

TÚLIO DE LUCENA PIRES

**EFEITO DA OZONIOTERAPIA SISTÊMICA EM RATOS EM USO DE
BISFOSFONATO**

**BRASÍLIA,
2018**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TÚLIO DE LUCENA PIRES

**EFEITO DA OZONIOTERAPIA SISTÊMICA EM RATOS EM USO DE
BISFOSFONATO**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Universidade de Brasília.**

Orientador: Paulo Tadeu de Souza Figueiredo

BRASÍLIA

2018

*Dedico este trabalho a todas as pessoas que participaram em algum momento e à
minha esposa e família que estiveram ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo, meu orientador, que desde a preceptoria no programa de Residência Multiprofissional em Atenção Oncológica, HUB-UnB, dedicou seu conhecimento a nossa orientação, e deu-me a oportunidade de pós-graduação e, a quem tenho admiração como professor, profissional e pessoa.

Ao Prof. Sérgio Bruzadelli Macedo, a quem tenho grande admiração, desde a graduação em outra instituição, pela passagem de conhecimento e orientação em relação a Ozonioterapia e demais terapias complementares na odontologia e, ser exemplo de professor e ser humano.

À Prof.^a Nilce Santos de Melo, pela dedicação de horas em orientações e ensino e, horas de dedicação em análise histopatológica das amostras.

Aos professores André Ferreira Leite e Carla Ruffeil, pelas reuniões, passagem de conhecimento e orientação em grupo, durante todo o período da pós-graduação.

Ao Prof. Márcio Botelho de Castro, pela dedicação e orientação em patologia veterinária e, pela disponibilização do laboratório de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário Universitário da Universidade de Brasília, para confecção e análise das lâminas histológicas.

Ao veterinário Rafael, do Laboratório de Cirurgia Experimental, pelo treinamento e ensino de manejo dos animais e pela sempre disponibilidade a saúde dos ratos usados no estudo.

Aos técnicos do alojamento de animais da Faculdade de Medicina, Wilson, Hercule e Derisson, pelo cuidado e respeito aos nossos animais durante todo período.

Aos técnicos de laboratório, Lídia, do laboratório de histopatologia bucal, e Luciano, do FARMOL, pela disponibilidade do espaço e cuidado com nossos materiais.

Aos colegas e amigos do programa Taiana, Rebeca, Andréia, Raíza, Camila, Nathalia e Leonardo pela disponibilidade e ajuda durante a fase experimental.

Ao aluno de Iniciação Científica, Jieni Zhang Jing, pela dedicação durante todas as fases.

RESUMO

Introdução: Os Bisfosfonatos (BF) são medicamentos indicados com sucesso para terapia antirreabsortiva em doenças como osteoporose e metástases ósseas de tumores malignos. Como efeito adverso, os BF estão associados à osteonecrose ósseas, agora chamadas de Osteonecrose relacionada a medicamentos (MRONJ). A ozonioterapia (OZT), é um tratamento baseado na molécula de ozônio (O₃) e sua ação oxidativa e bioestimulante, tem atuação comprovada para diversas condições de saúde-doença. **Objetivo:** Avaliar a ação da OZT sistêmica, via insuflação retal, em ratos submetidos a indução de MRONJ, por análise clínica e histopatológica. **Métodos:** 44 ratos albinos *Wistar*, divididos em 4 grupos que receberam BF e OZT combinados ou isoladamente foram comparados aos grupos controle, sem medicação e sem terapia. Cada grupo teve como controle interno, o lado da mandíbula sem exodontia. A osteonecrose foi induzida com a injeção intraperitoneal de Ácido Zoledrônico (AZ), ZOMETA® 4 mg/ 100 ml, Novartis, na dose de 66 µg/kg de peso, por oito semanas. A exodontia do primeiro molar inferior esquerdo foi realizada na quarta semana de administração da droga. A OZT foi realizada por insuflação de gás ozonizado na concentração 20 µg/ml com volume de 5 ml, via retal, duas vezes por semana, iniciando na semana anterior à primeira dose de AZ e seguindo até o fim do período da medicação. Foi realizada eutanásia de todos os animais no mesmo momento, 8 semanas após a exodontia. As peças foram inspecionadas clinicamente e depois processadas e coradas em HE. **Resultados:** Nos grupos experimentais (ZOZ e ZST) as alterações foram encontradas apenas no lado onde foi realizada exodontia. As alterações observadas foram osteonecrose e sequestros ósseos, além de necrose pulpar do segundo molar e lacunas vazias no cimento celular. Nos grupos controle (COZ e CST) não houve osteonecrose. No entanto, no lado em que foi realizada a exodontia foram encontradas necrose pulpar do segundo molar e lacunas vazias no cimento celular. **Conclusão:** Não foi observada diferença no padrão de necrose entre os grupos experimentais (ZOZ e ZST), assim, a OZT não demonstrou efeito preventivo ou curativo na MRONJ. Nos quatros grupos, experimentais e controles, no lado da exodontia, houve necrose pulpar necrose do cimento no dente contíguo.

Palavras-chave: Osteonecrose associada a medicamentos; Ozonioterapia; Modelo animal.

ABSTRACT

Introduction: Bisphosphonates (BF) are successful drugs for antireabsorption therapy in diseases such as osteoporosis and bone metastases of malignant tumors. As an adverse effect, BF are associated with bone osteonecrosis, now called Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ). Ozone therapy (OZT), is a treatment based on the ozone molecule (O₃) and its oxidative and biostimulating action, has proven performance for various health-disease conditions. **Objective:** To evaluate the systemic OZT action, via rectal insufflation, in rats submitted to MRONJ induction, by clinical and histopathological analysis. **Methods:** 44 Wistar albino rats, divided into 4 groups receiving bisphosphonates, combined or alone, were compared to the control groups, without medication and without OZT. Each group had internal control, the side of the jaw without dental extraction. Osteonecrosis was induced by intraperitoneal injection of Zoledronic Acid (ZA), ZOMETA® 4 mg / 100 ml, Novartis, at a dose of 66 µg/kg of body weight for eight weeks. The dental extraction of the lower left first molar was performed in the fourth week of drug administration. OZT was performed by injecting ozonated gas at the 20 µg / ml volume 5 ml rectally twice weekly, starting the week before the first dose of ZA and continuing until the end of the medication period. All animals were euthanized at the same time, 8 weeks after the dental extraction. The pieces were clinically inspected and then processed and stained in HE. **Results:** In the experimental groups (ZOZ and ZST) the alterations were only found on the side where the extraction was performed. The alterations observed were osteonecrosis and bone sequestration, as well as pulp necrosis of the second molar and empty lacunae in the cellular cementum. In the control groups (COZ and CST) there was no osteonecrosis. However, in the side where the exodontia was performed, pulp necrosis of the second molar and empty lacunae in the cellular cementum were found. **Conclusion:** There was no difference in the necrosis pattern between the experimental groups (ZOZ and ZST), thus, ozone therapy did not demonstrate a preventive or curative effect on MRONJ. In the four groups, experimental and controls, on the side of the exodontia, there was necrosis pulp necrosis of the cementum in the contiguous tooth.

Key-words: Medication-related osteonecrosis of the jaw; Ozone therapy; Animal model.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 BIOLOGIA ÓSSEA	9
1.2 BISFOSFONATOS	11
1.2.1 Histórico	11
1.2.2 Estrutura química dos BF e mecanismos de ação	12
1.2.3 Farmacologia dos BF	13
1.2.4 BF e Câncer	14
1.2.5 Efeitos Adversos	14
1.2.6 Osteonecrose Associada ao Uso de BF	15
1.3 OZONIOTERAPIA	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVOS GERAIS	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. MÉTODOS	21
3.1 AMOSTRA E ALOJAMENTO.....	21
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	21
3.3 OZONIOTERAPIA	22
3.4 EXODONTIAS	22
3.5 EXAMES CLÍNICOS	25
3.6 EUTANÁSIA.....	25
3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	27
4. LINHA DO TEMPO DO ESTUDO	28
5. RESULTADOS	29
5.1 PERDAS	29
5.2 ANÁLISE CLÍNICA.....	29
5.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	30
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	51
8. REFERÊNCIAS	52
9. ANEXO	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOLOGIA ÓSSEA

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado, exerce uma série de importantes funções como locomoção, suporte e proteção de tecidos moles, fonte de cálcio e fosfato e abriga a medula óssea. É tecido dinâmico, apresenta constante remodelação, ou seja, formação e reabsorção, processo importante para crescimento, reparo de lesões, adaptação além de homeostase do cálcio. A biologia óssea é orquestrada basicamente por quatro células, osteoblastos, células do perióstio, osteócitos e osteoclastos (1,2).

Os osteoblastos são células cuboidais que se dispõem ao longo da superfície responsáveis pela formação óssea, são sintetizadoras de proteínas, possuem rico retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi proeminente, que secretam matriz orgânica osteóide que se mineraliza e formará o tecido ósseo (3;4). Osteoblastos em fase madura se dispõem ao decorrer da superfície óssea, formando um revestimento, com formato achatado e citoplasma estende-se sobre a superfície óssea, e pouco retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi são encontrados, onde nem secreção nem reabsorção óssea ocorre. Algumas dessas células apresentam processos que penetram em canalículos e há ligação entre os osteócitos. As células do perióstio podem diferenciar-se em osteoblastos formadores de matriz óssea, dependendo da demanda e estado fisiológico (5, apud Miller 1989)

Os osteócitos formam a maior parte das células ósseas, com tempo de vida de aproximadamente 25 anos (6), diferentemente dos osteoblastos e osteoclastos que são definidos de acordo com suas funções de formação e reabsorção óssea, essas células foram definidas por décadas de acordo com a sua localização, com o avanço da tecnologia, onde pode-se isolar a célula (7). Encontram-se dentro de lacunas rodeados de tecido ósseo mineralizado, de morfologia dendrítica (6,8). Descrito como osteoblasto diferenciado, que a medida que secretam matriz óssea, ficam incorporados dentro da mesma. O número de organelas sintetizadoras e excretoras de proteínas é reduzidas, a relação núcleo-citoplasma aumenta. A célula possui processos que se projetam dentro do tecido ósseo, através de canalículos que se comunicam com as lacunas, formando o sistema lacunocanalicular que, interligado a

outros sistemas, distribuem oxigênio e suprimentos nutricionais. Além disso, a apoptose de osteócitos é um sinal para reabsorção óssea pelos osteoclastos (3,9).

Tem sido descrito a função do osteócito na biologia óssea, a carga mecânica estimula a célula a produzir fatores que exercem ação anabólica, como prostaglandina 2 (PGE2), prostaciclina (PGI2), óxido nítrico (NO), e fatores de crescimento de insulina 1 (IGF-1). Por outro lado, a descarga óssea regula negativamente fatores anabólicos e estimula osteócitos a produzir esclerosina e Dickkopf-1 (DKK-1), que são inibidores da ação dos osteoblastos, assim como fator específico que estimula a osteoclastogênese local (10-17).

Os osteoclastos são células diferenciadas multinucleadas, originadas de células hematopoiéticas que se diferenciam por diversos sinalizadores, dentre eles, fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), secretado por progenitores ósseos e osteoblastos, ligante de ativador de receptor do fator kappa-B nuclear (RANKL), secretado por osteoblastos e osteócitos (18). Por outro lado, outro fator denominado osteoprotegerina (OPG), que é secretada por várias células, incluindo, osteoblastos, células mesenquimais e fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal, liga-se ao RANKL, inibindo a interação RANK/RANKL e consequentemente a diferenciação de osteoclastos (19).

Além disso, há evidências que os osteoclastos desenvolvem diversas outras funções, como produção de fatores denominados “clastocinas”, que controlam a ação de osteoblastos durante o ciclo de remodelação óssea. Outra ação discutida é sobre a regulação de células tronco hematopoiéticas. Tais evidências mostram que a célula não apenas age sobre a reabsorção óssea, como também é fonte de citocinas que influenciam a atividade de outras células (20)

A matriz óssea constitui uma complexa e organizada estrutura o que fornece suporte e exerce papel essencial na homeostase óssea. Tendo em vista que apenas a perda de massa óssea é insuficiente como causa de fraturas ósseas (21), o tecido é capaz de liberar moléculas que interferem na atividade das células ósseas e, consequentemente, participam da remodelação óssea (22). o colágeno apresenta importante função na estrutura e função do tecido (23).

O microambiente do tecido ósseo fornece um local atrativo para metástases, pois é uma rica fonte de fatores de crescimento e interações entre o osso e células

neoplásicas, resultando em um chamado “ciclo vicioso da metástase óssea”, onde há um aumento da reabsorção induzida pelas células cancerosas que desencadeiam a liberação de fatores de crescimento e crescimento tumoral (24). Processo que pode ser modificado e melhorado com o uso de substâncias que inibem a destruição óssea como os Bisfosfonatos, tal habilidade, além de reduzir a carga tumoral no osso, desenvolvida em estudos pré-clínicos, o que levou ao desenvolvimento de estudos que examinaram os benefícios em potencial na terapia precoce ou adjuvante para reduzir ou retardar metástases ósseas de neoplasias malignas (25).

1.2 BISFOSFONATOS

1.2.1 Histórico

Os Bisfosfonatos (BF) são fármacos análogos sintéticos dos pirofosfatos, moléculas inibidoras de calcificação ectópica, encontrados no plasma, urina e saliva. Inicialmente chamados de Difosfonatos, desenvolvidos e estudados como inibidor fisiológico de calcificação em tecidos moles, como aorta e rins, e regulador da homeostase do cálcio. Relata-se que os primeiros pirofosfatos sintéticos foram sintetizados nos anos 1800, porém, apenas nos últimos 40 anos tem sido usado em distúrbios do metabolismo do cálcio. Foram primeiramente usados como inibidores de corrosão, agentes na indústria têxtil e fertilizantes óleo industrial. Nomeados como “amaciantes de água” (“*water softeners*”) pois tinha a capacidade de capturar o cálcio presente na água e a habilidade de inibir a precipitação de carbonato de cálcio (26).

Devido seu efeito na formação e destruição de tecidos mineralizados sugeriu-se seu uso em doenças ósseas por falência renal (27). Estudos primários realizados *in vitro* mostraram o retardo da dissolução de cristais de hidroxiapatita e no mesmo estudo, sua ação *in vivo* mostrou inibição da reabsorção óssea em ratos, sugerindo a prevenção de osteoporose (28,29). A partir de estudos como esses, os medicamentos à base de difosfonatos e pirofosfatos foram amplamente estudados e utilizados em doenças ósseas.

