

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**



**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA E DO OZÔNIO NO REPARO ÓSSEO APÓS USO  
DE BISFOSFONATOS - ANÁLISE QUANTITATIVA DA NEOVASCULARIZAÇÃO ASSOCIADA  
AO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL DOS MAXILARES**

**FERNANDA FELICIANO TATSCH**

**BRASÍLIA, 2025**

FERNANDA FELICIANO TATSCH

**EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA E DO OZÔNIO NO REPARO ÓSSEO APÓS USO  
DE BISFOSFONATOS - ANÁLISE QUANTITATIVA DA NEOVASCULARIZAÇÃO ASSOCIADA  
AO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL DOS MAXILARES**

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: Profa Dra. Flaviana Soares Rocha

**BRASÍLIA, 2025**

FERNANDA FELICIANO TATSCH

**EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA E DO OZÔNIO NO REPARO ÓSSEO APÓS USO  
DE BISFOSFONATOS - ANÁLISE QUANTITATIVA DA NEOVASCULARIZAÇÃO ASSOCIADA  
AO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL DOS MAXILARES**

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.

Data da defesa: 10/01/2025

Banca examinadora:

---

**Presidente (Orientador)\*:** Prof. Dra. Flaviana Soares Rocha,  
Universidade de Brasília (UnB).

---

**Membro Titular 1\*:** Prof. Dr. Sérgio Bruzadelli Macedo,  
Universidade de Brasília (UnB).

---

**Membro Titular 2\*:** Dr. Daniel Rey de Carvalho,  
Universidade de Brasília (UnB).

---

**Membro suplente\*:** Mestre Leonardo Nogueira de Miranda  
Pereira Pinto (Doutorando UnB).

*Dedico este trabalho, em primeiro  
lugar, a Deus, por ser minha luz, minha  
força e meu guia em todos os  
momentos desta caminhada.*

*“Confia ao Senhor as tuas obras, e  
os teus planos serão  
definidos.”*

*Provérbios 16:3*

## RESUMO

Os bisfosfonatos, também conhecidos como agentes antirreabsortivos e antiangiogênicos, são amplamente utilizados na prática clínica para tratar a osteoporose e metástases ósseas. Esses medicamentos agem suprimindo a atividade dos osteoclastos e promovendo a formação óssea adequada. Contudo, o uso prolongado pode causar complicações graves, como a Osteonecrose dos Maxilares Associada a Medicamentos (MRONJ), que dificulta procedimentos odontológicos invasivos, como extrações dentárias. Nesse contexto, pesquisas recentes têm investigado o potencial terapêutico do ozônio (OZ), destacando sua eficácia devido às propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e de estímulo ao reparo tecidual. Além disso, a oxigenoterapia hiperbárica (OH) tem sido amplamente estudada por sua capacidade de melhorar a oxigenação dos tecidos e acelerar o reparo ósseo. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da OH e do OZ na regeneração óssea após a indução de MRONJ, com ênfase na quantificação dos vasos sanguíneos. Para isso, 54 ratos da linhagem Wistar foram divididos em cinco grupos experimentais, com subgrupos tratados por 14 e 28 dias. A indução de MRONJ foi realizada por meio da administração de ácido zoledrônico (66 µg/Kg), três vezes por semana, durante três semanas, seguida pela exodontia dos molares inferiores. As intervenções terapêuticas com OH e OZ foram aplicadas posteriormente, e os animais foram eutanasiados após 14 ou 28 dias de tratamento. Os resultados demonstraram que os grupos tratados com OZ, ou a combinação de OZ + OH apresentaram um aumento significativo na formação de tecido ósseo primário, caracterizado por uma morfologia óssea mais organizada e maior vascularização. Após 28 dias, observou-se a formação de tecido ósseo secundário. Além disso, os grupos tratado com OZ, OH ou OZ + OH mostraram uma redução na quantidade de vasos sanguíneos ao longo do tempo, sendo significativa apenas para o grupo OZ. Enquanto os grupos controle e com osteonecrose apresentaram um aumento não significativo da vascularização durante o mesmo período.

**Palavras-chave:** Bisfosfonatos. Osteonecrose dos maxilares (ONM). Oxigenação hiperbárica (OH). Ozônio (OZ). Células vasculares.

## ABSTRACT

Bisphosphonates, also known as antiresorptive and antiangiogenic agents, are widely used in clinical practice to treat osteoporosis and bone metastases. These drugs act by suppressing osteoclast activity and promoting adequate bone formation. However, prolonged use can cause serious complications, such as Medication-Associated Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ), which makes invasive dental procedures, such as tooth extractions, difficult. In this context, recent research has investigated the therapeutic potential of ozone (OZ), highlighting its efficacy due to its antimicrobial, anti-inflammatory and tissue repair stimulation properties. In addition, hyperbaric oxygen therapy (HO) has been widely studied for its ability to improve tissue oxygenation and accelerate bone repair. This study aimed to evaluate the effects of OH and OZ on bone regeneration after MRONJ induction, with emphasis on blood vessel quantification. For this purpose, 54 Wistar rats were divided into five experimental groups, with subgroups treated for 14 and 28 days. MRONJ induction was performed by administering zoledronic acid (66 µg/kg) three times a week for three weeks, followed by extraction of the lower molars. Therapeutic interventions with OH and OZ were subsequently applied, and the animals were euthanized after 14 or 28 days of treatment. The results demonstrated that the groups treated with OZ, or the combination of OZ + OH showed a significant increase in the formation of primary bone tissue, characterized by a more organized bone morphology and greater vascularization. After 28 days, the formation of secondary bone tissue was observed. Furthermore, the groups treated with OZ, OH or OZ + OH showed a reduction in the number of blood vessels over time, which was significant only for the OZ group. While the control and osteonecrosis groups showed a non-significant increase in vascularization during the same period.

**Keywords:** Bisphosphonates. Osteonecrosis of the jaw (ONJ). Hyperbaric oxygenation (OH). Ozone (OZ). Vascular cells.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>8</b>
2.1	BIOLOGIA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA	8
2.2	BISFOSFONATOS	9
2.3	FARMACODINÂMICA DOS BISFOSFONATOS	10
2.4	INDICAÇÃO CLÍNICA E EFEITOS ADVERSOS	11
2.5	OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA E OZÔNIO: TERAPIAS ADJUVANTES AO REPARO ÓSSEO	12
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	13
3.2	INDUÇÃO DA OSTEONECROSE ASSOCIADA AO USO DE BISFOSFONATOS	14
3.3	OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA	14
3.4	OZÔNIO	15
3.5	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	15
3.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA	16
3.7	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	16
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>28</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>29</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo com uma composição mineral e orgânica que garante suas propriedades únicas. A porção mineral, composta principalmente por cristais de hidroxiapatita contendo cálcio e fosfato, encontra-se embutida em uma matriz orgânica rica em colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas. Essas características permitem sua calcificação e conferem resistência e elasticidade ao tecido [1,2]. Devido a essas propriedades, o tecido ósseo desempenha funções essenciais para o corpo humano, incluindo sustentação, proteção e metabolismo de minerais [3].

