na superfície da matriz óssea ainda estavam presentes, mas foram menos frequentemente encontradas. Foram observados osteócitos incluídos na matriz e tecido medular celularizado entre as trabéculas ósseas, especialmente nos grupos tratados com a associação das terapias. Áreas de tecido ósseo secundário, foram observadas após 28 dias (Figura 2).

3.3 Análise histomorfométrica (neoformação óssea)

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, na análise intragrupo (Tabela 3 e Figura 3).

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)

Observação: 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.

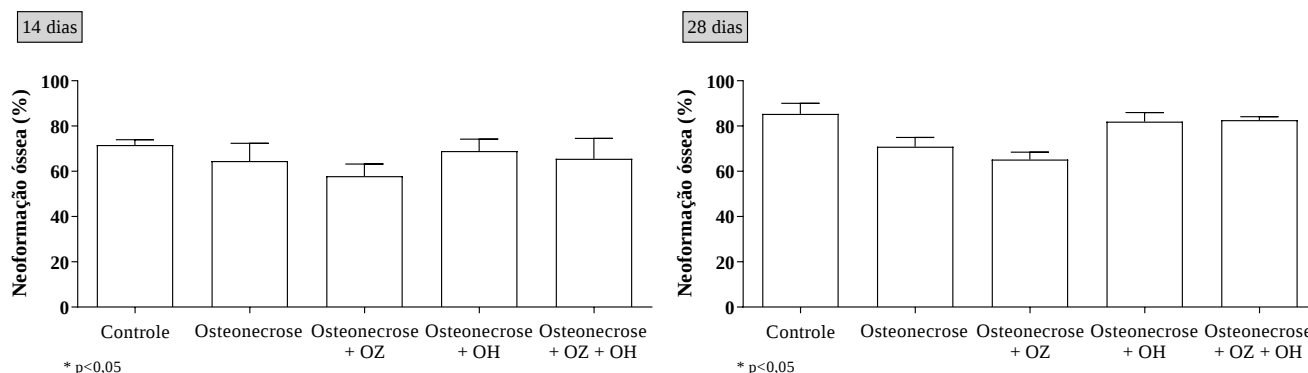


Figura 3: Gráficos representativos dos valores de histomorfometria – neoformação óssea entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias. (* $p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de medicamentos, *Medication Related Osteonecrosis of the jaw* (MRONJ), caracteriza-se como um dos eventos adversos mais graves após uso de terapias antirreabsortivas, em que tem sido fortemente associada à utilização prolongada de bisfosfonatos nitrogenados administrados por via endovenosa, especialmente o ácido zoledrônico (13, 23). Nessa perspectiva, apesar da relevância desta complicação, a prática clínica carece de recomendações baseadas em evidências sobre o uso de terapias adjuvantes, como oxigenoterapia hiperbárica e ozonioterapia (24).

Dessa forma, este estudo avaliou em modelo experimental em ratos, por meio de parâmetros histológicos, histomorfométricos e microtomográficos, as alterações do osso previamente submetido ao uso de bisfosfonatos, e tratado com oxigenação hiperbárica e/ou ozônio. Foi demonstrado que, no intervalo de 14 dias, dentre os grupos experimentais, os tratamentos associados apresentaram os maiores valores em relação aos parâmetros de volume ósseo. Em relação ao número de trabéculas ósseas, em 14 dias, o grupo Osteonecrose + OH apresentou o maior aumento, por sua vez nos grupos Osteonecrose + OZ e Osteonecrose + OZ + OH, foram observados melhores resultados quanto ao espaçamento entre as trabéculas ósseas e espessura trabecular, também no intervalo de 14 dias. Em todos os parâmetros analisados, não houve diferença estatisticamente significativa em 28 dias. Histologicamente, os grupos Osteonecrose tratados com Ozônio, Oxigenação Hiperbárica ou os tratamentos associados apresentaram predominância de tecido ósseo primário com aspecto morfológico menos desorganizado em relação ao grupo osteonecrose sem tratamento. Foram observados osteócitos

incluídos na matriz e tecido medular celularizado entre as trabéculas ósseas, especialmente nos grupos tratados com a associação das terapias. Além disso, áreas de tecido ósseo secundário, foram observadas após 28 dias. Quanto à análise histomorfométrica, não houve diferença significativa na neoformação óssea entre os grupos avaliados em 14 dias e 28 dias. O aumento na porcentagem de neoformação óssea ao longo do tempo foi significativo para os grupos Controle e Osteonecrose + OZ + OH, na análise intragrupo.