Chapuy, Meunier, Alexandre e Vignon et al. (30) descreveram o uso da medicação para hipercalcemia causada por reabsorção óssea devida a metástase de tumores malignos, anteriormente, os mesmos autores descreveram o uso da medicação na Doença de Paget (31). Em 1986, Pollard e Luckert, estudaram o uso

da associação de Diclorometano Difosfonato e Piroxicam em metástases de neoplasia de próstata em ratos, controlando o crescimento tumoral e destruição óssea (32).

O termo Bisfosfonato foi inicialmente usado em estudos preliminares que evidenciaram a redução da hipercalcemia em pacientes com metástases ósseas, indicando que a droga poderia controlar a osteólise causada por essa condição (33).

Com o desenvolvimento de novos fármacos da classe, com superioridade quando comparados a quimioterapia, hormonioterapia ou placebo (25,34)

1.2.2 Estrutura química dos BF e mecanismos de ação

Os BF são análogos sintéticos dos Pirofosfatos, onde um átomo de oxigênio é substituído por um de carbono ligado a dois grupos fosfatos (P-C-P). Tal estrutura é ligado a duas cadeias radicais, que variam de acordo com as diferentes drogas da classe. A estabilidade química, resistência enzimática ou hidrólise ácida gerada pela substituição do átomo de oxigênio pelo de carbono dá a molécula resistência a degradação biológica (26)

A afinidade aos cristais de hidroxiapatita e a coordenação entre os grupos fosfatos e os íons de cálcio dá aos BF alta especificidade ao tecido ósseo. A alta concentração de cálcio e fósforo na estrutura supramolecular do tecido ósseo, são características únicas que criam um sítio alvo para uma ligação específica com os BF. A exposição de cristais de hidroxiapatita durante a remodelação óssea aumenta a capacidade de drogas específicas para tecidos mineralizados a localizar áreas com alto *turn-over* associado a doença. Drogas como os BF tem como vantagem a uma ligação forte e específica a tais tecidos por tais características (35).

A capacidade de ligação aos cristais de hidroxiapatita é permitida e varia de acordo com as estruturas das cadeias laterais, que variam de acordo com o BF, a presença de hidroxila nas cadeias aumenta a afinidade da molécula ao cálcio devido a habilidade de quelação dos íons de cálcio (26)

As variadas moléculas de BF são caracterizadas pelas cadeias laterais, e tem sido estudadas de acordo com a necessidade de ligação e afinidade aos cristais de hidroxiapatita (37)

Os BF não nitrogenados induzem a apoptose, via conversão anabólica da molécula em análogo da adenosina tri-fosfato (ATP), interrompendo inúmeras vias ATP-dependentes. Os BF nitrogenados inibem a farnesil pirofosfato sintase (FPPS), que é essencial para a criação de FPP nas vias do mevalonato. Essa via é essencial para prenilação, e então localização de GTPases na célula, necessária para o tráfego de proteínas e funcionamento normal da célula (37).

Os BF inibem a reabsorção óssea por apoptose dos osteoclastos. A molécula é interiorizada pelas células, por meio de endocitose, durante a reabsorção óssea juntamente com cálcio e outros produtos da degradação óssea. Contraditoriamente, é descrito que os BF podem prolongar a vida dos osteoclastos e retardar a apoptose aumentando o número de células e formação de células gigantes multinucleadas, porém, apesar da maior contagem dessas células, há a diminuição de biomarcadores e aumento da densidade óssea (38).

1.2.3 Farmacologia dos BF

Podem ser administrados tanto oralmente quanto intravenosa, são pouco absorvidos em humanos, por apresentaram pouca biodisponibilidade nas formas orais, a maioria é apresentada na forma intravenosa (39).

Os BF não são metabolizados em subprodutos ativos, e derivados da droga não são encontrados na urina, sua transformação acontece intracelular, em derivados de ATP, como mostrado anteriormente. Sua biodisponibilidade em forma oral é extremamente baixa, caracteristicamente abaixo de 1% para a maioria, podendo chegar acima de 4% em poucos (26).

O mecanismo de absorção intestinal é por meio de transporte paracelular, os BF são moléculas altamente carregadas, e moléculas transporadoras não foram descritas. A absorção é reforçada por EDTA, efeito atribuído a quelação de cálcio, o que abre as junções entre as células da mucosa intestinal (40).

São conhecidos por serem potencialmente tóxicos aos rins, principal via de eliminação da droga (26).

1.2.4 BF e Câncer

Os BF foram utilizados, primeramente, em doenças ósseas, como osteoporose e Doença de Paget, aumentando a densidade óssea e reduzindo, em aproximadamente 40%, fraturas patológicas de quadril vertebrais e não-vertebrais, com poucos efeitos adversos (26).

Começou a ser utilizado como adjuvante no tratamento de doença óssea associada a câncer, reduzindo dores e complicações ósseas, primeiramente em casos de Mieloma Múltiplo (41,42,43). Além de redução de dores e complicações ósseas, é usado como terapêutica para metástases ósseas de diversas neoplasias malignas, inclusive na redução do tumor em alguns casos (35).

1.2.5 Efeitos Adversos

Mesmo com a inibição das vias ATP-dependentes, os BF não são metabolizados e apresentam relativa segurança e poucos efeitos adversos, em adição, a ligação específica, ação em osteoclastos e mecanismos antirreabsortivos, as terapias com BF estimularam diversos usos e terapias clínicas (26).

A alta especificidade e íntima ligação ao tecido ósseo demonstra que a molécula se mantém aderida ao tecido, é discutido o efeito em altas doses e uso contínuo a longo prazo, porém, desde que não haja efeito de absorção óssea, a molécula permanece inativa, isso sugere que dentro de uma faixa terapêutica, existe um pequeno risco de diminuição do *turn-over* ósseo, o que poderia levar a uma maior fragilidade (26). É importante demonstrar que a dose total de administração da droga é fator determinante para seus efeitos. Estudos com uso de Ibandronato (44) e Zolendronato (45), em ambos os casos o mesmo nível de inibição de reabsorção óssea foram documentadas, desde que seja em baixa frequência e dose.

Outro efeito descrito para BF nitrogenados é uma resposta aguda, induzindo febre baixa transitória e ocorre predominantemente a primeira exposição as drogas, especialmente em via intravenosa, devido a liberação de citocinas pró-inflamatórias (46).

1.2.6 Osteonecrose Associada ao Uso de BF

Como mostrado anteriormente, estas drogas são bem toleradas, dificilmente induzem efeitos clínicos adversos significativos, sendo mais comuns sintomas gastrointestinais para BF orais, creatinina sérica elevada, febre baixa transitória, artralgias e aumento da dor óssea no caso das drogas injetáveis. Além da redução do aparecimento de metástases de osso, os benefícios do uso dessas drogas são prevenção de fraturas patológicas, redução da dor, melhora da qualidade de vida (47).

Entretanto, torna-se cada vez mais frequente, a descrição de necrose dos osses como complicações potencialmente graves do uso prolongado de BF. Marx em 2003, em uma carta ao editor alertou sobre osteonecrose (ON) em mandíbula e maxila em pacientes que fizeram uso de Pamidronato e Zolendronato, tendo como primeiro relato associando os medicamentos com tal condição, e publicando posteriormente, em 2005, uma série de casos relatando tais condições. (48,49)

Foi primeiramente descrita, pela *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR), como BRONJ, sigla em inglês *Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw*. Caracterizada como “Área de exposição óssea em região maxilofacial, que não se cura em até 8 semanas, depois de identificada pela equipe de saúde, em paciente que recebeu ou foi exposto a BF e, que não tenha recebido radiação na região”. A Academia Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais (AAOMS) em 2014 atualizou a definição, relacionando-a com medicações antirreabsortivas como Denosumabe ou antiangiogênicos e, associando fístula intra ou extra-oral, além de não haver histórico de radiação nem metástase óssea na região, dando outra denominação à condição: *Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw* (MRONJ). Acrescenta-se também a descrição, presença ou não de úlcera, intra ou extra-oral, e de sequestro ósseo (47).

Não é conhecido o mecanismo pelo qual tais drogas causam MRONJ, mas é evidente seu papel na indução de alterações na remodelação óssea fisiológica, o osso torna-se hipovascularizado e hipocelular e hipóxico (50). Enquanto que outro estudo demonstrou evidências do papel da inflamação local na iniciação da ON, ligando sinais clínicos de extensão da ON ao número de células inflamatórias (51). O medicamento inibe a proliferação de células da mucosa bucal e alteram o processo de reparo (52).

Hipóteses propostas que tentam explicar a localização mais frequente de MRONJ a maxila e mandíbula, incluindo características de remodelação óssea alterada, inibição de angiogênese, microtraumas constante, a supressão da imunidade inata ou adquirida, toxicidade do tecido mole aos BF, inflamação ou infecção. A condição pode ocorrer espontaneamente, na presença de doença periodontal ou após um trauma, como uma exodontia, por exemplo (46).

Inflamação ou infecção tem sido considerada um componente importante de MRONJ. Estudos anteriores identificaram bactérias, especialmente espécies de *Actinomyces*, em biópsias de osso necrótico removidos de pacientes com MRONJ (53). A presença de bactérias levou estudos a avaliarem a possibilidade de um biofilme complexo em osso exposto (54). Estudos têm identificado em associação com bactérias fungos e vírus, o que pode requerer terapias mais sofisticadas para combater o multibiofilme associado a ON (55). A variação do pH resulta em ação sobre o crescimento e atividade de osteoclastos tratados com BF, avaliado em cultura com discos de dentina, a contagem de osteoclastos foi significativamente reduzida pelo tratamento com Zoledronato Alendronato ao pH 7.0, mostrando que as medicações em doses terapêuticas tem efeito adverso na viabilidade e atividade reabsortiva de osteoclastos quando o pH local é reduzido, esses achados sugerem que a infecção local, como em infecções periodontais, periapicais e peri-implatares, pode ser um fator chave na cascata de desenvolvimento da MRONJ (56).

A incidência de MRONJ é maior em pacientes oncológicos, que usam altas e frequentes doses de BF de 1 a 15%, na população com osteoporose, a incidência relatada é de 0,001 a 0,01%, enquanto na população geral é menor que 0,001% (49).

Diversos foram os tratamentos preconizados para a condição, mas os mais descritos são o controle sistêmico de dor e infecção e tratamentos cirúrgicos, como desbridamento ou ressecção do osso necrótico dependendo do estágio da MRONJ (46). São descritos como tratamentos auxiliares a Oxigenoterapia hiperbárica (57), concentrado autólogo de plaquetas (58) e ozonioterapia (59).

A MRONJ, apesar de não ser frequente, mostra-se como importante evento adverso do uso de BF. O Cirurgião-Dentista, como parte de equipe multiprofissional, tem o papel importante na prevenção da condição, como ações de cuidados odontológicos e na manutenção do cuidado com a higiene e consequentemente,

saúde bucal, além de mostrar-se capaz para o controle da doença, minimizando a dor e desconforto. (60)

1.3 OZONIOTERAPIA

O Ozônio (O₃) é um gás encontrado naturalmente na atmosfera, como produto de poluição atmosférica e radiação solar, composto por três átomos de oxigênio, enquanto a molécula de oxigênio, mais estável, é composta por dois átomos (61). Martin Van Maurum (1750-1837) descreveu O₃ como “um cheiro de material elétrico”, e o primeiro relato de O₃ foi com Homero no século IX a.C. quando relatou odor de remanescente de enxofre dos raios de Zeus. É um gás altamente instável que se decompõe em oxigênio a temperatura ambiente, tem coloração azul em sua forma líquida, com ponto de ebulição -111,9°C (62)

Descoberto por Schoenbein em 1834, enquanto trabalhava com correntes voltaicas, notou a formação de um gás descrito como "cheiro elétrico e pungente", batizando-o de *ozein*, referente ao verbo grego “cheirar”, que poderia ser um “oxigênio super-reativo”, relatava não somente como um poderoso oxidante, mas também desinfetante. É obtido artificialmente através de descarga elétrica ao oxigênio, também é descrita a obtenção por radiação UV (62,63).

Pelas suas características altamente reativas, foi amplamente utilizado na indústria, tratamento de água para consumo humano ou aquicultura, com o avanço no desenvolvimento de geradores de O₃, sua aplicabilidade ficou ainda maior, sendo também usado na conservação e estocagem de alimentos (64,63,65,66).

Foi primeiramente usado na atenção à saúde em 1856 para desinfecção de centros cirúrgicos e esterilização de instrumentais. Um dos primeiros relatos de uso médico foi para o tratamento de feridas gangrenosas durante a Primeira Guerra Mundial, foi usado com boa resolutividade para a desinfecção de água. Wehrli e Steinbarth em 1954 foram os primeiros a descreverem a exposição de oxigênio combinado com irradiação ultravioleta ao sangue humano, porém, Wolf em 1974, desenvolveu uma técnica simples de exposição do sangue a mistura de oxigênio-ozônio, nascendo a Auto-hemoterapia ozonizada. O uso médico ficou muito tempo descreditado e até proibido, devido ao uso indiscriminado e técnicas sem comprovação, feitos por pessoas sem embasamento e de forma clandestina,

passando a ter seu estudo aprofundado e ampliado ao final do século XX. A ideia de uso em tratamento médico foi estimulada pela falta de antimicrobianos e pela capacidade desinfetante do O₃. No entanto um dentista suíço, EA Fisch, foi o primeiro a usar em sua prática, tratando pulpíte gangrenosa, estimulando a publicação de seus resultados (61,63).

Desde então a Ozonioterapia (OZT) é descrita como tratamento para diversas condições, como em doenças arteriais periféricas complicadas por úlceras crônicas, como diabetes (67), necroses ósseas, osteomielite refratária (58) e fascíte necrotizante (68) por exemplo.

A OZT tem mostrado aumento dos benefícios dos tratamentos cirúrgicos e farmacológicos de ON quando administrada como um gás antes e após o tratamento odontológico em pacientes com Mieloma Múltiplo que desenvolveram tal efeito durante o tratamento com BF (69). Zanardi et al (70), mostraram bons e promissores resultados no tratamento de feridas cutâneas e mucosas infectadas com óleo ozonizado, desenvolvendo cura rápida de tais lesões. Ripamonti et al(59) observaram bons resultados do uso tópico de óleo ozonizado para o tratamento de necroses ósseas associadas a medicações. Em baixas concentrações apresenta propriedades de reparação tecidual e, em altas, bactericida (61).