Apesar de sua aparente estabilidade, o tecido ósseo é continuamente remodelado por processos coordenados de reabsorção osteoclástica e formação osteoblástica [1]. Esses eventos são regulados por fatores sistêmicos e locais, além de intervenções externas, como medicamentos usados no tratamento de doenças ósseas. Diante disso, dentre as causas de injúria ao tecido ósseo, destaca-se o uso de medicamentos antirreabsortivos e/ou antiangiogênicos, como os bisfosfonatos. Embora esses agentes aumentem a densidade óssea, eles também elevam significativamente o risco de osteonecrose dos maxilares [4].

Em 2007, a American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) definiu a osteonecrose medicamentosa como uma área de exposição óssea persistente em pacientes que recebem ou receberam antirreabsortivos e/ou antiangiogênicos sistêmicos, sem história de irradiação no complexo maxilomandibular, e que não cicatriza após oito semanas [5]. Ainda segundo a AAOMS, os ossos maxilares são mais suscetíveis à necrose do que outros ossos do corpo devido à alta taxa de remodelação óssea, especialmente ao redor do ligamento periodontal [5].

Diante do exposto, reconstruir o tecido ósseo craniano após lesões é essencial para restaurar sua função e estética. Esse processo envolve uma série de eventos biológicos, que promovem a regeneração e reparo dos tecidos lesionados,

desempenhando um papel crucial na recuperação da integridade estrutural da maxila, mandíbula e outras áreas do crânio [6,7]. Diante desse cenário, o tratamento da osteonecrose tem sido amplamente estudado, com o objetivo de identificar as melhores práticas para controlar a doença [8].

Sendo assim, a literatura relata que a aplicação tópica de ozônio em pacientes com osteonecrose reduz significativamente a dor e inflamação, além de estimular a regeneração óssea. Adicionalmente, a oxigenoterapia hiperbárica tem demonstrado eficácia no controle da osteonecrose maxilar em pacientes submetidos a tratamentos convencionais, como antibióticos e debridamento cirúrgico. Essa terapia melhora a oxigenação e o fluxo sanguíneo local, favorecendo a reparação dos tecidos [9].

Nesse contexto, considerando-se as dificuldades no manejo de pacientes que utilizam esses medicamentos, este trabalho tem por objetivo analisar e quantificar os vasos sanguíneos como indicadores da eficácia das terapias de oxigenação hiperbárica (OH), ozônio (OZ) e sua combinação — no manejo da osteonecrose dos maxilares, buscando-se compreender o impacto desses tratamentos na regeneração vascular dos tecidos ósseos comprometidos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA



### 2.1 BIOLOGIA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA

A regeneração óssea é um processo biológico complexo que depende de eventos celulares e moleculares integrados. Para sua efetivação, são necessários uma fonte de células osteoprogenitoras e imunoinflamatórias, a formação de um coágulo sanguíneo que facilite a deposição de matriz óssea, suprimento vascular adequado e estabilidade mecânica, permitindo a maturação do tecido ósseo imaturo em osso lamelar maduro [10].

O reparo ósseo ocorre em três fases interdependentes: quimiotaxia, mitose e diferenciação [11]. Inicialmente, uma resposta inflamatória é desencadeada, atingindo seu pico em cerca de 24 horas, com ativação de sinais pró-inflamatórios e fatores de crescimento, como TNF- $\alpha$  e interleucinas (IL-1, IL-6, IL-11 e IL-18), que promovem o recrutamento de células-tronco mesenquimais (MSCs) [12].

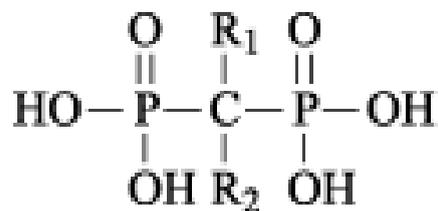
Na fase de renovação, essas células proliferam e se diferenciam em osteoblastos, iniciando a formação óssea intramembranosa. Paralelamente, ocorre a condrogênese, reduzindo os mediadores inflamatórios e favorecendo a substituição da cartilagem calcificada por tecido ósseo. A formação óssea pode ocorrer por ossificação intramembranosa, na qual o osso se forma diretamente a partir de tecido mesenquimal, ou por ossificação endocondral, que envolve a substituição de um molde cartilaginoso por tecido ósseo. A mandíbula é formada predominantemente por ossificação intramembranosa, enquanto a maxila também se desenvolve por ossificação intramembranosa, com algumas contribuições endocondrais. Por fim, na remodelação, osteoblastos e osteoclastos restauram a arquitetura óssea, substituindo o tecido por osso lamelar maduro, por meio de ações coordenadas de formação e reabsorção[11,12]

## 2.2 BISFOSFONATOS



Os bisfosfonatos (BF) são uma classe de medicamentos que possuem uma estrutura química composta por duas moléculas de fosfato conectadas a um átomo de carbono. Esses compostos são análogos sintéticos dos pirofosfatos inorgânicos, cuja função é a regulação da mineralização óssea. Os bisfosfonatos podem ser administrados por via oral em esquemas semanais ou mensais, como o alendronato, risedronato e ibandronato, ou por via intravenosa, como o pamidronato, ibandronato e zoledronato [13].

Sua popularização iniciou-se em 1995, com a aprovação do alendronato, o primeiro aminobisfosfonato (ABF) disponível por via oral. Esses medicamentos são amplamente utilizados no tratamento de diversas condições ósseas, desde osteoporose até neoplasias malignas com metástases ósseas, como hipercalcemia maligna e mieloma múltiplo [14, 15]. Sua ação baseia-se na redução dose-dependente da reabsorção óssea, suprimindo a atividade osteoclástica, estimulando os osteoblastos e inibindo a liberação de fatores de crescimento como TGF- $\beta$  e IGF-I, além de outros peptídeos da matriz óssea. Essa ação também afeta células endoteliais [4,16,17]. Atualmente, são considerados medicamentos de primeira escolha no tratamento da osteoporose e da doença de Paget e, mais recente, na oncologia [18].



**Figura 1:** Estrutura química básica dos bisfosfonatos

Fonte: Research Gate

Conforme ilustrado na Figura 1, o radical R<sub>1</sub> é fundamental para preservar a densidade e integridade do tecido ósseo, enquanto o radical R<sub>2</sub> desempenha um papel crucial na potência e na atividade antirreabsortiva dos bisfosfonatos. Os grupos fosfatos (PO<sub>3</sub>) conferem uma forte afinidade pelo tecido ósseo, especialmente nas superfícies minerais de hidroxiapatita [14].