Esses achados corroboram com um estudo experimental *in vivo* que avaliou a biomecânica e a matriz óssea estrutural em ratos diabéticos submetidos à oxigenação hiperbárica, em que mostrou um aumento da matriz mineral nos grupos que receberam a OH em relação aos que não foram submetidos ao tratamento (25). Um ensaio clínico randomizado controlado apontou que, em relação à redução da extensão da lesão de osteonecrose de mandíbula, 38,1% dos participantes do grupo controle mostraram melhora, em um tempo médio de 67,9 semanas e 68% dos participantes tratados com OH apresentaram diminuição do tamanho da ferida, em um período médio de 39,7 semanas. No entanto, a cicatrização completa ocorreu em 52% dos pacientes tratados com OH e 33,3% do grupo controle, em um período de 59 semanas e 70 semanas, respectivamente. Dessa forma, a oxigenoterapia hiperbárica mostrou uma cicatrização significativamente melhorada com base em um ensaio clínico randomizado controlado com baixo risco de viés. Entretanto, o sucesso clínico parece baixo, 52% de cura completa, e nenhuma pesquisa adicional foi realizada sobre a OH (26).

Um estudo experimental *in vivo*, que avaliou os efeitos da oxigenação hiperbárica em coelhos com defeitos diafisários tratados com enxerto ósseo autólogo, demonstrou que a administração de OH resultou em um aumento significativo da neoformação óssea e angiogênese em relação ao grupo que foi submetido apenas ao enxerto ósseo. Esses resultados foram aparentes após três e seis semanas de tratamento, respectivamente (27).

Como demonstrado neste estudo, a ozonioterapia apresentou resultados promissores, especialmente quando associada à oxigenação hiperbárica. Nesse âmbito, alguns autores sugerem que o ozônio pode ser implementado no manejo da osteonecrose por modular o reparo ósseo, por meio da síntese de peroxidase de hidrogênio, que ativa eritrócitos, leucócitos e plaquetas, induzindo a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e das proteínas do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), assim como por apresentar capacidade antioxidante, aumentando a proteção celular contra danos do estresse oxidativo, o que pode levar à otimização de outras terapias locais (28, 29, 30,31).

Em um estudo experimental *in vivo*, que avaliou o efeito do ozônio na cicatrização de defeitos ósseos em calvária de ratos, verificou por meio de análise histológica, que o grupo experimental exibiu maior quantidade de matriz óssea e neovascularização em comparação ao grupo controle (32). De forma semelhante, outros estudos relataram o efeito do ozônio na cicatrização tecidual e na prevenção de MRONJ em ratos submetidos à extração dentária, em que o uso de ozônio no pré e pós-operatório resultou em valores significativamente maiores de formação de osso trabecular e a média de osteócitos por cm^2 foi de 26,8 e 24,1 nos grupos experimental e controle, respectivamente (31, 33). Além disso, um outro estudo experimental *in vivo*, relatou que a aplicação de ozônio foi capaz de promover o aumento de volume ósseo em tíbias de coelhos com implantes osseointegráveis (34).

Em um estudo prospectivo de fase II sobre a eficácia e segurança do ozônio, dez pacientes foram submetidos a aplicações de óleo ozonizado, em que lesões na mucosa oral apresentaram cicatrização completa, além disso nenhuma toxicidade foi relatada (35). Em um estudo retrospectivo, com uma amostra de 131 pacientes tratados com ozônio, mostrou que 60% dos participantes apresentaram cicatrização completa da lesão, 30% tiveram uma redução acentuada da ferida, com melhora dos sintomas e em 10% não foi observado nenhum resultado (36). Um outro estudo, com doze participantes, relatou que 75% dos pacientes apresentaram resolução completa da osteonecrose dos maxilares, e 25% obtiveram respostas parciais, em que foi observado melhora do quadro clínico, entretanto associada a persistência da lesão (37). Ressalta-se que, nenhum dos estudos relatados apresentaram um grupo controle, assim até o presente momento, não há registro na literatura de ensaios clínicos controlados randomizados acerca da aplicação terapêutica do ozônio no manejo da MRONJ.

5. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o ozônio e a oxigenação hiperbárica são capazes de otimizar a neoformação óssea, especialmente em relação ao aumento de volume ósseo, revertendo parcialmente os danos causados pelo ácido zoledrônico. Dessa forma, representam abordagens terapêuticas interessantes para o manejo clínico da MRONJ, especialmente quando usadas em associação. Estes resultados *in vivo* podem subsidiar a realização de ensaios clínicos randomizados controlados para estabelecer protocolos terapêuticos para esta condição clínica.

REFERÊNCIAS

1. Bertoldo F, Santini D, Lo Cascio V. Bisphosphonates and osteomyelitis of the jaw: a pathogenic puzzle. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007;4(12):711-721. doi:10.1038/ncponc1000
2. Ruggiero SL, Dodson TB, Aghaloo T, Carlson ER, Ward BB, Kademani D. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication Related Osteonecrosis of the Jaws 2022 Update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2022;80(5):920-943. doi:10.1016/j.joms.2022.02.008
3. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(9):1032-1045. doi:10.4065/83.9.1032
4. Zhao D, Xiao D, Liu M, Li J, Peng S, He Q, et al. Tetrahedral framework nucleic acid carrying angiogenic peptide prevents bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw by promoting angiogenesis. *Int J Oral Sci.* 2022;14(1):23. doi.org/10.1038/s41368-022-00171-7
5. Dodson TB. The Frequency of Medication-related Osteonecrosis of the Jaw and its Associated Risk Factors. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2015;27(4):509-516. doi:10.1016/j.coms.2015.06.003
6. Coleman R, Woodward E, Brown J, Cameron D, Bell R, Dodwell D, et al. Safety of zoledronic acid and incidence of osteonecrosis of the jaw (ONJ) during adjuvant therapy in a randomised phase III trial (AZURE: BIG 01-04) for women with stage II/III breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;127(2):429-438. doi:10.1007/s10549-011-1429-y
7. Lopez-Olivo MA, Shah NA, Pratt G, Risser JM, Symanski E, Suarez-Almazor ME. Bisphosphonates in the treatment of patients with lung cancer and metastatic bone disease: a systematic review and meta-analysis. *Support Care Cancer.* 2012;20(11):2985-2998. doi:10.1007/s00520-012-1563-z
8. Mauri D, Valachis A, Polyzos IP, Polyzos NP, Kamposioras K, Pesce LL. Osteonecrosis of the jaw and use of bisphosphonates in adjuvant breast cancer treatment: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;116(3):433-439. doi:10.1007/s10549-009-0432-z
9. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, et al. First-line treatment with zoledronic acid as compared with clodronic acid in multiple myeloma (MRC Myeloma IX): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;376(9757):1989-1999. doi:10.1016/S0140-6736(10)62051-X
10. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(5):527-534. doi:10.1016/j.joms.2004.02.004
11. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol.* 2009;144(5):667-676. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07504.x
12. Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Koloutsos G, Andreadis C, Boukovinas I, Teleioudis Z, et al. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws: a case control study of risk factors in breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2008;26(28):4634-4638. doi:10.1200/JCO.2008.16.2768
13. Migliorati CA, Saunders D, Conlon MS, Ingstad HK, Vaagen P, Palazzolo MJ, et al. Assessing the association between bisphosphonate exposure and delayed mucosal healing after tooth extraction. *J Am Dent Assoc.* 2013;144(4):406-414. doi:10.14219/jada.archive.2013.0134