O termo “pré-condicionamento” com O₃ refere-se à administração de doses atóxicas e repetidas do gás ozonizado, que proporciona uma adaptação ao *stress* oxidativo, que é um dos processos iniciadores das necroses ósseas. A adaptação ocorre através da indução de enzimas ou por ativação de vias metabólicas que mantêm um equilíbrio, tais como a indução da enzima superóxido dismutase (SOD), aumento de níveis de glutathione (GSH) e redução da peroxidação (71).

O desequilíbrio entre a presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a habilidade do organismo de remover essas próxidos reativos e radicais livres, tem sido reportadas em pacientes com câncer em sua maioria em estados avançados e metastáticos, assim como é descrito a produção de ERO na ação dos BF e no desenvolvimento de MRONJ (73-77).

Tal pré-condicionamento provou ser útil na inibição da inflamação e apoptose, e em melhorar o estado antioxidante durante a isquemia / reperfusão e nefrotoxicidade induzida pela cisplatina (78)

Em ensaio laboratorial com ratos, desenvolvido por Frascino et al (79), verificou-se a ação da água ozonizada no processo de reparo ósseo em ratos hiperglicêmicos, e concluíram que, independentemente do nível glicêmico dos ratos, a terapia aumentou o número de vasos sanguíneos e o recrutamento de osteoclastos no local de reparo. Em estudo laboratorial onde foram extraídos incisivos centrais de ratos, e estes foram submetidos a OZT sistêmica e tópica, os resultados mostraram reparo pós-operatório acelerado em relação ao grupo controle que não recebeu a terapia (80).

Diante da potencial de gravidade da MRONJ e pela escassez de formas de tratamento ou prevenção e poucos estudos laboratoriais em modelo animal associando formas de tratamento e prevenção de MRONJ, o presente trabalho tem objetivo de estudar a ação da OZT sistêmica em ratos submetidos a terapia com BF.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a ação de OZT sistêmica em ON induzida por BF (AZ), em modelo animal experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da administração de BF em mandíbula de ratos;
- Avaliar um modelo animal de ON por AZ;
- Avaliar os possíveis efeitos profiláticos do condicionamento oxidativo da OZT previamente ao desenvolvimento de ON;
- Analisar, clinicamente e prospectivamente, o comportamento dos tecidos bucais após a terapia medicamentosa e OZT
- Comparar, por meio de análise histopatológica, as características morfológicas do tecido ósseo mandibular após a exposição ao AZ e OZT

3. MÉTODOS

Este estudo laboratorial em modelo animal experimental foi aprovado pelo Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB), Protocolo n.º 34/2017.

3.1 AMOSTRA E ALOJAMENTO

A amostra deste estudo foi composta por 44 animais, *Rattus norvegicus albinus* (Wistar), machos, com idade de aproximadamente 60 dias e peso de médio de 240g. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal de Goiás e, durante o experimento, mantidos no Biotério de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e climatizados por doze dias antes do início do experimento. Os animais foram distribuídos, de forma aleatória simples, em 4 ou 3 animais, de forma que cada subgrupo contenha 11 ratos, por caixas de polipropileno com tampa zincada, mantidos em ciclo *claro/escuro* de 12h, em temperatura média de $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e com acesso à ração e água *ad libitum*.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os 44 ratos foram divididos em dois grupos com 22 animais cada: Grupo AZ (Z) e Grupo Controle (C), e cada um subdividido em dois subgrupos com 11 animais cada, onde um foi testado Ozonioterapia (OZ) e outro não recebeu tratamento (ST), conforme a tabela demonstrativa.

Tabela 1- Distribuição dos ratos e grupos

	Ác. Zoledrônico (22)	Controle Soro Fisiol. (SF) (22)	44 ratos
<i>Ozonioterapia</i>	(G1) ZOZ 11 ratos	(G3) COZ 11 ratos	
<i>Sem tratamento</i>	(G2) ZST 11 ratos	(G4) CST 11 ratos	

Os animais dos Grupos ZOZ e ZST foram submetidos a terapia com AZ (ZOMETÁ® 4 mg/ 100 ml, Novartis), via injeção intraperitoneal, na dose de 66 µg/kg de peso do animal, uma vez por semana, por 8 semanas. Já os Grupos Controle, COZ e CST submetido apenas a injeção de soro fisiológico, via intraperitoneal, com volume semelhante ao aplicado de AZ. Foram extraídos o primeiro molar inferior esquerdo de

todos os animais, na quarta semana de terapia medicamentosa, como fator traumático iniciador da ON. Esse protocolo foi adotado e adaptado de Zandi et al (81).

3.3 OZONIOTERAPIA

Foi avaliada a possível ação da OZT sobre o condicionamento oxidativo, a terapia foi administrada previamente ao surgimento da MRONJ e durante o provável desenvolvimento da condição.

Após o período de 13 dias de adaptação dos animais ao biotério, foi iniciada a OZT, Grupos ZOZ e COZ, por aplicação da mistura gasosa de Oxigênio/Ozônio (O₂/O₃), via insuflação retal, conforme metodologia utilizada por Fernandez et al (82), na concentração de 20 µg/ml e volume 5 ml, duas vezes por semana, durante nove semanas, iniciando na semana anterior do início da administração de AZ ou soro fisiológico e seguindo concomitante a medicação a fim de avaliar possíveis efeitos profiláticos.

A mistura gasosa de O₂/O₃, obtida por meio de gerador de O₃ medicinal Philozon, modelo MedPlus (Registro na Anvisa 80472910001), produzida a partir de oxigênio medicinal (99,5% de pureza), com pressão de entrada estabilizada.

Imediatamente após a obtenção de volume de 5 ml da mistura gasosa, que foi colhida por intermédio de seringa plástica tipo Luer siliconizada e feita insuflação retal, por meio da utilização cânula de aspiração de silicone, a qual será inserida aproximadamente 4,0 cm no reto do animal com auxílio de gel lubrificante.

3.4 EXODONTIAS

Coincidindo com a quarta administração de AZ, todos os ratos foram submetidos a extração do primeiro molar inferior esquerdo. Após sedação e anestesia dos ratos com cloridrato de Ketamina 10% e com Xylazina 2% (doses de 75 mg/kg e 10mg/kg respectivamente) via intraperitoneal. Os animais mantidos sob decúbito dorsal na mesa operatória e seus membros imobilizados com fita adesiva, a boca dos animais foi aberta com auxílio de fio ortodôntico de aço, adaptados nos incisivos e a língua afastada com fio de sutura de nylon 4-0. Após antissepsia extra oral com Clorexidina 4% não alcóolica e intraoral com Clorexidina 0,12% também não alcóolica, o dente foi luxado, com movimentos méso-distal e oclusal, com o instrumental

Hollembach 3S ou cureta de Molt e removido do alvéolo com pinça hemostática, seguido por inspeção visual e sutura simples do tecido mole com fio de sutura reabsorvível de Poligalactina 4-0.

Foi administrado Dipirona Sódica 500 mg na dose de 300 mg/kg via subdérmica, imediatamente as extrações, após 6 horas e por 2 injeções diárias nos dois dias seguintes.

Os procedimentos para realizar as exodontias e medicações estão ilustrados na figura 1.

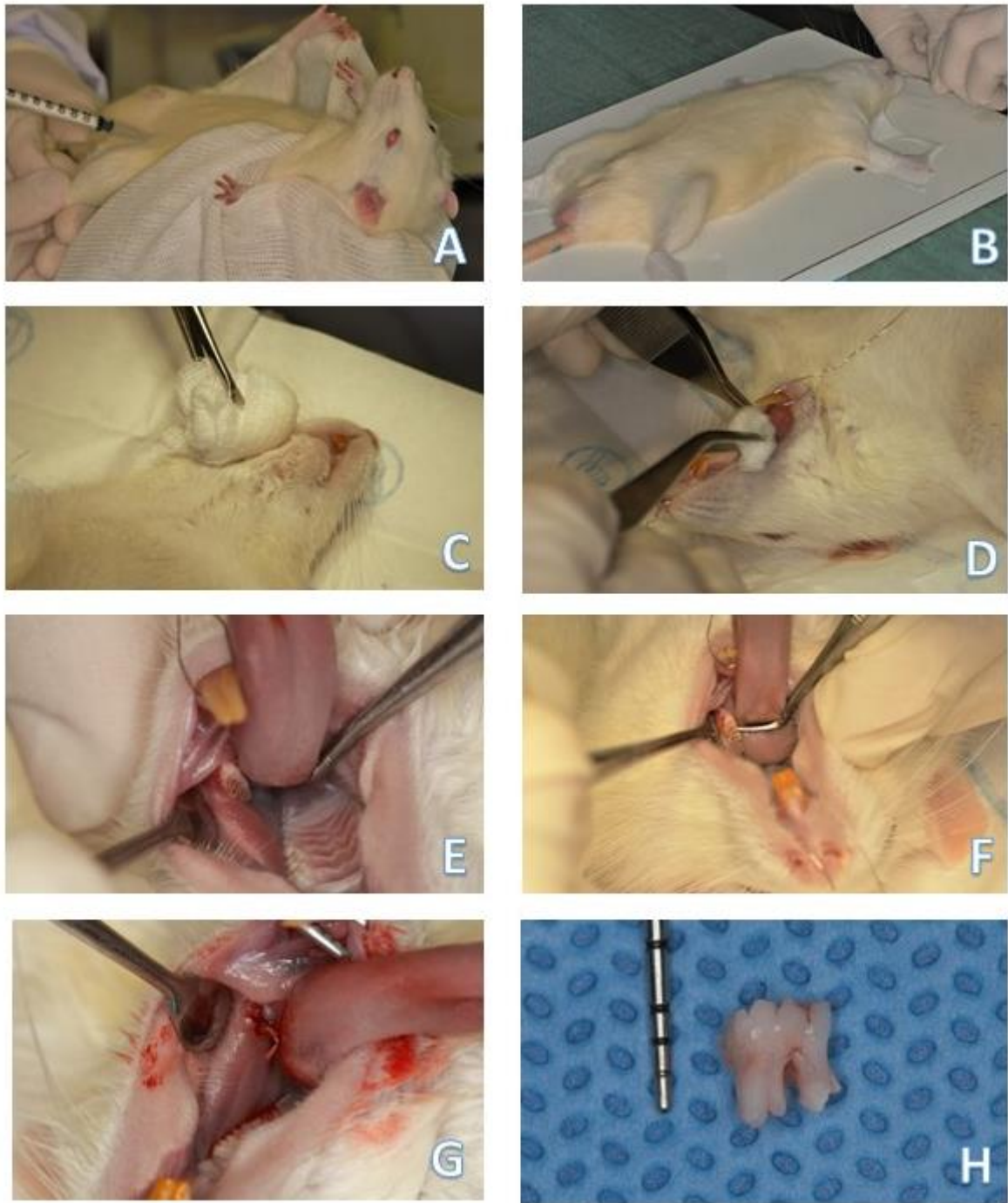


Figura 1 - Procedimento cirúrgico. (A) Anestesia. (B) Fixação do animal a mesa cirúrgica. (C) Antissepsia extraoral. (D) Antissepsia intraoral. (E) Luxação dentária. (F) Sutura do tecido mole gengival. (G) Detalhe do dente removido.

3.5 EXAMES CLÍNICOS

Durante a evolução clínica foram realizados exames físicos rotineiros dos animais, observando os possíveis sinais clínicos de ON como fístula extra oral, além de sinais de perda de peso, comportamento, estado geral, mudança de coloração de mucosas e perda de pelos.

3.6 EUTANÁSIA

Todos os animais, foram submetidos à eutanásia por hipóxia em câmara de gás carbônico 8 semanas após a exodontia coincidindo com 4 semanas após a última administração do BF, no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As cabeças foram guilhotinadas, as mandíbulas serão dissecadas e fixadas em solução de Formol 10% tamponado durante. Foram avaliados sinais clínicos de ON, exposição óssea e fístula.