Apesar de seu mecanismo de ação principal estar associado à inibição da reabsorção óssea pelos osteoclastos, seu processo exato ainda não está totalmente elucidado. Inicialmente, acreditava-se que sua atuação dependia apenas de interações físico-químicas no tecido ósseo mineralizado. Contudo, estudos mais recentes mostram que os efeitos celulares também estão envolvidos.

### 2.3 FARMACODINÂMICA DOS BISFOSFONATOS

Após serem incorporados à matriz óssea, os BP's são liberados durante o processo de reabsorção realizado pelos osteoclastos. Nesse contexto, as moléculas de bisfosfonato são internalizadas pelas células por endocitose, onde interferem diretamente no metabolismo intracelular. Estudos indicam que a BP inibem a atividade das farnesil pirofosfato sintases (FPPS), enzimas essenciais na via do mevalonato, responsáveis pela prenilação de proteínas necessárias para a função e sobrevivência dos osteoclastos. A prevenção dessa via resulta em disfunção celular e, eventualmente, induz apoptose nos osteoclastos, reduzindo a reabsorção óssea [19,20].

Além disso, evidências sugerem que os osteoblastos também desempenham um papel indireto no efeito inibitório dos BP's sobre os osteoclastos. Estudos in vitro demonstraram que os BP's podem alterar a expressão das citocinas pelos osteoblastos, modulando a atividade dos osteoclastos [21,22]. Por outro lado, há relatos de que os BP's apresentam ação antiproliferativa e pró-apoptótica em células tumorais humanas, o que reforça sua importância em terapias oncológicas para metástases ósseas [20].

Embora a BP compartilhe propriedades físico-químicas semelhantes, suas potências anti-reabsortivas variam amplamente, o que reflete diferenças estruturais específicas nas cadeias laterais das moléculas. Essa variação na potência farmacológica influencia diretamente as doses clínicas empregadas, sendo que os mais potentes da BP, como o ácido zoledrônico, são administrados em menores quantidades [23].

#### 2.4 INDICAÇÃO CLÍNICA E EFEITOS ADVERSOS

Os bisfosfonatos (BP's) destacam-se como uma opção terapêutica eficiente no manejo de doenças ósseas caracterizadas pela atividade osteoclástica elevada, como a doença de Paget, hipercalcemia maligna, osteoporose e condições osteolíticas decorrentes de metástases. Além disso, esses medicamentos têm aplicação em casos de osteoporose secundária provocada por fatores como uso prolongado de glicocorticóides, gravidez, transplante de órgãos e paraplegia [24].

No entanto, seu uso está associado a diversos efeitos adversos. Um dos mais graves é a osteonecrose da mandíbula (ONM), que ocorre principalmente em pacientes que recebem altas doses intravenosas, como aqueles com câncer. Estima-se que a ONM afete 1 a 10 pacientes a cada 100 tratados com bisfosfonatos intravenosos, enquanto em pacientes com osteoporose a incidência é significativamente menor. A condição é caracterizada pela morte do tecido ósseo, após intervenções odontológicas frequentes, e está relacionada a fatores de risco como má higiene oral, uso de próteses dentárias e exposição prolongada ao medicamento [25].

Além da ONM, o uso de bisfosfonatos pode resultar em outros efeitos adversos, como inflamação ocular, hipocalcemia, dor musculoesquelética grave e supressão grave do turnover ósseo, que podem comprometer e aumentar o risco de fraturas atípicas. A fibrilação atrial também tem sido associada ao uso desses medicamentos, embora essa relação ainda seja controversa [25].

## 2.5 OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA E OZÔNIO: TERAPIAS ADJUVANTES AO REPARO ÓSSEO

A terapia de Oxigenação Hiperbárica (OH) é um método terapêutico que envolve a administração, por via inalatória, de oxigênio puro, ou em alta concentração, em um ambiente com uma pressão significativamente superior à atmosférica, geralmente de duas a três vezes a pressão do nível do mar. Esse aumento de pressão resulta em elevação tanto da pressão arterial quanto da pressão tecidual de oxigênio nas células (2000 mmHg e 400 mmHg, respectivamente), reduzindo a hipóxia celular e trazendo efeitos terapêuticos que incluem o aumento da perfusão sanguínea, redução do edema e modulação da inflamação, com queda na regulação das citocinas inflamatórias [26].

A OH tem demonstrado benefícios substanciais no processo de cicatrização e, além disso, estimula a proteção de fibroblastos, a produção de colágeno e a angiogênese, favorecendo o processo de componentes teciduais. A OH também é eficaz no tratamento de infecções difíceis de erradicar nos tecidos moles e ósseos, contribuindo para a destruição de microrganismos e melhorando a função dos leucócitos e macrófagos [26,27].

Já a ozônioterapia é uma técnica terapêutica baseada na aplicação de uma mistura de oxigênio e ozônio, que pode ser administrada por diferentes vias, dependendo da necessidade clínica [28]. Classificada como uma terapia bio-oxidativa, essa abordagem permite que o gás seja injetado diretamente no local de interesse ou diluído em substância como soro, óleo e água, promovendo benefícios à saúde do paciente [29]. A eficácia terapêutica depende diretamente da concentração utilizada, sendo relatados efeitos como imunomodulação, ação anti-inflamatória, propriedades bactericidas, antivirais, antifúngicas e analgésicas [30].

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS



#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram utilizados 54 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, com peso entre 150 e 250 gramas, todos em boas condições de saúde. Os animais foram mantidos em gaiolas sob controle de temperatura, fixada em 22°C, no Biotério da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O ciclo de iluminação seguiu uma alternância de 12 horas claro/12 horas escuro, com alimentação e água disponíveis ad libitum. Todas as etapas da pesquisa seguiram rigorosamente as normativas legais vigentes, com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFU (Protocolo 036/17), conforme as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). A amostra foi dividida aleatoriamente em cinco grupos distintos : Sem osteonecrose; Osteonecrose; Osteonecrose associada à terapia com Oxigenação Hiperbárica (Osteonecrose + OH); Osteonecrose associada à terapia com Ozônio (Osteonecrose+OZ) e Osteonecrose associada à terapia com Oxigenação Hiperbárica e Ozônio (Osteonecrose+OH+OZ). Cada grupo foi dividido em 2 subgrupos de 14 e 28 dias, conforme ilustrado na tabela a seguir:

**Quadro 1 – Delineamento Experimental.**

Grupos	Subgrupos	
	14 dias	28 dias
Sem osteonecrose (Controle positivo)	n=3	n=3
Osteonecrose (Controle negativo)	n=6	n=6
Osteonecrose+OH	n=6	n=6
Osteonecrose+OZ	n=6	n=6
Osteonecrose+OH+OZ	n=6	n=6
Total:	<b>54 ratos</b>	