14. Cohen EE, LaMonte SJ, Erb NL, Beckman KL, Sadeghi N, Hutcheson KA, et al. American Cancer Society Head and Neck Cancer Survivorship Care Guideline. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(3):203-239. doi:10.3322/caac.21343
15. Yan R, Jiang R, Hu L, Deng Y, Wen J, Jiang X. Establishment and assessment of rodent models of medication related osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Sci*. 2022;14(1):41. doi:10.1038/s41368-022-00182-4
16. Grim PS, Gottlieb LJ, Boddie A, Batson E. Hyperbaric oxygen therapy. *JAMA*. 1990;263(16):2216-2220. doi:10.1001/jama.1990.03440160078042
17. Holland J, Bernstein M, Hamilton W. Hyperbaric oxygen therapy for Bell's palsy. *Cochrane D. Syst Rev*. 2012;2012(2):1-12. doi:10.1002/14651858.CD007288.pub2
18. Rollason V, Laverrière A, MacDonald LC, Walsh T, Tramèr MR, Vogt-Ferrier NB. Interventions for treating bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Cochrane D. Syst Rev*. 2016;2(2):1-45. doi:10.1002/14651858.CD008455.pub2
19. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent*. 2008;36(2):104-116. doi:10.1016/j.jdent.2007.11.008
20. Rocha FS, Gomes Moura CC, Rocha Rodrigues DB, Zanetta-Barbosa D, Nakamura Hiraki KR, Dechichi P. Influence of hyperbaric oxygen on the initial stages of bone healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015;120(5):581-587. doi:10.1016/j.oooo.2015.06.039
21. Irie MS, Rabelo G. D, Spin-Neto R, Dechichi P, Borges J. S, Soares PBF. Use of Micro-Computed Tomography for Bone Evaluation in Dentistry. *Braz. Dent. J*. 2018; 29(3):227–238. doi: 10.1590/0103-6440201801979
22. Egan KP, Brennan TA, Pignolo RJ. Bone histomorphometry using free and commonly available software. *Histopathology*. 2012;61(6):1168-1173. doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04333.x
23. Bamias A, Kastiritis E, Bamia C, Mouloupoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol*. 2005;23(34):8580-8587. doi:10.1200/JCO.2005.02.8670
24. Yarom N, Shapiro CL, Peterson DE, Van Poznak CH, Bohlke K, Ruggiero SL, et al. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: MASCC/ISOO/ASCO Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2019;37(25):2270-2290. doi: 10.1200/JCO.19.01186
25. Limirio PHJO, da Rocha Junior HA, Morais RB, Hiraki KRN, Balbi APC, Soares PB, et al. Influence of hyperbaric oxygen on biomechanics and structural bone matrix in type 1 diabetes mellitus rats. *PloS one*, 2018;13(2), e0191694. doi:10.1371/journal.pone.0191694
26. Freiburger JJ, Padilla-Burgos R, McGraw T, Suliman HB, Kraft KH, Stolp B, 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. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012;70(7):1573-1583. doi:10.1016/j.joms.2012.04.001
27. Grassmann JP, Schnependahl J, Hakimi AR, Herten M, Betsch M, Logters TT, et al. Hyperbaric oxygen therapy improves angiogenesis and bone formation in critical sized diaphyseal defects. *J Orthop Res*. 2015;33(4):513-520. doi:10.1002/jor.22805
28. Ozdemir H, Toker H, Balcı H, Ozer H. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. *J Periodontal Res*. 2013;48(6):722-726. doi:10.1111/jre.12060
29. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res*. 2006;37(4):425-435. doi:10.1016/j.arcmed.2005.08.006

30. Oguz E, Ekinçi S, Eroglu M, Bilgic S, Koca K, Durusu M, et al. Evaluation and comparison of the effects of hyperbaric oxygen and ozonized oxygen as adjuvant treatments in an experimental osteomyelitis model. *J Surg Res.* 2011;171(1):e61-e68. doi:10.1016/j.jss.2011.06.029
31. Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M, Bassorgun I, Ozler M, Oter S, et al. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014;43(6):777-783. doi:10.1016/j.ijom.2013.12.007
32. Kazancioglu HO, Ezirganli S, Aydin MS. Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. *J Craniofac Surg.* 2013;24(6):2141-2146. doi:10.1097/SCS.0b013e3182a244ae
33. Monteiro CGJ, Vieira EM, Emerick C, Azevedo RS, Pascoal VAB, Homsı N, et al. Ozonated oil effect for prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in rats undergoing zoledronic acid therapy. *Clin Oral Investig.* 2021;25(12):6653-6659. doi:10.1007/s00784-021-03951-3
34. Yücesoy T, Seker ED, Cenkci E, Yay A, Alkan A. Histologic and Biomechanical Evaluation of Osseointegrated Miniscrew Implants Treated with Ozone Therapy and Photobiomodulation at Different Loading Times. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2019;34(6):1337-1345. doi:10.11607/jomi.7601
35. Ripamonti CI, Cislighi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: Preliminary results of a phase I-II study. *Oral Oncol.* 2011;47(3):185-190. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.01.002
36. Agrillo A, Filiaci F, Ramieri V, Riccardi E, Quarato D, Rinna C, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): 5 year experience in the treatment of 131 cases with ozone therapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16(12):1741-1747.
37. 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;92(9):1289-1290. doi:10.3324/haematol.11096