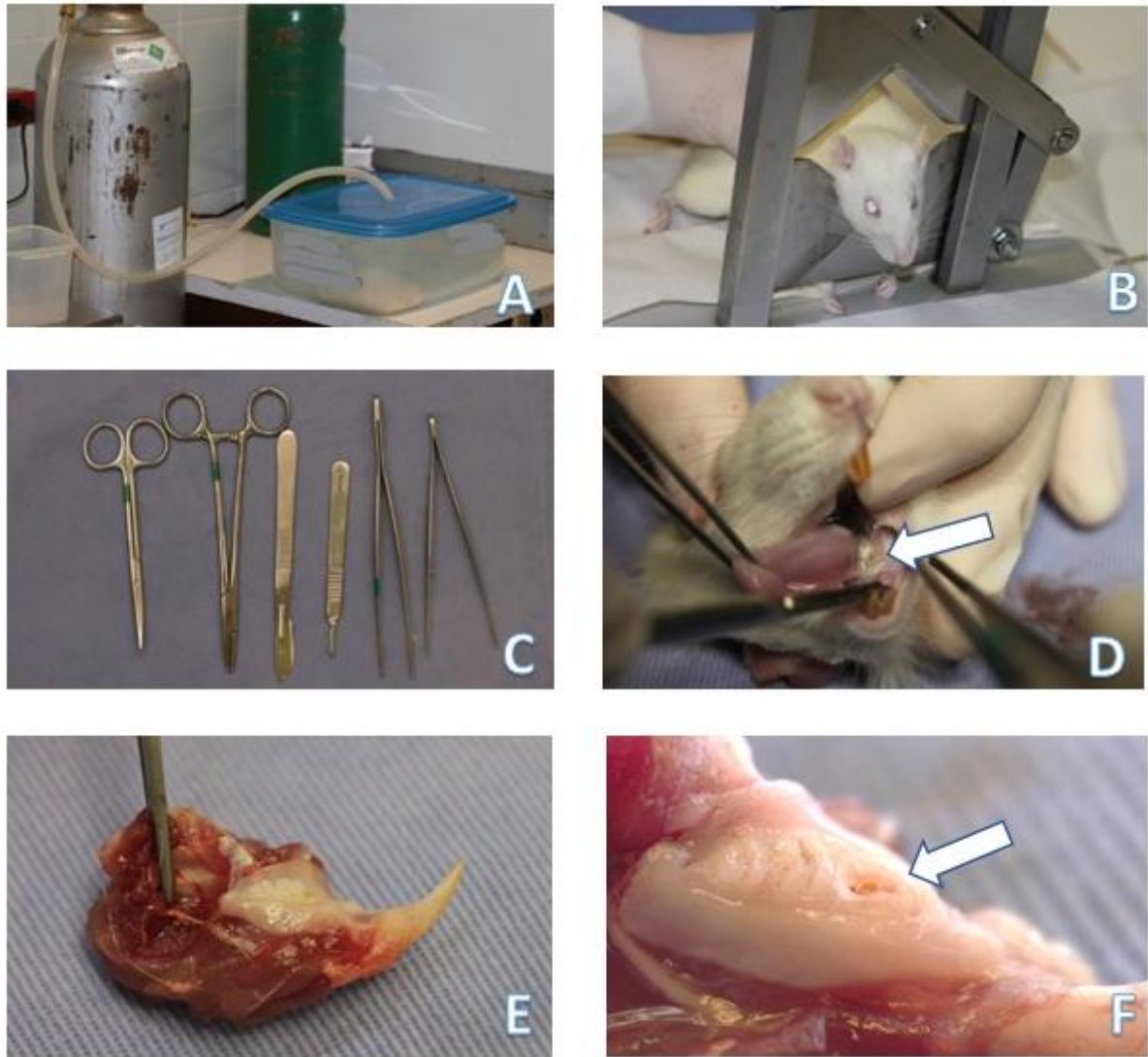


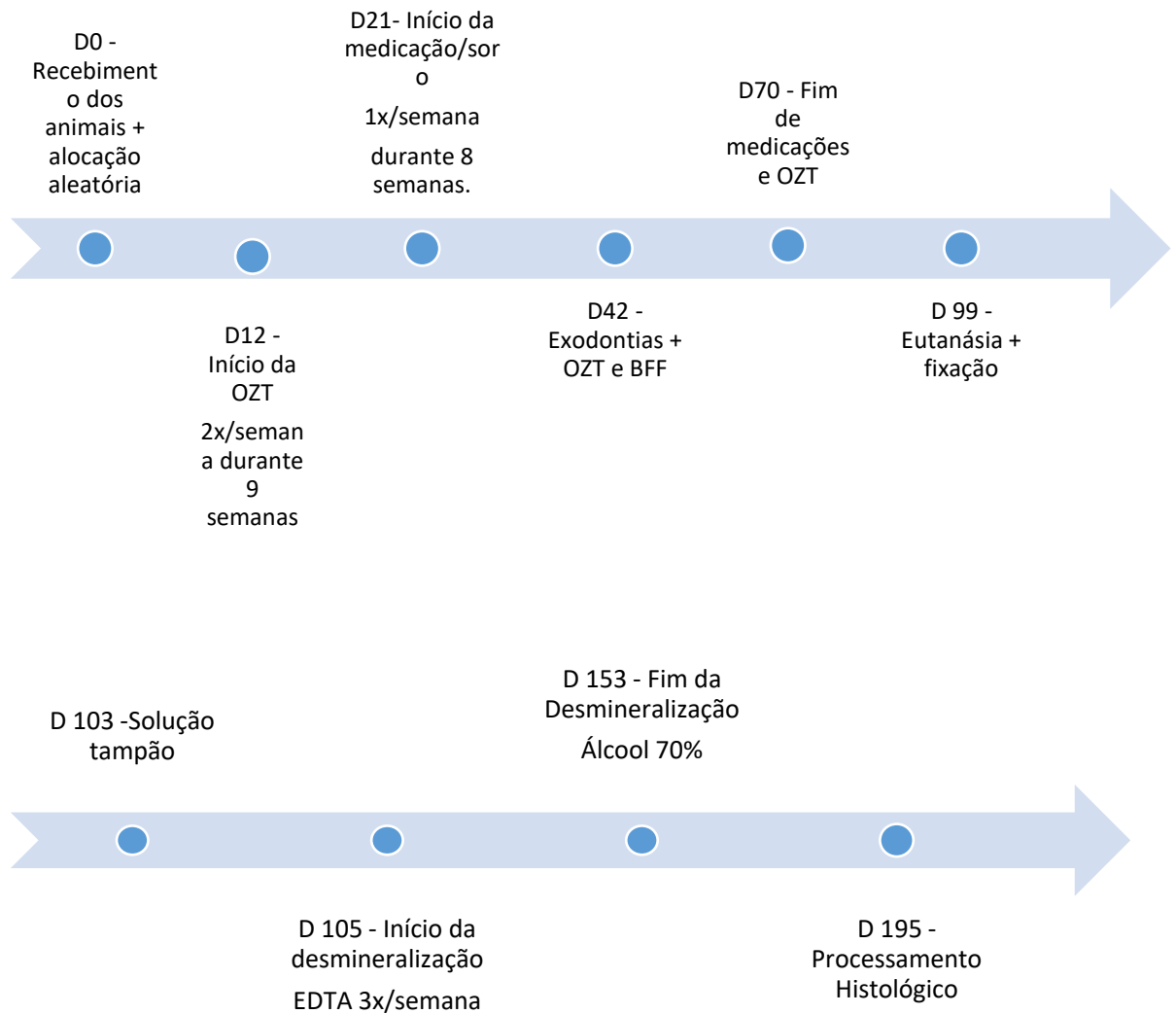
Figura 2- Eutanásia e inspeção física. (A) Câmara de CO2. (B) Guilhotina. (C) Instrumental para a dissecação da mandíbula. (D) Inspeção clínica, observa-se pequena exposição óssea associada a resto radicular (seta). (E) Mandíbula dissecada. (F) Detalhe da peça dissecada, notar pequena exposição óssea (seta branca).

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após o período de 72 horas de fixação em Formol 10% tamponado, das mandíbulas, foram removidos excessos de tecido mole, lavados com solução tampão por mais 48 horas, composta por água destilada, fosfato de sódio dibásico anidro. Após esse período foi iniciada a desmineralização da peça com solução de EDTA 4%, trocada três vezes por semana e as amostras mantidas sob agitação constante de 60 RPM e temperatura 30°C, até a desmineralização completa evidenciada em exame físico. O processo durou 48 dias. Após as peças serem desmineralizadas, e removidos os excessos de tecidos mineralizado fora da área de interesse, dentes e processo alveolar, as peças foram mantidas em álcool 70% processamento e coloração em Hematoxilina e Eosina.

Em análise histopatológica inicial, foram avaliados os seguintes achados: presença de biofilme, infiltrado inflamatório, reabsorção dentária ou cementária, reabsorção óssea, polpa dentária, células do tecido ósseo, sinais de necrose óssea, como lacunas de osteócitos vazias e formação de sequestro.

4. LINHA DO TEMPO DO ESTUDO



5. RESULTADOS

5.1 PERDAS

Durante o experimento foram perdidos 8 animais. Cinco animais eram fêmeas e foram excluídas, pois estavam em gaiolas junto com machos e teriam a possibilidade de reprodução. Houve 3 mortes de animais, uma por possível infecção de sistema auditivo e/ou neurológico, causando desorientação do animal. Duas mortes foram por complicações pós-operatórias.

Tabela 2- Distribuição de perdas

	ZOZ	ZST	COZ	CST	Total
<i>Fêmeas excluídas</i>		3	1	1	5
<i>Eutanásia por outros motivos*</i>	1				1
<i>Complicações pós-operatórias</i>	1		1		2
<i>Total de perdas</i>	2	3	2	1	8
<i>Total remanescente</i>	9	8	9	10	36

*Provável infecção do Sistema Nervoso Central

5.2 ANÁLISE CLÍNICA

Em análise clínica após a eutanásia, foram avaliados sinais de ON, como exposição óssea e fístula, além de outros achados, como resto radicular decorrente da exodontia, descritas na tabela a seguir.

Tabela 3- Distribuição de achados em exame físico no momento da eutanásia

	G1 ZOZ	G2 ZST	G3 COZ	G4 CST
<i>Exposição óssea</i>	3	0	0	0
<i>Fístula extra oral</i>	0	0	0	0
<i>Resto radicular</i>	4	4	3	3
<i>Fratura de segundo molar</i>	0	0	0	1
<i>Total</i>	7	6	3	4

O total de achados clínicos de ON, como fístula e exposição óssea foi de 3 para o grupo ZOZ e 0 para o grupo ZST, os demais grupos COZ e CST não apresentaram tais sinais. Tais exposições ósseas visualizadas no grupo ZOZ foi associada a resto radicular.

5.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

No grupo ZOZ, animais que receberam BF e OZT, ao lado esquerdo que realizou-se exodontia, foram notados os seguintes achados histopatológicos: lacunas de osteócitos vazias indicando necrose óssea em grande extensão, formação de sequestros ósseos, focos de abscesso, infiltrado inflamatório restrito às áreas em que se viam os restos radiculares, resultantes da exodontia do primeiro molar e biofilme aderido ao tecido dentário e sequestros, nas áreas de reabsorção alveolar, lacunas de Howship preenchidas com osteoclastos, osteoclastos não aderidos ao tecido ósseo. Reabsorções dentárias externas foram visualizadas em pequenas áreas de cimento, por vezes atingindo a dentina. Não foram mensuradas as áreas atingidas pela reabsorção. No dente contíguo à exodontia, o segundo molar, foram visualizadas alterações teciduais significativas, compatíveis com necrose pulpar e necrose cementária. Esta última, por questões conceituais, foi descrita como esvaziamento de cementócitos nas lacunas (cementoplastos).

No lado direito do mesmo grupo, sem extração dentária, nos cortes examinados, a análise microscópica revelou a integridade dos tecidos epiteliais e mineralizados (osso alveolar e tecidos odontogênicos), polpa dentária e cimento vitais. Discretos focos de infiltrado inflamatório mononuclear, de intensidade leve, foram observados. As reabsorções dentárias, principalmente no cimento, foram visualizadas especialmente as do tipo reparada ou inativa.

No grupo experimental com BF e sem OZT (ZST) foram encontrados padrões semelhantes ao grupo ZOZ, com adição de indicativo de reparo tecidual, tecido de granulação para o lado com exodontia. Cabe destacar que a área de tecido de granulação era muito pequena, podendo significar um achado inespecífico. De forma semelhante observou-se a integridade tecidual como nos animais do grupo ZOZ sem exodontia.

Arquétipos semelhantes foram observados nos grupos controle, COZ e CST, para as mandíbulas onde foram realizadas exodontias. Nestes cortes foram observadas necroses pulpares e cementária, discretos sinais de necrose óssea (áreas onde se encontravam três ou quatro lacunas de osteócitos vazias), infiltrado inflamatório discreto e focal, e, pequenas áreas onde se via a formação de tecido de granulação. Em pequenos e reduzidos focos havia reabsorção de cimento.

Nos lados sem extração nos grupos controle observou-se integridade dos tecidos, sem alterações de padrão da normalidade. Uma aparente maior compactação do tecido ósseo foi observada no lado sem exodontia do grupo COZ. Na polpa havia muitos vasos hiperêmicos e congestos, assim como no tecido conjuntivo periapical e em ambas os lados das mandíbulas no grupo CST. O resumo com os principais achados histopatológicos estão elencados na Tabela 4, as frequência numeradas na tabela 5, e ilustrados nas figuras 3 a 8.

Foram analisados os principais achados histopatológicos dos grupos com uso de BF e controle, sem medicação, comparando os subgrupos que receberam ou não a OZT a fim de avaliar possível efeito da terapia. Adotou-se o valor P menor que 0,05 como estatisticamente significante. Foi feito o teste exato de Fisher em virtude do tamanho dos grupos e número de variáveis. Os resultados obtidos mostram que a OZT não mostrou qualquer ação sobre o desenvolvimento de osteonecrose, inflamação ou sobre os demais tecidos, tendo em vista que nenhum valor P foi menor que 0,05. A análise estatística da ação da OZT está disposta na tabela 6.

Tabela 4- Síntese dos principais achados histopatológicos por grupo

Grupo	Resumo dos achados histopatológicos
ZOZ	Sem exodontia: integridade dos tecidos ósseo e dentários, polpas dentárias vitais, sem sinais de necrose óssea, reabsorção cementária inativa ou reparada e eventuais focos inflamatórios mononucleares.
	Com exodontia: biofilme, necrose óssea, extensas áreas com lacunas de osteócitos vazias, formação de sequestros, necrose cementária, necrose pulpar, focos de infiltrado inflamatório misto, de moderado a intenso associados aos restos radiculares, bem como os eventuais focos de abscesso e intensa reabsorção do osso alveolar.
ZST	Sem exodontia: integridade e normalidade dos tecidos ósseos e odontogênicos, e pouquíssimos focos inflamatórios mononucleares.
	Com exodontia: biofilme, necrose óssea (muitas áreas com lacunas de osteócitos vazias), formação de sequestros, necrose cementária, necrose pulpar, pequena área de abscesso pulpar, infiltrado inflamatório misto, de moderado a intenso, esparsos focos de abscesso no tecido conjuntivo contíguo à extração, osteoclastos não aderidos e intensa reabsorção do osso alveolar. Em pequenas áreas foi possível observar tecido de granulação.
COZ	Sem exodontia: integridade dos tecidos, polpas dentárias vitais, sem sinais de necrose óssea aparentemente, osso mais compacto em relação aos grupos anteriores.
	Com exodontia: biofilmes, necrose pulpar, necrose cementária, discreto sinal de necrose óssea (áreas com três ou quatro osteoplastos vazios), tecido de granulação em pequena área e infiltrado inflamatório discreto.
CST	Sem exodontia: integridade dos tecidos pulpares e ósseos, sem sinais de necrose óssea, eventuais focos inflamatórios mononucleares e hiperemia dos vasos pulpares e periapicais.
	Com exodontia: biofilmes aderidos aos fragmentos dos restos radiculares necrose pulpar, cementária e discretos sinais de necrose óssea, bem como infiltrado inflamatório mononuclear discreto.