Fonte: O autor

### 3.2 INDUÇÃO DA OSTEONECROSE ASSOCIADA AO USO DE BISFOSFONATOS

O estudo seguiu as diretrizes da Universidade de Brasília (UnB) e administrou ácido zoledrônico na dosagem de 66 µg/kg por via intraperitoneal, três vezes por semana, durante três semanas. Cinco dias após o término desse ciclo, foi realizada a extração de um molar inferior de ambos os lados da mandíbula, pelo mesmo cirurgião S.B.M., para induzir osteonecrose mandibular. O procedimento cirúrgico ocorreu sob anestesia geral, utilizando-se uma injeção intraperitoneal composta por 0,07 ml/100g (1,61 mg/100g) de cloridrato de xilazina a 2% e 0,1 ml/100g (1 mg/100g) de cloridrato de cetamina a 10%, que atuam como sedativo muscular e anestésico, respectivamente. Após a cirurgia, administrou-se paracetamol em gotas (10 gotas em 20 ml de água) durante quatro dias para controle da dor. As sessões de oxigenoterapia hiperbárica e/ou ozônio iniciaram-se imediatamente após as extrações dentárias.

### 3.3 OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA

Conforme descrito por Rocha et al. (2015), os animais foram submetidos a sessões de oxigenação hiperbárica (OH) em câmaras experimentais EcoBar 400 (produzido pela Ecotec Equipamentos e Sistemas Ltda®, Mogi das Cruzes, SP, Brasil) [31]. A pressão necessária foi atingida inicialmente com um período de compressão de 0,3 ATA/min. Sob uma pressão de 2,5 ATA (ATA = 1 atmosfera absoluta = 760mmHg), cada sessão durou 90 minutos e teve um período de decompressão de 0,3 ATA/min. Após a confirmação de que havia osteonecrose, as sessões começaram e foram realizadas diariamente por 14 ou 28 dias, dependendo do subgrupo..

### 3.4 OZÔNIO

Para os tratamentos com Ozônio, utilizou-se um gerador de ozônio (modelo O&L 1.5RM, Ozone Life®, Brasil). A aplicação foi realizada por insuflação retal com uma cânula de Nelaton número 8, na dosagem de 1 mg/kg, conforme protocolo desenvolvido na Universidade de Brasília (UnB). As sessões de Ozônio também começaram imediatamente após as extrações e foram realizadas a cada 48 horas por 14 ou 28 dias, dependendo do subgrupo.

### 3.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 14 e 28 dias após o início das terapias. A eutanásia foi realizada por aprofundamento anestésico, seguido de deslocamento cervical, conforme os princípios éticos estabelecidos na Declaração Universal dos Direitos dos Animais. As mandíbulas foram removidas através de desarticulação e seccionadas com brocas 702 de alta rotação, sob irrigação contínua com solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%. Os fragmentos de osso extraídos, contendo a área da extração e os tecidos adjacentes de ambos os lados, foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M por 48 horas, e posteriormente desmineralizados em solução de EDTA a 10% com pH 7,4. Esses fragmentos foram processados por técnica convencional de inclusão em parafina para análise histológica e histomorfométrica.

### 3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica foi realizada utilizando um microscópio óptico modelo BX50 (Olympus Imaging America Inc., Shinjuku-ku, Tóquio, Japão), com ampliações de 40x e 100x. As lâminas, coradas com Tricrômio de Mallory (TM), foram examinadas para avaliar o reparo ósseo e a neoformação vascular, permitindo uma análise detalhada do processo de regeneração óssea.

### 3.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A análise histomorfométrica quantificou a presença de vasos sanguíneos na área examinada. As lâminas histológicas coradas com Tricrômio de Mallory (TM) foram digitalizadas utilizando o scanner Aperio AT Turbo (copyright© 2013 Leica Biosystems Imaging, Inc.). As imagens foram obtidas com ampliação de 20x e analisadas por meio do software Aperio ImageScope (Copyright© Aperio Technologies, Inc 2003-2014). Uma região de interesse (ROI) de 1450  $\mu\text{m}$  x 800  $\mu\text{m}$  foi delineada em cada lâmina com a ferramenta "Ruler Tool – F4", resultando em uma área padronizada de 1.160.000  $\mu\text{m}^2$ .

A análise da quantidade de vasos sanguíneos foi conduzida por um único examinador, devidamente calibrado, utilizando o software Aperio ImageScope. Com a ferramenta "Pen Tool F2", cada vaso sanguíneo foi individualmente delineado dentro da área padronizada da ROI, que corresponde à região alveolar lesionada pela exodontia. As áreas de todos os vasos contornados foram somadas para determinar a área total ocupada pelos vasos sanguíneos. A porcentagem de vasos sanguíneos foi calculada pela razão entre a área total ocupada pelos vasos e a área padronizada da ROI, expressa em percentual (%).

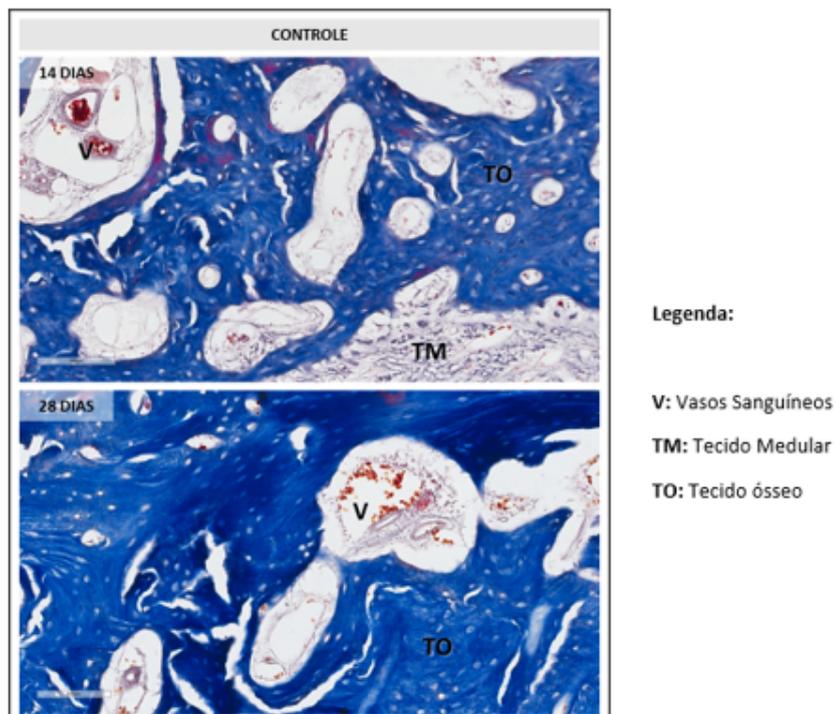
### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram processados com o software GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Inicialmente, foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, os parâmetros foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pela correção de Dunns para comparações múltiplas. O nível de significância estatística foi definido como  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

A análise morfológica das amostras obtidas no grupo Controle (Figura 2) revelou características que refletem o padrão esperado de reparação óssea ao longo do tempo. Na fotomicrografia representativa, observou-se que no período de 14 dias (A), o defeito ósseo apresenta tecido predominante de natureza imatura, com trabéculas ósseas delimitando espaços preenchidos por tecido medular e vasos sanguíneos em formação. A matriz óssea recém-formada apresenta organização não lamelar, indicando as fases iniciais do processo de remodelação.