Tabela 5- Principais achados histopatológicos

<i>Grupo</i>	<i>Osteonecrose</i>	<i>Sinais ON</i>	<i>Sequestro</i>
ZOZ	6 (66%)	4 (44%)	5 (55%)
ZST	3 (43%)	2 (28%)	2 (28%)
COZ	0	3 (33%)	0
CST	1 (0,9%)	2 (18%)	1 (0,9%)

<i>Grupo</i>	<i>Necrose pulpar</i>	<i>Necrose cimento</i>	<i>Reabsorção do cimento</i>
ZOZ	4 (44%)	4 (44%)	7 (77%)
ZST	4 (57%)	4 (57%)	3 (43%)
COZ	5 (55%)	4 (44%)	1 (11%)
CST	10 (91%)	3 (37%)	1 (0,9%)

<i>Grupo</i>	<i>Inflamação</i>	<i>Abscesso</i>	<i>Biofilme</i>
ZOZ	7 (77%)	2 (22%)	8 (88%)
ZST	3 (43%)	0	3 (43%)
COZ	4 (44%)	0	5 (55%)
CST	9 (82%)	1 (0,9%)	5 (45%)

Tabela 6 - Análise da ação da Ozonioterapia (OZT) sobre a frequência dos principais achados histopatológicos com análise estatística

Grupos	Grupo BF				P-valor
	Com OZT (ZOZ)		Sem OZT (ZST)		
	Sim	Não	Sim	Não	
Presença de osteonecrose	6 (46,2%)	3 (23,1%)	3 (23,1%)	1 (7,7%)	p = 1,000
Sinais de osteonecrose	4 (30,7%)	5 (38,5%)	3 (23,1%)	1 (7,7%)	p = 0,559
Presença de sequestro ósseo	5 (38,5%)	4 (30,7%)	2 (15,4%)	2 (15,4%)	p = 1,000
Necrose pulpar	4 (26,7%)	5 (33,3%)	4 (26,7%)	2 (13,3%)	p = 0,608
Necrose cimento	4 (26,7%)	5 (33,3%)	4 (26,7%)	2 (13,3%)	p = 0,608
Inflamação	7 (46,7%)	2 (13,3%)	3 (20%)	3 (20%)	p = 0,328
Abscesso	2 (13,3%)	7 (46,7%)	0	6 (40%)	p = 0,485
Biofilme	8 (53,3%)	1 (6,7%)	3 (20%)	3 (20%)	p = 0,235
Reabsorção cimento	7 (46,7%)	2 (13,3%)	3 (20%)	3 (20%)	p = 0,328

Continuação da tabela 6

Grupos	Grupos controle, sem BF				P-valor
	Com OZT (COZ)		Sem OZT (CST)		
	Sim	Não	Sim	Não	
<i>Presença de osteonecrose</i>	0	8 (50,0%)	1 (6,3%)	7 (43,7%)	p = 1,000
<i>Sinais de osteonecrose</i>	3 (17,6%)	5 (29,4%)	2 (11,8%)	7 (41,2%)	p = 0,619
<i>Presença de sequestro ósseo</i>	0	9 (45,0%)	1 (5%)	10 (50,0%)	p = 1,000
<i>Necrose pulpar</i>	5 (25,0%)	4 (20,0%)	10 (50,0%)	1 (5%)	p = 0,127
<i>Necrose cimento</i>	4 (20,0%)	5 (25,0%)	3 (15,0%)	8 (40,0%)	p = 0,642
<i>Inflamação</i>	4 (20,0%)	5 (25,0%)	9 (45,0%)	2 (10,0%)	p = 0,159
<i>Abscesso</i>	0	9 (45,0%)	1 (5%)	10 (50,0%)	p = 1,000
<i>Biofilme</i>	5 (25,0%)	4 (20,0%)	5 (25,0%)	6 (30,0%)	p = 1,000
<i>Reabsorção cimento</i>	1 (5,0%)	8 (40,0%)	2 (10,0%)	9 (45,0%)	p = 1,000

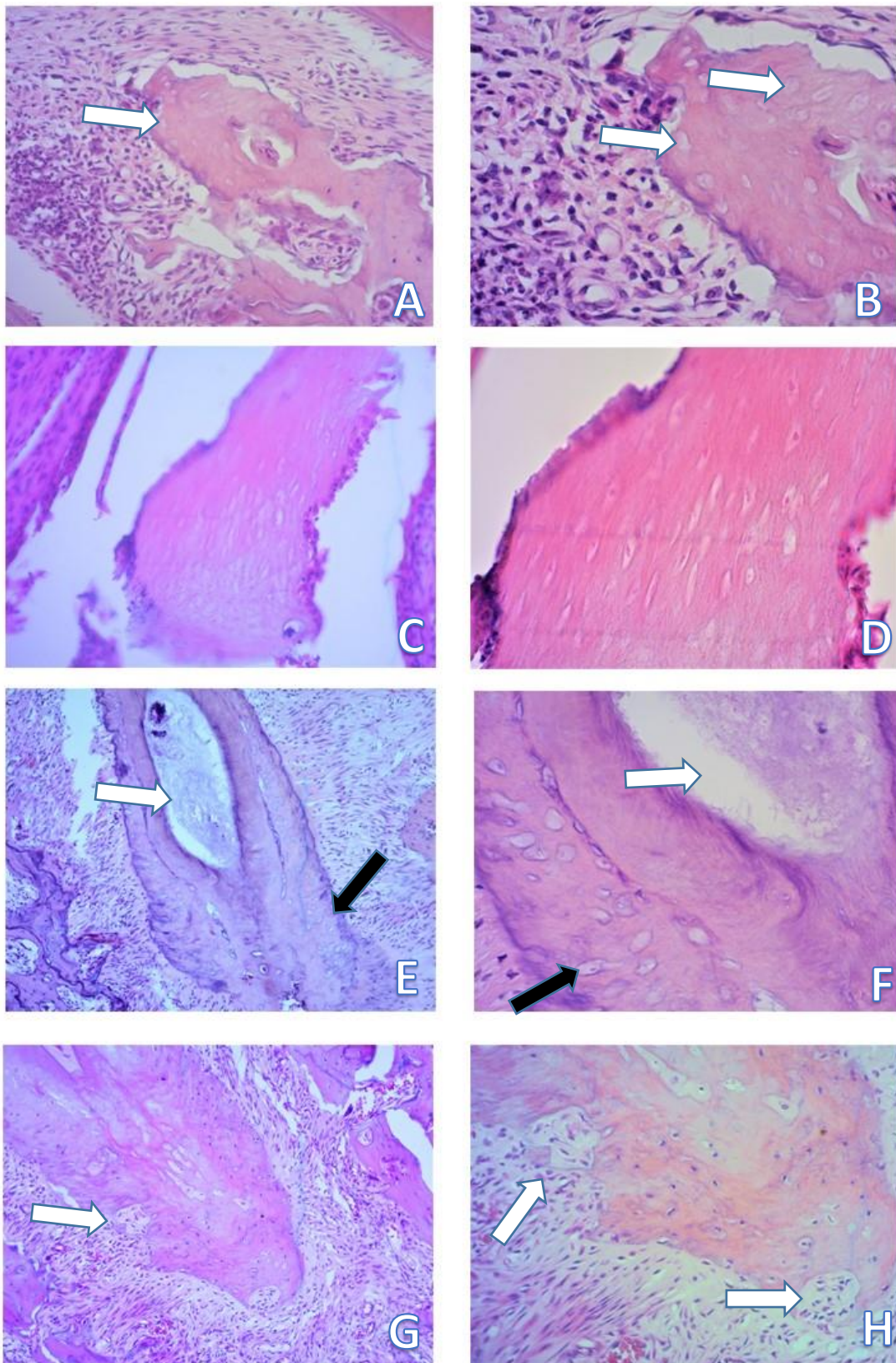


Figura 3 Grupo ZOZ, lado com extração. Necrose óssea, lacunas vazias (setas brancas), 20X (A) e 40X (B). Sequestro ósseo (C) 20X e 40X (D). Necrose pulpar (seta branca) e lacunas de cementócitos vazias (setas pretas) 10X (E) e 40X (F). Reabsorção cementária (setas brancas) 10X (G) e 20X (H).

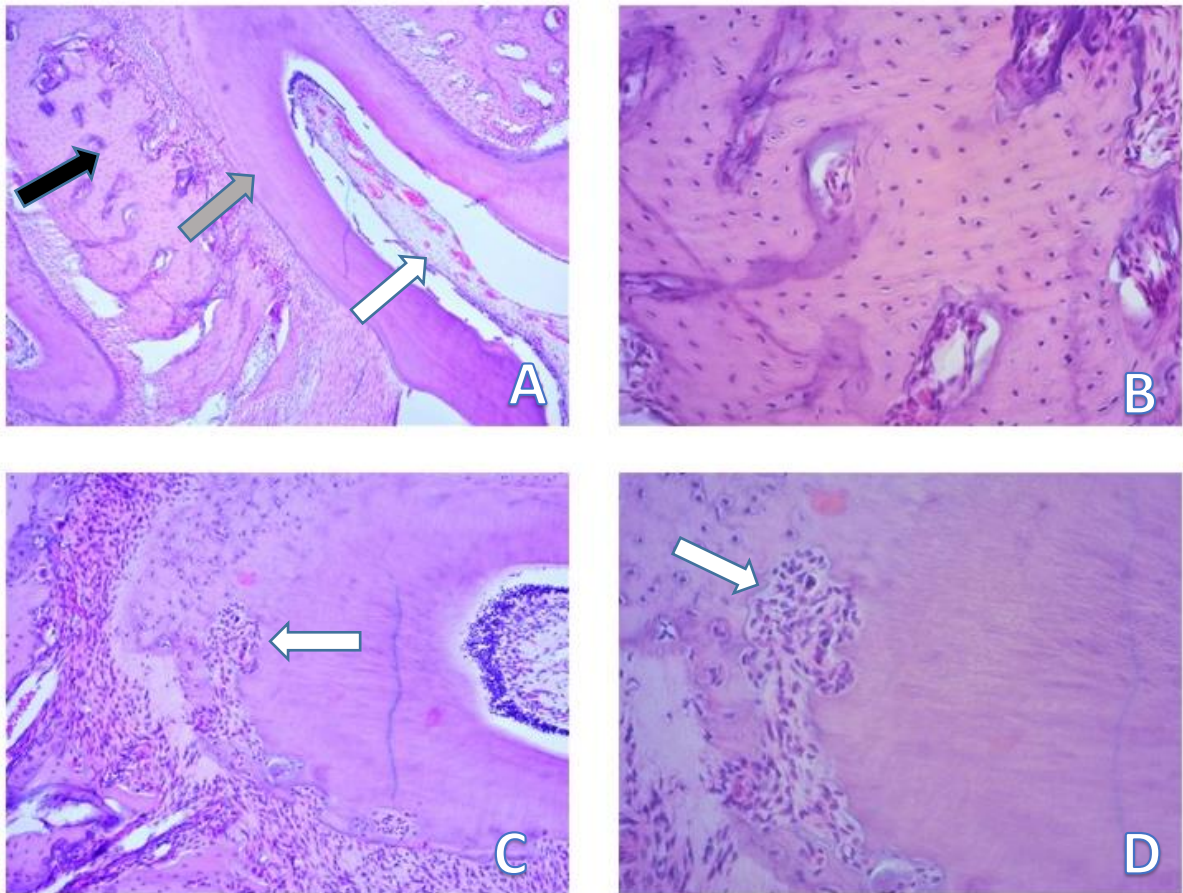


Figura 4- Grupo ZOZ lado sem exodontia. Integridade dos tecidos dentários (seta cinza), ósseo (seta preta) e polpa vital (seta branca) 5X (A) e maior aumento, 20X, mostrando integridade do tecido ósseo (B). Reabsorção do cimento (setas brancas), 10X (C) e 20X (D)

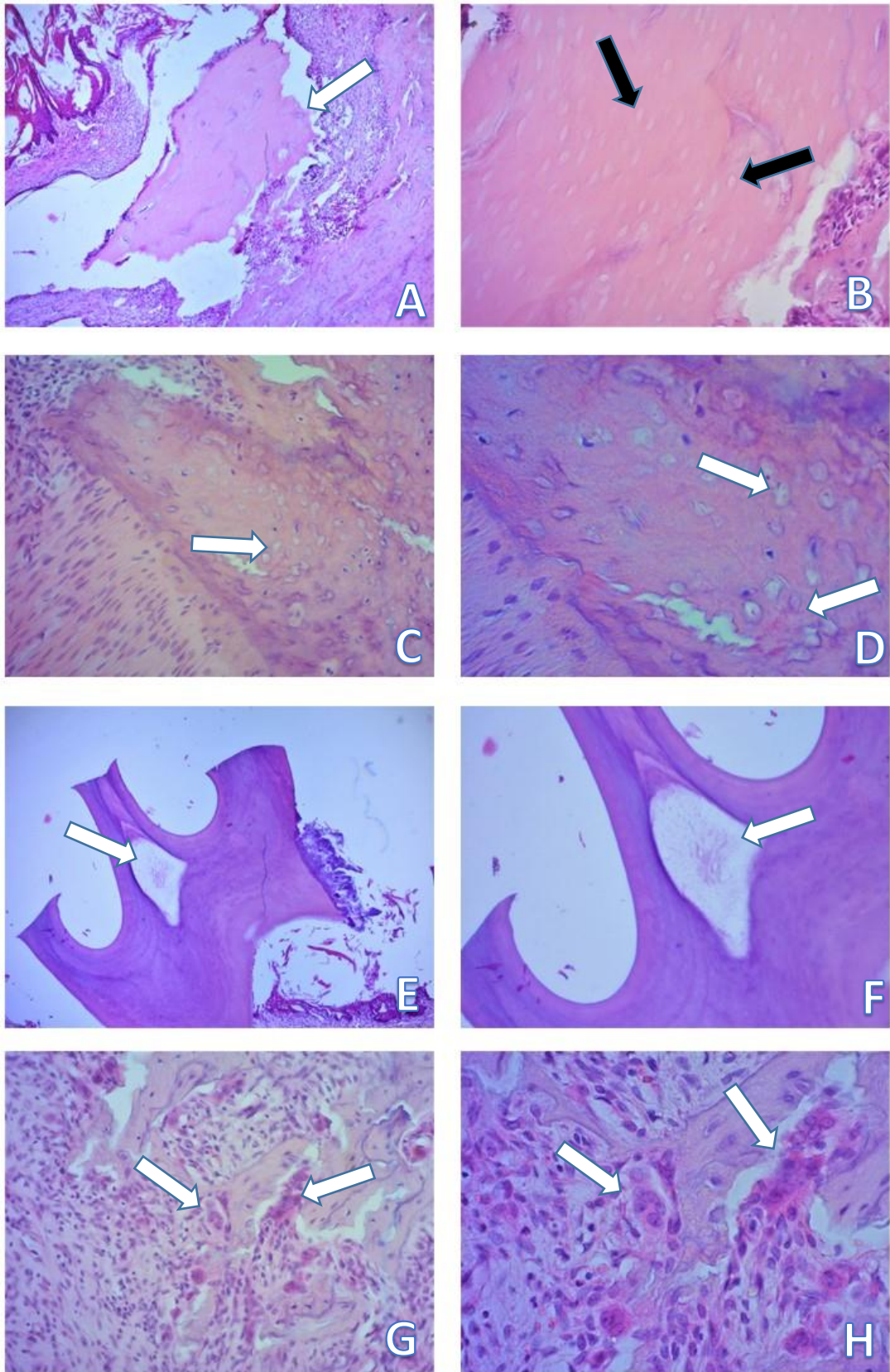


Figura 5- Grupo ZST com exodontia. Sequestro (seta branca) 5X (A) com áreas de osteonecrose, com lacunas vazias (setas pretas) 20X (B) Esvaziamento de cementoplastos (setas brancas) 20X (C) e 40X (D) Necrose pulpar (seta branca) 5X (E) e 10X (F). Reabsorção óssea com presença de osteoclastos (setas brancas) 20X (G) e 40X (H).

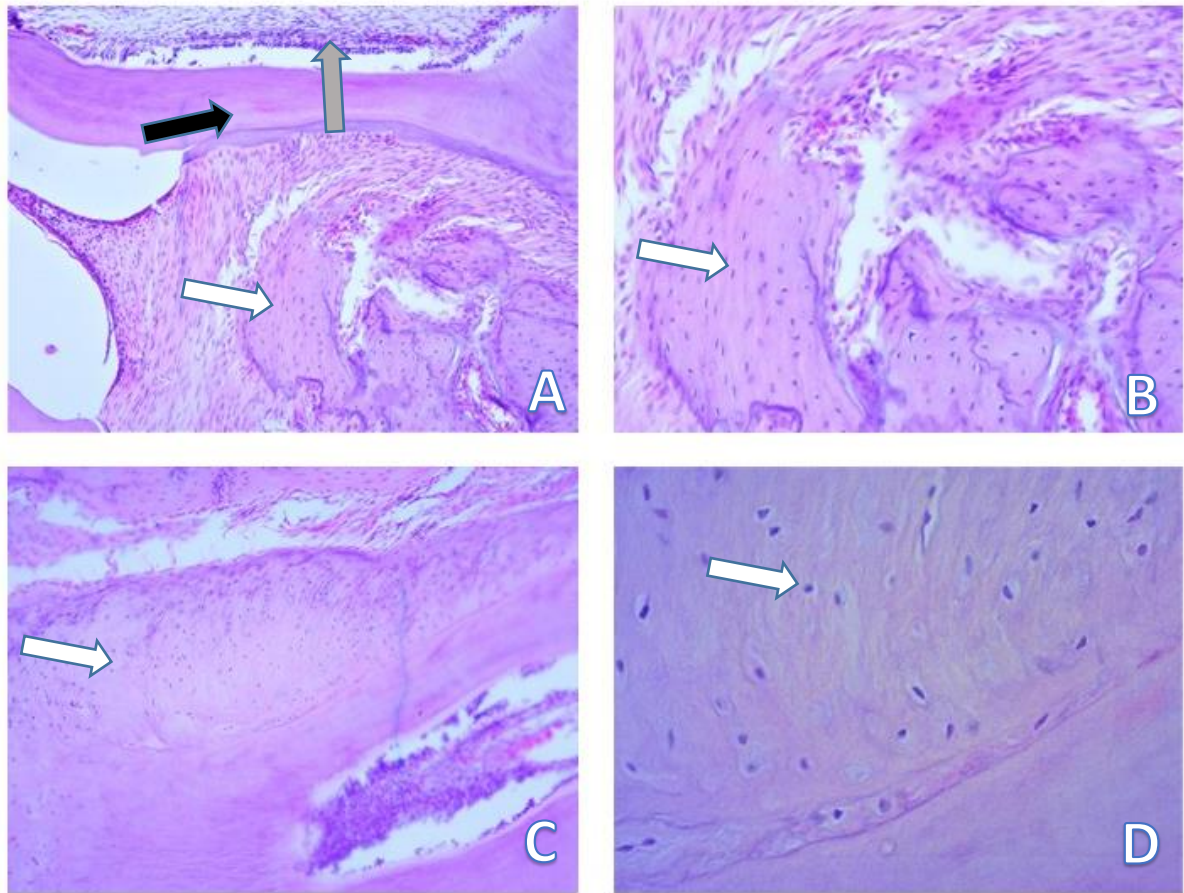


Figura 6- Grupo ZST sem extração dentária. (A) Integridade dos tecidos, ósseo (seta branca), dentário (seta preta) e polpa vital (seta cinza). 10X (B) detalhe do osso alveolar de aspecto normal (seta branca) 20X. Cimento celular normal em aumentos 10X (C) e 40X (D).

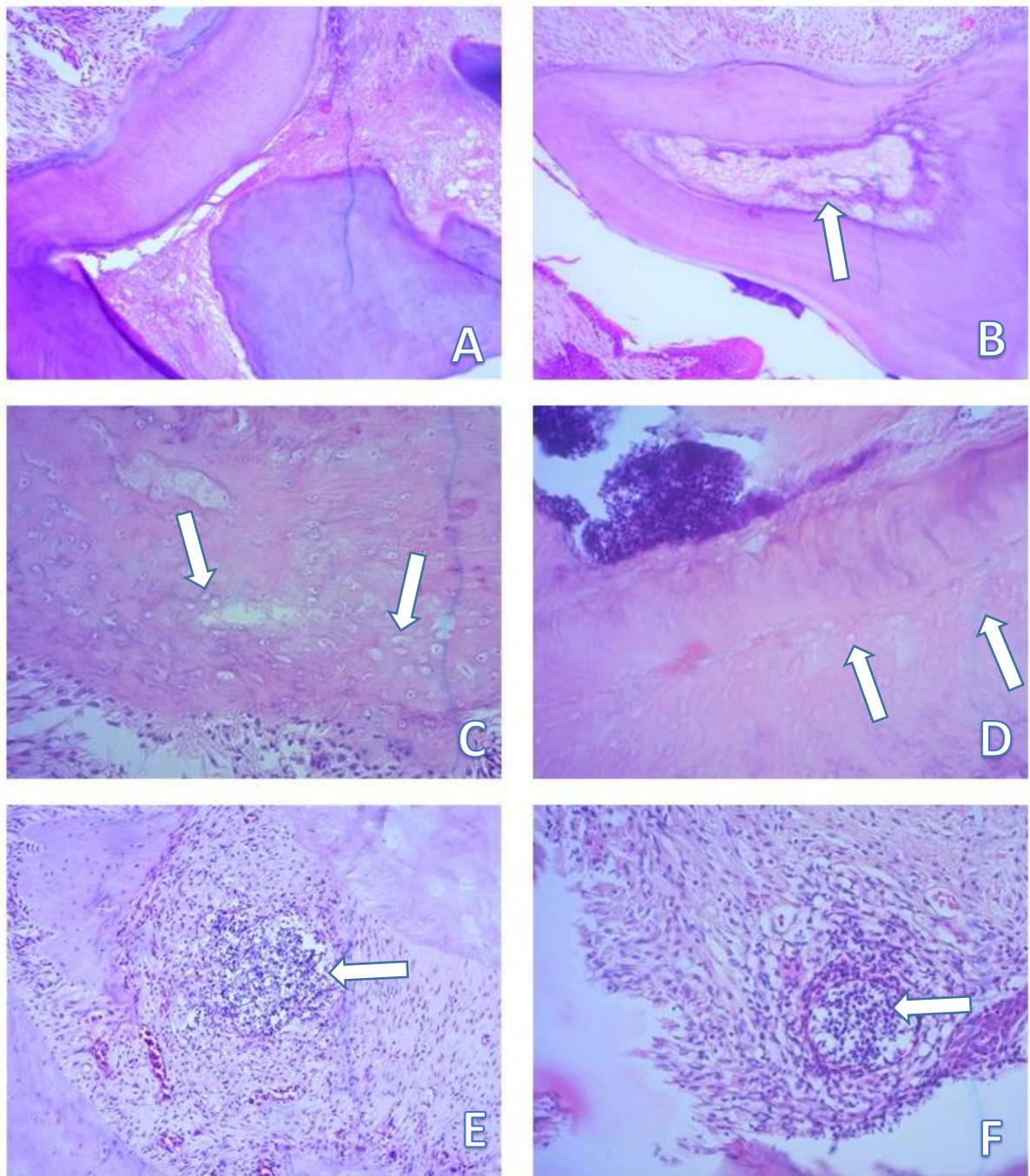


Figura 7- Comparativo entre os grupos COZ (fotos a esquerda) e CST (fotos a direita), ambos com exodontia. (A) Necrose pulpar. 10X. (B) Necrose da polpa (seta). 10X (C) Esvaziamento de lacunas em cimento (setas). 20X (D) Lacunas de cementócitos vazias (setas). 20X (E) Infiltrado inflamatório (seta) próximo a osso alveolar. 10X (F) Infiltrado inflamatório (seta) 12X.

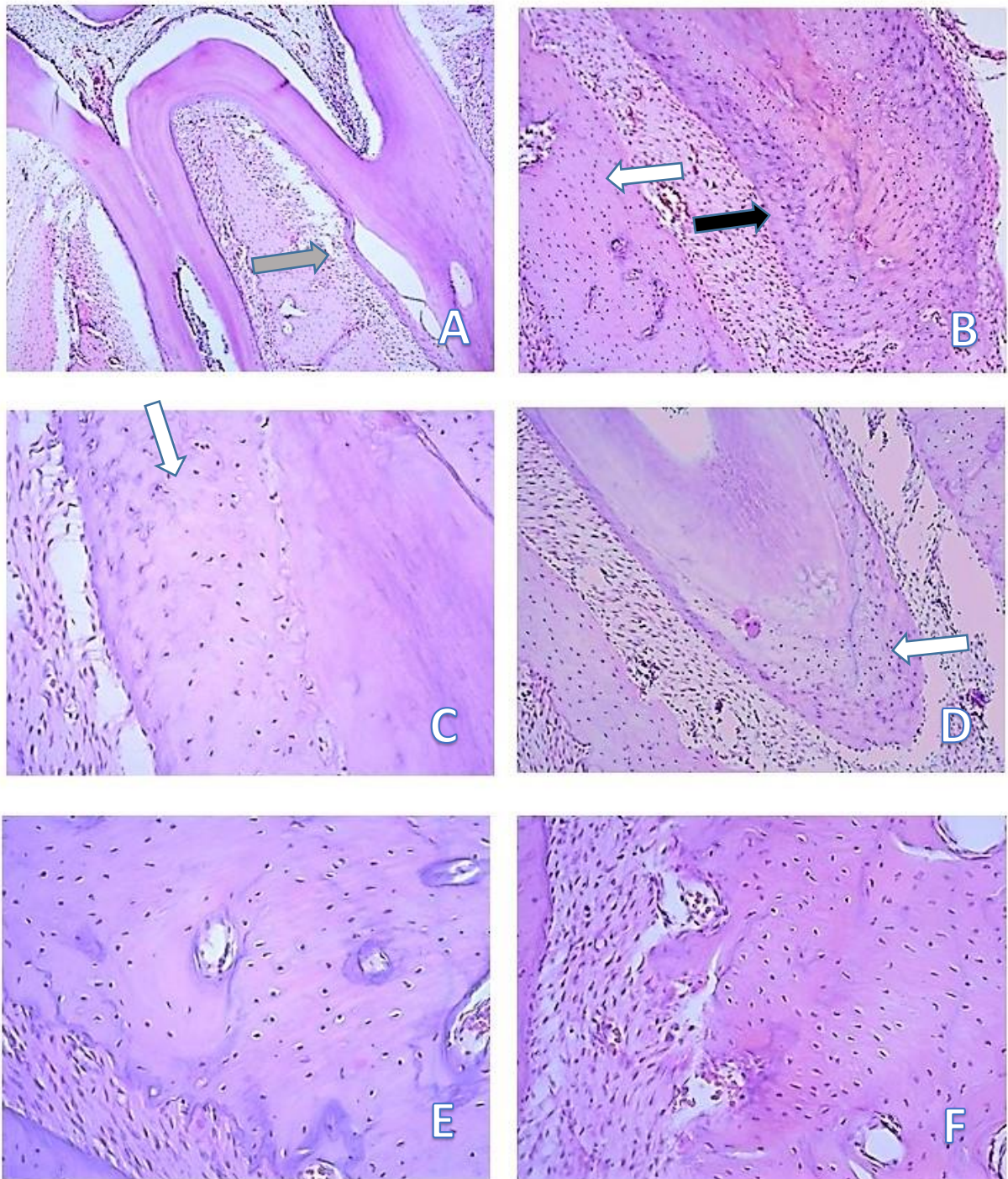


Figura 8- Comparativo entre os grupos COZ (fotos a esquerda) e CST (fotos a direita), ambos sem exodontia. (A) Integridade dos tecidos dentário (seta branca), ósseo (seta preta) e ligamento periodontal (seta cinza). 5X (B) Integridade de osso alveolar (seta branca) e cemento celular (seta preta). 10X (C) Integridade de cemento celular (seta) 20X (D) Integridade de cemento celular (seta) 10X (E) Integridade do tecido ósseo, com aparente maior compactação. 10X (F) Integridade do osso alveolar.

6. DISCUSSÃO

Embora tenhamos, com sucesso, induzido osteonecrose pela administração de Ácido Zolendrônico em ratos submetidos à exodontia do primeiro molar, não pudemos observar achados clínicos, ou microscópicos, que permitissem fundamentar a ação protetora ou curativa da OZT sistêmica entre os grupos experimentais e controle. Ou seja, não houve diferença entre os grupos submetidos à terapia e os grupos não tratados. Como não há na literatura, para nosso conhecimento, um trabalho semelhante quanto ao papel do ozônio sistêmico em ratos submetidos à exodontia sob ação de BF, não há como comparar nossos resultados.

Recentemente, Viegas (83) estudou a ação da OZT sistêmica, em mandíbulas irradiadas de ratos, não submetidos à exodontia, verificada em análise microtomográfica e histológica. A quantificação de dados microtomográficos mostrou diferença significativa antes e após a irradiação das mandíbulas, nos parâmetros de Volume ósseo e o Volume da Amostra evidenciando o desenvolvimento de osteorradionecrose. Nos lados irradiados, a análise histológica demonstrou danos osteogênicos, como desorganização tecidual, fibrose e sinais de necrose. Porém, não foram encontradas diferenças significativas na microtomografia óssea e nos parâmetros histológicos entre os grupos que realizaram OZT e controle. Os autores inferiram que a via de administração, retal, poderia ter influenciado negativamente nos resultados, pois, após serem insuflados os animais defecavam, o que pode ter provocado a diminuição da oferta de ozônio.