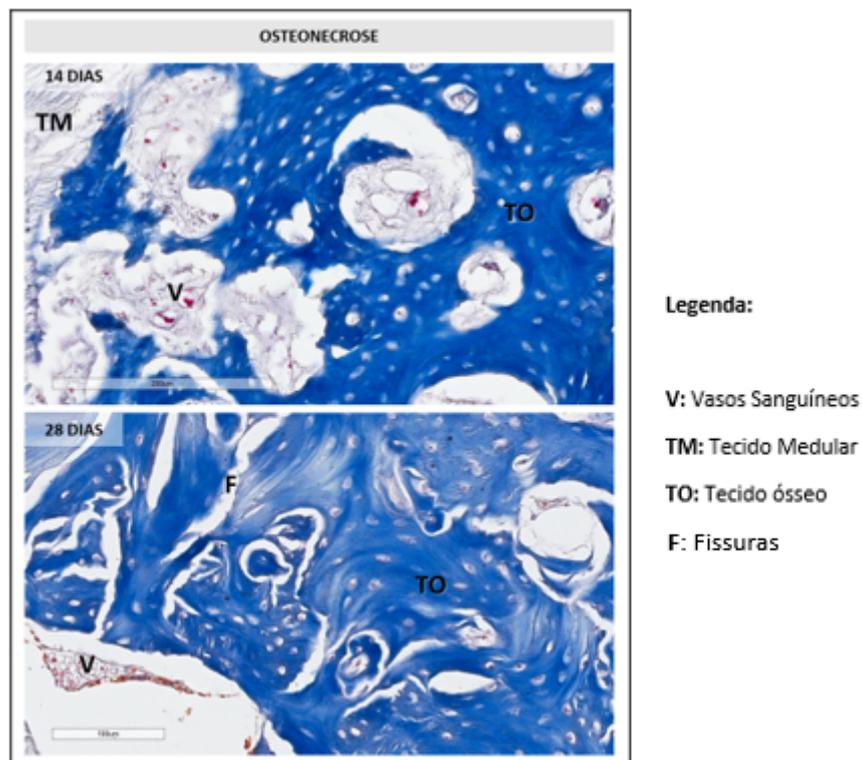
Já no período de 28 dias (B), destaca-se progresso na regeneração óssea, com trabéculas mais definidas e organizadas, características de tecido ósseo secundário. As áreas de remodelação indicam a transição para uma estrutura óssea mais madura, confirmada pela presença de osteócitos inseridos na matriz mineralizada e pela superfície regular das trabéculas.



**Figura 2:** Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo Controle, nos períodos de 14 (A) e 28 (B) dias. TM. Aumento de 20x

Para o grupo com Osteonecrose (Figura 3), na imagem A, observa-se a presença de áreas de tecido conjuntivo e tecido ósseo primário com baixa celularidade. A matriz óssea apresenta uma morfologia visivelmente desorganizada e superfícies corroídas, além de fissuras irregulares. Um número significativo de lacunas de Howship está presente, indicando intensa atividade de reabsorção óssea. Contudo, é perceptível a escassez de osteoclastos, o que sugere um processo de remodelação óssea comprometido. O tecido medular localizado entre as trabéculas também exibe baixa celularidade, evidenciando uma redução na atividade regenerativa.

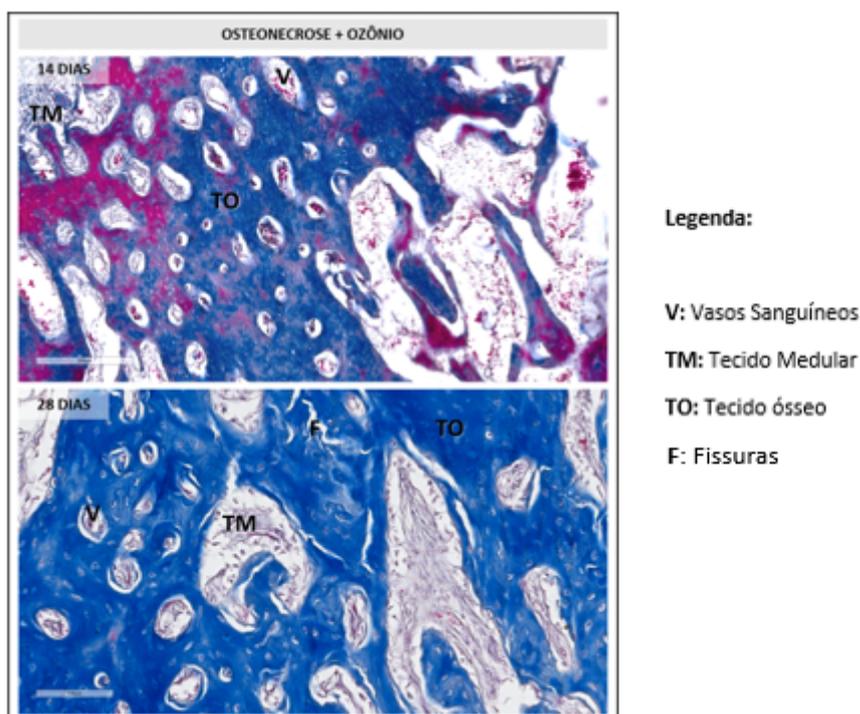
Já na imagem B, verifica-se a presença de áreas mais densamente coloridas, compatíveis com a formação de tecido ósseo secundário. Entretanto, essas áreas são pequenas e continuam apresentando desorganização estrutural. Enquanto a imagem A reflete as características iniciais, com predominância de tecido ósseo primário e maior presença de irregularidades, a imagem B permite identificar formações de tecido ósseo secundário como uma tentativa de regeneração, observáveis após aproximadamente 28 dias.



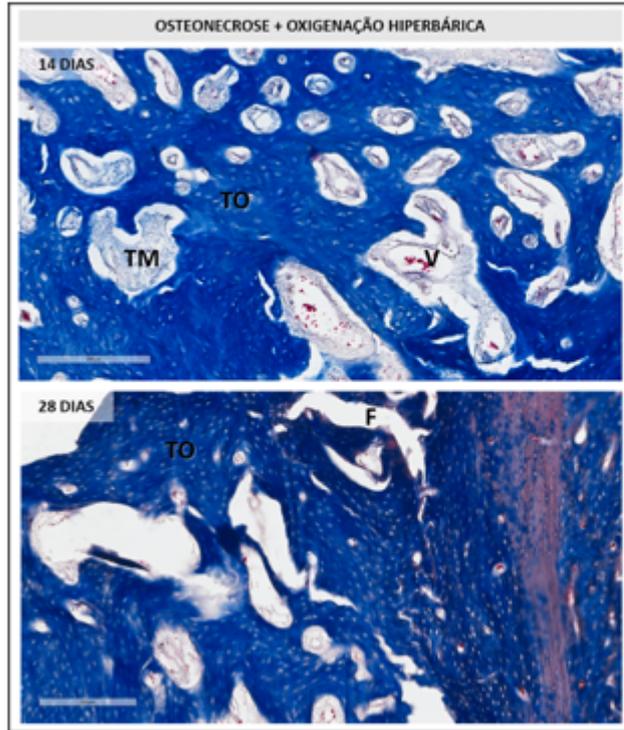
**Figura 3:** Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no Grupo com Osteonecrose, nos períodos de 14 (A) e 28 (B) dias. TM. Aumento de 20x

Nos grupos com osteonecrose tratados com Ozônio, Oxigenação Hiperbárica ou com a combinação dos dois tratamentos (Figuras 4, 5 e 6), nas imagens correspondentes aos 14 dias (A), observa-se a predominância de tecido ósseo primário com uma morfologia menos desorganizada em comparação ao grupo de osteonecrose sem tratamento. Apesar de ainda serem visíveis algumas lacunas de Howship vazias e áreas de tecido conjuntivo, as irregularidades na superfície da matriz óssea tornam-se menos frequentes. Além disso, nota-se a presença de osteócitos inseridos na matriz óssea, sugerindo progressos iniciais no processo regenerativo. O tecido medular entre as trabéculas apresenta maior celularidade, evidenciando um ambiente biológico mais ativo e favorável à recuperação.

Nas imagens correspondentes aos 28 dias (B), verifica-se a formação de tecido ósseo secundário, refletindo uma remodelação mais avançada e organização estrutural aprimorada. O tecido medular entre as trabéculas mantém maior celularidade e vascularização ocasional, indicando uma melhora na oxigenação e nos processos metabólicos locais. A presença de osteócitos integrados à matriz óssea reforça a qualidade do tecido regenerado (Figuras 4, 5 e 6).



**Figura 4:** Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo com Osteonecrose, tratado com Ozônio, nos períodos de 14 (A) e 28 (B) dias. TM. Aumento de 20x



Legenda:

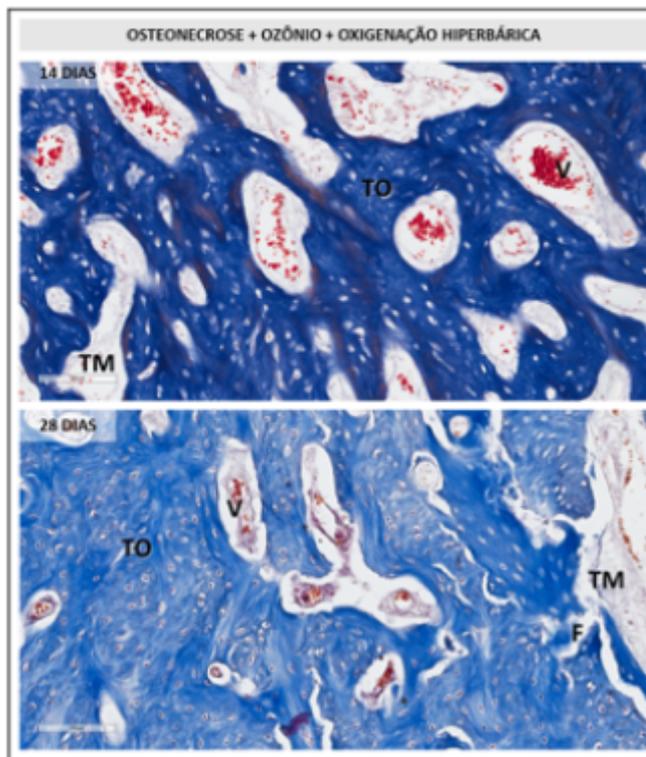
V: Vasos Sanguíneos

TM: Tecido Medular

TO: Tecido ósseo

F: Fissuras

**Figura 5:** Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo com Osteonecrose, tratado com Oxigenação Hiperbárica, nos períodos de 14 (A) e 28 (B) dias. TM. Aumento de 20x



Legenda:

V: Vasos Sanguíneos

TM: Tecido Medular

TO: Tecido ósseo

F: Fissuras

**Figura 6:** Fotomicrografia representativa do defeito ósseo no grupo com Osteonecrose, tratado com a combinação de Ozônio + Oxigenação hiperbárica, nos períodos de 14 (A) e 28 (B) dias.

TM. Aumento de 20x

Os resultados obtidos na análise histomorfométrica dos vasos sanguíneos demonstram diferenças significativas entre os grupos avaliados nos períodos de 14 e 28 dias. Os resultados obtidos foram analisados quanto à significância estatística, conforme indicado na Tabela 2 e na Figura 7 apresentada a seguir. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de tratamento e os controles foram avaliadas por meio de letras maiúsculas e minúsculas. Letras maiúsculas diferentes dentro de uma mesma coluna indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo período ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes dentro de uma mesma linha indicam diferenças significativas ao longo do tempo (entre os períodos de 14 e 28 dias) dentro de um mesmo grupo ( $p < 0,05$ ).

No período de 14 dias, o grupo controle positivo (sem osteonecrose) apresentou uma média de  $8,12 \pm 1,31\%$  de vasos sanguíneos, valor estatisticamente similar ao grupo controle negativo (com osteonecrose), que registrou  $8,56 \pm 2,68\%$ . Esses dados indicam que, nesse período, a presença de osteonecrose não alterou significativamente a formação de vasos sanguíneos. Por outro lado, os tratamentos com Ozônio ( $13,34 \pm 4,06\%$ ) e a combinação de Ozônio e Oxigenação Hiperbárica ( $14,14 \pm 1,91\%$ ) mostraram valores percentuais de vasos significativamente maiores em comparação aos controles positivo e negativo, sugerindo um efeito angiogênico dessas terapias. O grupo tratado com Oxigenação Hiperbárica isoladamente ( $8,74 \pm 0,84\%$ ) não apresentou diferenças significativas em relação aos grupos controle.