Em nosso estudo piloto, percebeu-se o mesmo problema, o que foi minimizado nesta presente pesquisa. No presente estudo, os animais foram deixados em jejum, por quatro horas, antes da insuflação retal. Os animais receberam apenas água, à vontade, para reduzir o bolo fecal, e foi feita estimulação local para eliminação das fezes imediatamente antes do procedimento. Durante a aplicação do gás foi feita uma leve pressão digital do canal anal para vedar a possível saída de gás. Foi observada significativa redução da eliminação de fezes, que ainda era presente em certos momentos. Mesmo com esses cuidados, não foi possível observar qualquer efeito tecidual nos animais testados, visto clínica ou microscopicamente, decorrentes do condicionamento prévio da OZT à administração de AZ, seguido da exodontia e posterior desenvolvimento da osteonecrose. Infere-se, no entanto, que com metodologias mais sensíveis para análise da microarquitetura óssea, como a

microtomografia ou a imuno-histoquímica para análise celular poder-se-ia, talvez, encontrar alterações em alguns parâmetros ósseos ou celulares.

No entanto, o resultado negativo da ação da OZT não condiz ao verificado na prática clínica, onde casos de sucesso são descritos (59,69,74,85,86). Assim, a literatura é pródiga em relatos de sucesso com a terapia. Um estudo avaliou o reparo alveolar após exodontia, em ratos submetidos à terapia com ozônio tópico e sistêmico. Foi avaliada o reparo por meio de análise histomorfométrica, o que indicou, no período pós-operatória, um aceleração do reparo alveolar quando feita OZT sistêmica. Neste estudo foi feita a aplicação de mistura de O₂/O₃ intraperitonealmente (75).

Em uso clínico em humanos, o ozônio é usado, com sucesso, na lavagem e aplicação tópica em exposições ósseas por MRONJ. Nestes casos a aplicação pode ser com água ozonizada, óleo ozonizado ou injeção de gás O₂/O₃ perilesional (60,69,84,85). Steinhart, Schulz e Mutters (87) estudaram o efeito da lavagem de fêmures de coelhos com indução de osteomielite e obteve uma boa redução microbiana e diminuição da severidade da doença. Duman et al. (88) evidenciaram efeito positivo na reparação de defeito ósseo em fêmures de ratos após insuflação retal de gás ozonizado. O efeito da ozonioterapia tópica em enxertos ósseos foi avaliado por Ozdemir, Toker, Balci e Ozer (89). Neste estudo, o grupo que recebeu ozonioterapia tópica no local do enxerto observou-se maior área total de tecido ósseo, maior número de osteoblastos e neoformação óssea, mensurados por histomorfometria.

A terapia também foi avaliada em outros tecidos. Calunga et al. (90) avaliaram a ação da OZT em falência renal, na avaliação histológica, o grupo teste apresentava menos lesões teciduais e retardo do avanço da doença, em comparação aos que não receberam a terapia, protegendo os rins contra lesões vasculares e mecanismos oxidativos. Barber et al (91) sugeriram em estudo, que o pré-condicionamento com O₃ poderia representar uma medida profilática para minimizar lesões renais.

Diante do sucesso clínico da OZT nos estudos citados, acreditamos que a ausência de resposta positiva em nosso trabalho pode ser creditada, em parte, à via de administração escolhida. No estudo de Erdemci et al (80) foi usada a técnica de injeção intraperitoneal da mistura de O₂/O₃, com resultados positivos da ação do ozônio. Siniscalco et al (92) usaram da mesma via administração para avaliar a ação

do O3 em pancreatite induzida. Os resultados mostraram redução de danos ao pâncreas e consequente aumento de nível sérico de insulina, leptina e glucagon. Desta forma, a técnica de aplicação via intraperitoneal parece promissora pela facilidade técnica e possível redução de perda do gás. Em futuros trabalhos a via intraperitoneal poderia ser usada para avaliar os efeitos da OZT em MRONJ. Em suma, creditamos o resultado negativo possivelmente à via de administração e, por outro lado, pode ser devido ao desconhecido mecanismo de ação do ozônio no osso modificado pela ação do BF e do trauma causado pela exodontia.

Cabe ressaltar que os grupos submetidos à extração dentária, sob efeito do BF, apresentaram sinais claros e inequívocos de osteonecrose, vistos na observação clínica e histopatológica. Esse fato corrobora os resultados de revisão sistemática recentemente publicada (93), que mostra a importância e o papel do trauma na indução de osteonecrose. Os resultados deste estudo também são corroborados por outras pesquisas que destacam o papel do trauma como agente importante no estabelecimento da osteonecrose associada a BF (81,94,95).

Vilarinho et al (96) avaliaram sinais iniciais de alterações ósseas em modelo animal de indução de MRONJ com trauma local, por exodontia, e sem trauma no lado contralateral. Os resultados foram avaliados por microtomografia computadorizada, antes da indução de ON, ao final do período de administração de BF e após a exodontia. Exposição óssea foi verificada em 76% dos animais que receberam a droga. Dentre os animais que receberam a terapia com BF, a espessura trabecular e proporção de volume ósseo aumentaram do início de experimento ao momento após o término da medicação, e após a exodontia, a média dos valores foi maior em comparação grupo controle que não recebeu a medicação. Alterações estruturais ósseas ocorreram no grupo teste em ambos os lados da mandíbula antes do fator de trauma, extração dentária.

Moreira em 2018 (97) caracterizou histologicamente alterações provocadas por AZ em hemimandíbulas de ratos na ausência de trauma. Não foram constatadas extensas áreas necróticas, tampouco infiltrado inflamatório e colônias bacterianas. Reação periosteal estava presente nas hemimandíbulas de apenas três animais do grupo experimental. Entretanto, foi observado aumento da densidade óssea volumétrica, do número de osteoclastos morfológicamente alterados e de focos de necrose no grupo experimental, em relação ao controle. Também houve redução da

infiltração gordurosa da medula óssea no grupo experimental em relação ao controle. A administração de AZ foi suficiente para induzir alterações histopatológicas em hemimandíbulas de ratos, mas não o desenvolvimento de osteonecrose. Esses achados corroboram com os nossos.

Resultados semelhantes foram encontrados por De Ponte et al. 2016 (98), observando que doses de AZ pelo período de 30 a 45 dias atuam diretamente sobre o tecido ósseo, induzindo alterações morfológicas ósseas, com lacunas vazias, ausência de matriz e estruturas fibrilares não organizadas, o que pode predispor a necrose óssea.

Os achados desses estudos citados sugerem sinais de alterações ósseas sem o fator traumático, no caso a exodontia, tanto na fisiologia como remodelação óssea, antes da manifestação clínica da doença. No presente trabalho, a extração dentária foi fator significativo no desenvolvimento de ON, não sendo observadas mudanças precoces nos tecidos mandibulares nos lados onde não houverem exodontia. Entretanto, é necessária avaliação histomorfométrica para correto pareamento dos resultados e comparação.

Ağaçayak et al 2018 (99) avaliaram o papel do trauma no desenvolvimento de MRONJ em modelo animal. Foram realizadas dosagem de CTX-1, um marcador biológico para reabsorção óssea, em áreas de extração dentária traumática, atraumática e controle, sem extração. As dosagens de CTX-1 foram significativamente maiores nos grupos com exodontia, com maior dosagem para extração atraumática. Achados clínicos e radiográficos para necrose óssea foram verificados nos grupos com exodontia, porém, sem diferença significativa entre eles. Os autores concluíram que a extração dentária como fator traumático aumenta a dosagem do marcador CTX-1 e que, apesar de não haver diferença significativa, a osteonecrose foi observada clínica e radiograficamente nos grupos que realizaram a exodontia.

A técnica de exodontia realizada no nosso estudo, foi semelhante à realizada por Ağaçayak et al. no grupo de extração atraumática, com sutura do tecido mole e sem fabricação de defeito ósseo, que apresentou níveis de CTX-1 mais significantes.

Em seu estudo, Howie et al 2015 (100) também mostraram o fator traumático da exodontia como fator importante para o desencadeamento da MRONJ, destacando

a necessidade de evitar exodontias ou tratamento dental traumático em sujeitos sob uso de BF, como única evidente forma de prevenir a MRONJ.

Os dois trabalhos anteriormente descritos evidenciam a importância da exodontia como fator traumático desencadeador da osteonecrose, o que suporta o procedimento realizado por nós.

No presente estudo foram administradas doses significantes de BF nos grupos experimentais. A dosagem foi semelhante à usada nos estudos de Zandi et al (81), e mostrou-se eficaz na indução de osteonecrose.

Contraditoriamente, Ying et al. 2016 (101), avaliaram a ação de injeção única de baixa dose de AZ sobre a osseointegração de implantes de titânio, em tibia de ratos com osteoporose menopausal. Os autores verificaram que houve melhora da osseointegração nos ratos que fizeram uso de BF, em baixa e única dose. Resultado semelhante encontrou de outro estudo, que avaliou se pequenas doses de BF melhoravam a proliferação e diferenciação de células mesenquimais humanas em superfície de implantes de titânio. A administração de baixas doses da droga induziu de forma significativa a estimulação de marcadores osteogênicos comparados ao grupo controle (102). Cabe destacar que as baixas doses de BF não são associadas à MRONJ. Dentre os BF, o AZ foi escolhido por nós e em diversos estudos prévios, por apresentar maior risco de necrose óssea em relação aos demais BF tanto em humanos como em estudos em animais (93,103), o BF de terceira geração apresenta a potência 10.000 maior em relação ao BF de primeira geração, como o Etidronato (104), além de ser utilizado em diversos estudos de indução de necroses ósseas em animais (79,94,97,105,106,107,108).

Assim, o modelo animal de indução de osteonecrose por administração de AZ, seguido de extração dentária, foi eficaz para um dos os objetivos propostos e se assemelha ao que acontece na prática clínica com os pacientes que testão em uso de BF. Alguns estudos fizeram ligeiras modificações nesse modelo, variando a dose, ou o trauma ou adição de infecção, mas os resultados são semelhantes. Em nosso estudo houve uma pequena modificação do protocolo proposto por Zandi et al em 2016 (81) em relação ao momento da eutanásia. No trabalho ao qual o nosso foi baseado o protocolo de indução de MRONJ, a eutanásia foi realizada quatro semanas após a exodontia no grupo onde houve maior frequência de osteonecrose, o mesmo

protocolo foi adotado em estudo piloto, porém, não foram observados sinais significativos de ON. Foi adotado então, momento da eutanásia 8 semanas após a exodontia, para aproximar a definição de MRONJ da AAOMS (46) e de acordo com outros modelos de indução de ON (94,109).

Com a adaptação foi possível visualizar mais sinais de necrose, indicando a ação da medicação sobre o tecido ósseo.

Em síntese, quanto ao uso de BF, nosso trabalho corrobora os achados da literatura e reforça o papel do trauma (105,108) no desenvolvimento da necrose óssea. Neste quesito, da morte celular induzida por medicamentos, nosso trabalho evidencia um achado pouco descrito na literatura, que é a morte de cementócitos e a consequente apresentação de lacunas vazias na porção apical dos segundos molares e restos radiculares, na região adjacente à exodontia. Nesta região, próxima de onde foi realizada exodontia com ou sem remanescente radicular ou fratura coronária acidental durante o procedimento de extração dentária, foram observadas, no cimento celular, lacunas vazias. Tal achado foi encontrado nos grupos que foram submetidos à exodontia, com ou sem administração de AZ, embora com uma maior frequência nos grupos com uso do BF. A alteração no cimento (esvaziamento das lacunas dos cementócitos) foi encontrada em molares contíguos à área da extração, que também apresentaram nítida necrose pulpar (coronária e radicular). Nos mesmos dentes foram encontradas reabsorções ativas, inativas ou reparadas. Nesses grupos os osteócitos e suas respectivas lacunas no osso alveolar adjacente à raiz dentária, estavam preservados.

O padrão de lacunas vazias (e alguns com remanescentes nucleares ou materiais fibrilares) foi observado no cimento celular, sugerindo morte através de um mecanismo desconhecido (110)

Estes achados podem ser comparados, e considerados assemelhados, aos encontrados por De Rossi et al. (111), que desenvolveram um trabalho para avaliar a expressão de RANK, RANKL e OPG, fatores associados a ativação de osteoclastos e consequente reabsorção óssea, em cementócitos. Foi induzida infecção periapical expondo-se a cavidade pulpar ao meio bucal para que se desenvolva a contaminação dos canais radiculares de forma espontânea. Os animais foram eutanasiados aos dias 0, 7, 21 e 42 após a exposição pulpar. Foi feita análise dos resultados por

histopatológica, histomorfométrica sob imunofluorescência, PCR para expressão de RNA mensageiro, imuno-histoquímica, imunofluorescência e histoquímica enzimática. Nos ratos eutanasiados no dia 42 foram observados aumento significativo do espaço periapical, avançada reabsorção do cimento, com esvaziamento das lacunas dos cementócitos. Nestes animais, os osteócitos e suas respectivas lacunas (osteoplastos) no osso alveolar adjacente à raiz dentária, estavam preservados. Houve aumento significativo de expressão dos mediadores RANK, RANKL e OPG, verificada com *Real-time* PCR. Em imunohistoquímica e imunofluorescência, RANKL estava predominantemente expresso em lacunas de cementócitos, e não estava expresso em osteócitos, células RANK-positivas eram predominantemente células inflamatórias mononucleares na superfície do osso alveolar e, OPG em osteoblastos ao redor de lesão óssea e cementoblastos ao redor do terço apical da raiz. Os resultados reforçaram a semelhança das células do tecido ósseo do alvéolo com o tecido cementário e que, a expressão de RANKL é expressado por cementócitos como resposta a infecção endodôntica. Isso sugere que os cementócitos estão diretamente ligados à periodontite apical, e não os osteócitos. Por inferência, podemos sugerir que a infecção decorrente da extração dentária pode ter desencadeado a morte dos cementócitos, vista neste trabalho.

O padrão de lacunas vazias, possivelmente configurando necrose cementária, observada em microscopia óptica encontradas por De Rossi et al, foram muito semelhantes ao encontrado por este estudo. A exposição da polpa e canais radiculares ao meio bucal, que podem ocorrer por fratura coronária ou remanescente radicular, decorrente de exodontias, à contaminação com conseqüente necrose pulpar parece estar ligada ao esvaziamento das lacunas dos cementócitos, o que pode sugerir o fator traumático como agente desencadeador deste quadro.