No período de 28 dias, observou-se um aumento nos valores percentuais de vasos sanguíneos nos grupos controle, mas sem relevância estatística. O controle positivo apresentou  $10,36 \pm 2,93\%$ , enquanto o controle negativo apresentou  $10,98 \pm 0,34\%$ , sem diferenças estatísticas entre eles. Para os tratamentos que envolveram OZ, OH ou a combinação de ambos, observou-se um declínio na porcentagem de vasos sanguíneos. A combinação de Ozônio e Oxigenação Hiperbárica, após 28 dias, teve uma porcentagem variando de ( $11,85 \pm 1,17\%$ ), sem diferenças estatísticas significativas em relação ao controle negativo. O tratamento apenas com Ozônio teve uma porcentagem variando de ( $8,26 \pm 1,80\%$ ), sem significância estatística em relação aos controles. Já a

Oxigenação Hiperbárica isolada ( $6,90 \pm 1,94\%$ ) apresentou valores semelhantes aos controles.

**Quadro 2 - Valores de histomorfometria de vasos sanguíneos, entre os grupos avaliados, nos períodos de 14 e 28 dias.**

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

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.

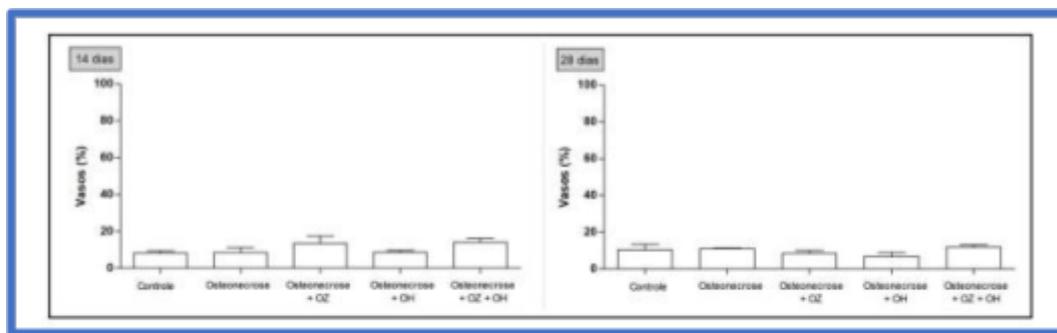


Figura 7: Valores de histomorfometria, nos períodos de 14 e 28 dias. Fonte: O autor

Os dados sugerem que o Ozônio, isolado ou combinado com Oxigenação Hiperbárica, apresenta um potencial angiogênico mais evidente no período inicial (14 dias). No entanto, após 28 dias, as diferenças entre os grupos tratados e os controles diminuem, indicando que a formação de vasos sanguíneos tende a se estabilizar ao

longo do tempo. Por outro lado, a Oxigenação Hiperbárica, isoladamente, parece exercer um impacto limitado na vascularização.

## 5 DISCUSSÃO

O aumento substancial da vascularização aos 14 dias de tratamento sugere que os tratamentos com OH e OZ combinados ou OZ isolado desempenharam um papel crucial no início do processo de cicatrização, favorecendo a oxigenação, nutrição tecidual e estimulando a formação de novo osso e tecido de granulação. Após quatro semanas, foi observada uma redução na quantidade de vasos sanguíneos e no tecido de granulação, indicando a transição para uma fase mais avançada de remodelação óssea, com maior evidência de matriz óssea recém-formada.

No período de 14 dias, os grupos tratados com Ozônio (OZ) e a combinação de Ozônio e Oxigenação Hiperbárica (OZ + OH) apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos Controles (sem osteonecrose [+]) e com osteonecrose [-]), demonstrando maior formação de vasos sanguíneos nesses tratamentos. Essa significância foi evidenciada pelas diferentes letras maiúsculas atribuídas aos grupos, como, por exemplo, o grupo OZ e OZ + OH. Já o grupo tratado apenas com Oxigenação Hiperbárica (OH) não apresentou diferenças significativas em relação aos controles nesse período, como indicado pelas mesmas letras atribuídas.

No período de 28 dias, as diferenças entre os grupos tratados (OZ e OZ + OH) e os controles deixaram de ser estatisticamente significativas em relação ao controle, conforme evidenciado pela repetição das mesmas letras maiúsculas atribuídas a esses grupos (ex.: controle negativo com  $10,98 \pm 3,01\%$  e OZ com  $8,26 \pm 1,80\%$ , ambos com "A"). Essa ausência de significância indica que, após 28 dias, os tratamentos não mantiveram uma diferença estatística relevante em relação aos Controles, sugerindo estabilização no processo de angiogênese ao longo do tempo.

Estudos prévios corroboram a eficácia da OZ como potencial terapia para pacientes com osteonecrose dos maxilares associada a medicamentos (ONMRM). Agrillo et al. (2007a) relataram que, em um grupo de pacientes tratados com Ozônio e antibióticos antes e após a cirurgia, 54% alcançaram cura completa, enquanto 30% apresentaram redução significativa no tamanho da lesão e melhora dos

sintomas [32]. Esses achados indicam que a Ozônioterapia pode potencializar os efeitos dos tratamentos cirúrgicos e farmacológicos, promovendo a cicatrização e prevenindo a progressão da doença, alinhando-se aos resultados do presente estudo.

Outro estudo realizado por Agrillo et al. (2012), com 94 pacientes, demonstrou que a Ozônioterapia reduziu significativamente a dor e melhorou os desfechos clínicos: 60% dos pacientes relataram resolução completa dos sintomas, e 30% apresentaram uma redução substancial das lesões [33]. Adicionalmente, Alves (2017) descreveu um caso clínico de sucesso no qual a Ozônioterapia foi utilizada no tratamento da ONM relacionada à medicamentos, evidenciando sua eficácia na regeneração de regiões ósseas afetadas [34].

No presente estudo, os grupos tratados com OZ, ou a combinação de OZ e OH, apresentaram um aumento expressivo na formação de tecido ósseo primário, caracterizado por uma morfologia mais organizada e maior vascularização. Aos 28 dias, foi observada a formação de tecido ósseo secundário. Durante esse período, também foi notada uma redução significativa na quantidade de vasos sanguíneos no grupo tratado com OZ, enquanto os grupos controle (+) e de osteonecrose (-) apresentaram um aumento não significativo na vascularização.

Ou seja, 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, de modo a 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.

No entanto, este estudo apresenta algumas limitações. A complexidade anatômica da mandíbula dificultou a seleção de áreas representativas para análise. Além disso, a ausência de análises moleculares, como a imunohistoquímica, limitou a obtenção de informações mais detalhadas sobre o metabolismo tecidual e a atividade celular durante o processo de reparo ósseo. Estudos futuros devem incluir essas análises

para fornecer uma compreensão mais abrangente dos mecanismos envolvidos na regeneração óssea e nos efeitos terapêuticos do OZ e OH.

Esses resultados destacam a relevância da significância estatística na interpretação dos dados e sugerem que o Ozônio isolado e em combinação com a Oxigenação Hiperbárica, tem potencial angiogênico significativo no período inicial (14 dias), mas que essa diferença tende a se estabilizar com o tempo. Embora os resultados sejam promissores, a necessidade de estudos adicionais é evidente para confirmar os achados e expandir o conhecimento sobre a aplicação dessas terapias no manejo da osteonecrose associada ao uso de medicamentos (MRONJ).

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo contribui para a compreensão do potencial clínico de OH e OZ no tratamento da osteonecrose dos maxilares, sugerindo que essas abordagens podem representar alternativas promissoras para pacientes acometidos por essa condição. Este estudo demonstra que tanto a Oxigenoterapia Hiperbárica (OH) associada à Ozônioterapia quanto a Ozônioterapia isolada são alternativas terapêuticas na promoção da neovascularização óssea em modelos experimentais de osteonecrose induzida por bisfosfonatos, favorecendo a formação de novo tecido ósseo e acelerando o processo de reparo.

## REFERÊNCIAS

1. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 111-28.
2. Costa LLR, Costa TM, Souza AMP. Análise do conhecimento e da conduta médica acerca da prevenção da osteonecrose dos maxilares pelo uso de bisfosfonatos. Rev Univ Vale Rio Verde. 2019;17(1):1-8.
3. Katchburian E, Arana-Chaves VE. Histologia e embriologia oral. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.
4. Pereira YCL, Nascimento GC. The use of bisphosphonates in dental clinic: a review of the last five years. Braz Dent Sci. 2013;16(2):13-20.
5. AAOMS. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. J Oral Maxillofac Surg. 2007;65(3):369-76.
6. Lorénte LP, Alves PB, Nogueira HCR. Tecido ósseo. Manual teórico e prático de histologia. São Paulo: Blucher; 2019. p. 61-8.
7. Consolaro A. Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. Maringá: Dental Press; 2009. 352 p.
8. Hillner BE, Ingle JN, Chlebowski RT, Gralow J, Yee G, Janjan NA, et al. American Society of Clinical Oncology guideline on the role of bisphosphonates in breast cancer. J Clin Oncol. 2000;18(6):1378-91.
9. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery (IJOMS). Disponível em: <https://www.journals.elsevier.com/international-journal-of-oral-and-maxillofacial-surgery>. Acesso em: 12/05/2024.

10. Donos N, Acáli Um, Padhye N, Esculeano A, Calciolari E. Regeneração óssea em implantodontia: quais os fatores que afetam o resultado clínico? *Periodontol* 2000. 2023;93:26-55. doi: 10.1111/prd.12518.
  
11. Fisher JO, Reddi AH. Functional tissue engineering of bone: signals and scaffolds. In: Ashammakhi N, Ferretti P, editors. *Topics in Tissue Engineering*. Helsinki: University of Oulu; 2003. v.1. p. 760.
  
12. Marséll R, Einhorn TA. A biologia da cura de fraturas. *Wound*. 2011;42(6):551-5.
  
13. Fleisch H. Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. *Recent Results Cancer Res*. 1989;116:1-28. doi: 10.1007/978-3-642-83668-8\_1.
  
14. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev*. 1998;19(1):80-100.
  
15. Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol*. 2003;21:4253-4.
  
16. 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):527-34.
  
17. Brozoski MA, Traina AA, Deboni AL, Marques MM, Naclério-Homem MG. Osteonecrose maxilar associada ao uso de bisfosfonatos. *Rev Bras Reumatol*. 2012;52(2):260-70.
  
18. Arboléya L. Bisfosfonatos. In: Arboléya L, Pérez Edo L, editors. *Manual de enfermedades óseas de la Sociedad Española de Reumatología*. 2nd ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010. p. 319-30.
  
19. Russell RGG, Xia Z, Dunford JE, Oppermann U, Kwaasi AA, Hulley PA, et al. Mecanismos de ação dos bifosfonatos: similaridades e diferenças e sua potencial influência na eficácia clínica. *Osteoporos Int*. 2008;19(3):245-9.

20. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisfosfonatos: mecanismo de ação e papel na prática clínica. *Mayo Clin Proc.* 2015;90(3):345-58.
  
21. Khosla, S., Hofbauer, LC, & Mohan, S. (2018). Interações osteoblasto-osteoclasto. *Endocrine Reviews* .
  
22. Green JR. Efeitos antitumorais dos bisfosfonatos. *Cancer.* 2004;7(2):232-6.
  
23. Lin JH, Duggan DE, Chen IW, Ellsworth RL. Farmacocinética e farmacodinâmica de bifosfonatos. *J Clin Pharmacol.* 2020.
  
24. Licata AA. Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management. *Am J Med Sci.* 1997;313(1):17-22.
  
25. Kennel KA, Drake MT. Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management. *Mayo Clin Proc.* 2009 Jul;84(7):632-7. doi: 10.1016/S0025-6196(11)60752-0. PMID: 19567717.
  
26. Dauwe PB, Pulikkottil BJ, Lavery L, Stuzin JM, Rohrich RJ. A oxigenoterapia hiperbárica funciona na facilitação da cicatrização de feridas agudas: uma revisão sistemática. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133(2):208-15.
  
27. Hess CT. Lista de verificação para fatores que afetam a cicatrização de feridas. *Adv Skin Wound Care.* 2011;24(4):192. Disponível em: <http://journals.lww.com>.
  
28. Hayashi MP, Friolani M. Aplicabilidade clínica cirúrgica da ozonioterapia em pequenos animais: revisão de literatura. *Rev Univ Ciência.* 2018;27(1-2):1-10.
  
29. Bocci V. *Ozone: a new medical drug.* Dordrecht: Springer; 2004.
  
30. Maslennikov OV, Kontorshchikova CN, Gribkova IA. *Ozone therapy in practice.* Nizhny Novgorod: Health Manual; 2008.



31. Rocha FS, Oliveira Neto JC, Anbinder AL, et al. Influence of hyperbaric oxygen on the initial stages of bone healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015;120(5):581-7.
  
32. Agrillo A, Sassano P, Rinna C, et al. Ozone therapy in the treatment of osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Haematologica.* 2007;92(9):1289-90.
  
33. Agrillo A, Sassano P, Rinna C, et al. Ozone therapy and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an observational study. *Oral Dis.* 2012;18(6):621-7.
  
34. Alves C. Aplicabilidade da ozonioterapia na osteonecrose dos maxilares relacionados a medicamentos: relato de caso clínico. *Rev Bras Odontol.* 2017;74(1):1-5.