Advogamos que se trata de necrose cementária, mas ressaltamos as limitações até mesmo conceituais embutidas nesta afirmação. Resta claro que o trauma pela luxação dos molares durante a extração, causou necrose pulpar e morte dos cementócitos. Este achado está presente nos grupos submetidos à extração, independentemente da ação do ozônio ou do AZ, o que comprova a ação do trauma como agente desencadeador.

Paglioni et al. em 2017 (112), avaliaram a espessura de cimento de dentes extraídos de pacientes em uso de BF, não encontrando diferença significativa entre

os dentes extraídos dos indivíduos que não estavam em uso da medicação. Seus resultados indicam que a droga não teve efeito sobre o cimento. Extrapolando para os nossos resultados pode-se afirmar que o BF não atuou diretamente na morte dos cementócitos.

A morte dos cementócitos é um quadro singular e pouco citado na literatura, isso porque, embora similar ao osso, o cimento é avascular e não desenvolve remodelação fisiológica, mas cresce por aposição contínua. No entanto, porque o cimento não é feito para se remodelar, os cementócitos são incorporados na matriz mineralizada, e aqueles mais profundamente incorporados mostram sinais de estresse e degradação, e lacunas vazias podem indicar morte celular (105).

Erausquin e Muruzabal 1967 (113) avaliaram necrose do cimento em dentes de ratos com indução de danos pulpares, foram observadas necroses a exposição de soluções irrigadoras tóxicas.

Dentre as limitações do estudo, podem-se destacar a técnica não estabelecida de OZT sistêmica em ratos, observada pela falta de estudos onde a terapia é testada, assim como a técnica de exodontia em ratos, observada pela dificuldade de extração completa do dente, sem restos radiculares, tenho em vista a complexidade e fragilidade do órgão.

Cabe ressaltar que a técnica das exodontias foi aprimorada ao decorrer que eram realizadas, com menos intercorrências, como fraturas coronárias ou radiculares nos últimos ratos. O fato foi observado nas análises histopatológicas, que mostraram menos restos radiculares e processos infecciosos nos grupos COZ e CST, os últimos a passarem pelo procedimento cirúrgico.

O resultado esperado, ou seja, hipótese teste, para este estudo seria de efeito protetor da OZT associada a administração de BF, de maneira a prevenir ou minimizar o desenvolvimento de MRONJ foi rejeitada. A hipótese nula, que a terapia não tem efeito preventivo, protetor ou curativo na MRONJ foi aceita.

Em síntese, nosso trabalho foi eficaz para induzir a osteonecrose nos grupos submetidos ao AZ e à exodontia do primeiro molar. Não verificamos qualquer efeito protetor, preventivo ou curativo da OZT sistêmica. No entanto, verificamos um achado pouco explorado na literatura, que foi demonstrado pela intensa morte dos

cementócitos nos grupos experimentais onde foram realizadas as exodontias, independentemente da medicação. Esse achado foi por nós assumido como necrose do cimento, embora cientes da limitação conceitual e da ausência do termo na literatura. Nos baseamos nos trabalhos de De Rossi et al (111) que claramente mostraram as lacunas vazias no cimento como resultado da morte de cementócitos. Esse achado precisa ser comprovado em estudos futuros e com metodologias mais sensíveis, mas podemos estar diante de um novo entendimento sobre o papel dos cementócitos.

Questões fundamentais permanecem sobre a biologia do cimento e o papel dos cementócitos. Embora existam diferenças entre cementócitos e osteócitos, existem semelhanças claramente importantes entre eles. No entanto, funções dos cementócitos na biologia do cimento ainda precisam ser demonstradas. Em última análise, a questão que deve ser respondida é se os cementócitos são importantes para o desenvolvimento, homeostase, adaptação e / ou regeneração do cimento celular (110). E se, de alguma forma, os cementócitos participam do desenvolvimento da MRONJ.

7. CONCLUSÃO

Não houve ação protetora ou curativa da OZT sistêmica em ON induzida por BF (AZ), em nosso modelo animal experimental. Assim, os efeitos do condicionamento oxidativo da OZT prévia ao desenvolvimento de ON, foram nulos ou imperceptíveis. Ou seja, não foi observada qualquer ação positiva ou negativa da OZT sistêmica via insuflação retal.

A administração de altas dose de BF em mandíbula de ratos, seguida de extração dentária foi adequada para indução de osteonecrose, visto neste modelo animal de ON por AZ.

Não foram observadas, clínica e histopatologicamente, diferenças no padrão de osteonecrose entre o grupo tratado com ozônio e controle sem terapia naqueles animais que receberam AZ. Na análise clinicamente e prospectivamente, os tecidos moles após a terapia medicamentosa e OZT, mostraram-se pouco afetados.

Por meio de análise histopatológica, as características morfológicas do tecido ósseo mandibular após a exposição ao BF e OZT foi comprovada a osteonecrose nos ratos tratados com o BF, nas áreas da exodontia. De forma não usual, nos lados submetidos à exodontia, com ou sem tratamento com BF, viu-se necrose pulpar do dente contíguo, e, extensas áreas de esvaziamento de cementócitos, que advogamos serem tratadas como necrose do cimento.

Propõe-se para os próximos estudos avaliar outras vias de administração da OZT, para verificar ação sobre os tecidos. Sugere-se também, verificar a diferença na ação dos BF sobre o cimento e osso, considerando os achados pouco estudados da necrose do cimento.

8. REFERÊNCIAS

- 1) Robling, A.G, Castillo, A.B, Turner, C.H. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006; 8: 455-498.
- 2) Datta, H.K, Ng, W.F, Walker, J.A, Tuck, S.P, Varanassi, S.S. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008; 61: 577–587.
- 3) Capulli, M, Paone, R, Rucci, N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch of Biochem and Biophys.* 2014;561: 3-12.
- 4) Marks, S.C, Popoff, S.N. Bone Cell Biology: The Regulation of Development, Structure, and Function in the Skeleton. *Am J Anat.* 1988; 183: 1-44.
- 5) Florencio-Silva, R, Sasso, G.R.S, Sasso-cerri, E, Simões, M.J, Cerri, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International.* 2015; 2015: 1-17.
- 6) Franz-Odenaal, T.A, Hall, B.K, Witten, P.E. Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes. *Developmental Dynamics.* 2006; 235: 176-190.
- 7) Rochefort, G.Y, Pallu, S, Benhamou, C.L. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int.* 2010;21: 1457–1469.
- 8) Dallas, S.L, Prideaux, M, Bonewald, L.F. The Osteocyte: An Endocrine Cell and More. *Endocr Rev.* 2013;34(5): 658–690.
- 9) Schaffler, M.B, Cheung, W, Majeska, R, Kennedy, O. Osteocytes: Master Orchestrators of Bone. *Calcif Tissue Int.* 2014; 94: 5–24.
- 10) Klein-Nulend J, Semeins C.M, Ajubi N.E, Nijweide P.J, and Burger E.H, Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts— correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 217 (2): 640-648.
- 11) Cherian P.P, Siller-Jackson A.J, Gu S et al. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandina. *Mol Biol Cell.* 2005; 16 (7): 3100–3106.
- 12) Genetos D.C, Kephart C.J, Zhang Y, Yellowley C.E and Donahue H.J. Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *J Cell Physiol.* 2007: 212 (1): 207–214.
- 13) Lu X.L, Huo B, Park M and Guo X.E. Calcium response in osteocytic networks under steady and oscillatory fluid flow. *Bone.* 2012; 51 (3): 466–473.

- 14) Robling A.G, Bellido T, and Turner C.H, Mechanical stimulation in vivo reduces osteocyte expression of sclerostin. *J Musculoskel Neuronal Interact.* 2006; 6 (4): 354.
- 15) Robling A.G, Niziolek P.J, Baldridge L.A et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem.* 2008; 283 (9): 5866–5875.
- 16) Gaudio A, Pennisi P, Bratengeier C et al. Increased sclerostin serum levels associated with bone formation and resorption markers in patients with immobilization-induced bone loss. *J Clin Endocrinol Metabm.* 2010; 95 (5):2248–2253.
- 17) Moriishi T, Fukuyama R, Ito M et al. Osteocyte network; a negative regulatory system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and sost in osteocytes at unloading. *PLoS ONE.* 2012; 7 (6),Article ID e40143.
- 18) Crockett, J.C, Mellis, D.J, Scott, D.I, Helfrich, M.H. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int.* 2011; 22: 1–20.
- 19) Boyce, B.F, Xing, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473: 139–146.
- 20) Charles, J.F, Aliprantis, A.O. Osteoclasts: more than ‘bone eaters’. *Trends in Mol Med.* 2014;20(8): 449-459.
- 21) Sornay-Rendu E, Boutroy S, Munoz S and Delmas P.D. Alterations of cortical and trabecular architecture are associated with fractures in postmenopausal women, partially independent of decreased BMD measured by DXA: the OF-ELY study *J Bone Miner Res.* 2007; 22 (3): 425–433.
- 22) Green J, Schotland S, Stauber D.J, Kleeman C.R and Clemens T.L. Cell-matrix interaction in bone: type I collagen modulates signal transduction in osteoblast-like cells. *Am J Cell Physiol.* 1995; 268 (5): C1090–C1103.
- 23) Viguet-Carrin S, Garnero P, and Delmas P.D, The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis Int.* 2006; 17 (3):319–336.
- 24) Zheng, Y, Zhou, H, Dunstan, C.R, Sutherland, R.L, Seibel, M.J. The role of the bone microenvironment in skeletal metastasis. *J Bone Oncol.* 2013;2: 47-57.
- 25) Coleman, R.E, McCloskey, E.V. Bisphosphonates in oncology. *Bone.* 2011;49: 71-76.
- 26) Russell, R.G.R. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone.* 2011;49: 2-19.

- 27) Russell, R.G.R, Bisaz, S, Fleisch, H. Pyrophosphate and Diphosphates in calcium metabolism and their possible role in renal failure. *Arch Intern Med.* 1969; 124: 571.
- 28) Fleisch, H, Russell, R.G.R, Francis, M.D. Diphosphonates Inhibit Hydroxyapatite Dissolution in vitro and Bone Resorption in Tissue Culture and in vivo. *SCIENCE.* 1969; 165: 1262-1264
- 29) Fleisch, H, Russell, R.G.G. A Review of the Physiological and Pharmacological Effects of Pyrophosphate and Diphosphonates on Bones and Teeth. *J Dent Res.* 1972; 51: 323-332.
- 30) Chapuy, M.C, Meunier, P.J, Alexandre, C.M, Vignon, E.P. Effects of Disodium Dichloromethylene Diphosphonate on Hypercalcemia Produced by Bone Metastases. *J Clin Invest.* 1980; 65: 1243-1247.
- 31) Meunier, P.J et al. Effects of disodium dichloromethylene diphosphonate on paget's disease of bone. *The Lancet.* 1979: 489-492.
- 32) Pollard, M, Luckert, P.H. The Beneficial Effects of Diphosphonate and Piroxicam on the Osteolytic and Metastatic Spread of Rat Prostate Carcinoma Cells. *Prostate.* 1986; 8: 81-86.
- 33) Van breukelen, F.J.M, Bijvoet, O.L.M, Van Oosterom, A.T. Inhibition of osteolytic bone lesions by (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1, 1-bisphosphonate (APD). *The Lancet.* 1979: 803-805.
- 34) Coleman, R. Adjuvant bisphosphonate treatment in early breast cancer: meta-analyses of individual patient data from randomised trials. *The Lancet.* 2015;386: 1353–1361.
- 35) Farrell, K.B, Karpeisky, A, Thamm, D.H, Zinnen, S. Bisphosphonate conjugation for bone specific drug targeting. *Bone Reports.* 2018; 9: 47-60.
- 36) Cole, L.E, Vargo-gogola, T, Roeder, R.K. Targeted delivery to bone and mineral deposits using bisphosphonate ligands. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016; 99: 12–27.
- 37) Coxon, F.P, Thompson, K, Rogers, M.J. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol.* 2006; 6: 307–312.
- 38) Weinstein, R.S, Roberson, P.K, Manolagas, S.C. Giant Osteoclast Formation and Long-Term Oral Bisphosphonate Therapy. *N Engl J Med.* 2009; 360: 53-62.

- 39) Soares, A.P et al. Bisphosphonates: Pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth development. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016;42: 212–217.
- 40) Janner, M, Mfihlbauer, R.C, Fleisch, H. Sodium EDTA Enhances Intestinal Absorption of Two Bisphosphonates. *Calcif Tissue Int.* 1991;49: 280-283.
- 41) Delmas, P.D. The Use of Clodronate in Multiple Myeloma. *Bone.* 1991;13(Supl): S31 -S34.
- 42) Lahtinen, R. Randomised, placebo-controlled multicentre trial of clodronate in multiple myeloma. *The Lancet.* 1992;340(8827): 1049-1052.
- 43) Musto, P. The role of bisphosphonate for the treatment of bone disease in Multiple Myeloma. *Leuk Lymphoma.* 1998;31(5-6): 453-462.
- 44) Bauss, F, Russell, R.G.G. Ibandronate in osteoporosis: preclinical data and rationale for intermittent dosing. *Osteoporos Int.* 2004;15: 423–433.
- 45) Gasser, J, Green, Jr. Long-term protective effect of a single intravenous administration of zoledronic acid on cancellous bone structure and cortical bone in ovariectomized rats. *J Bone Min Res.* 2002;17(5): 946-946.
- 46) Sanders, J.M. Quantitative Structure-Activity Relationships for $\gamma\delta$ T Cell Activation by Bisphosphonates. *J Med Chem.* 2004;47: 375-384.
- 47) Ruggiero, S.L. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;71: 1938-1956.
- 48) Marx, R.E. Pamidronate (aredia) and zoledronate (zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61 (Letters to editor): 1115-1118.
- 49) Marx, R.E, Sawatari, Y, Fortin, M, Broumand, V. Bisphosphonate-Induced Exposed Bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the Jaws: Risk Factors, Recognition, Prevention, and Treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63: 1567–1575.
- 50) Khan, A.A, et al. Diagnosis and Management of Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review and International Consensus. *J Bone Min Res.* 2015;30(1): 3–23.
- 51) Lesclous, P, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A key role of inflammation? *Bone.* 2009; 45: 843–852.

- 52) Landesberg, R, Et al. Inhibition of Oral Mucosal Cell Wound Healing by Bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66: 839-847.
- 53) Hansen T, Kunkel M, Weber A, et al. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates—Histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. *J Oral Pathol Med* 35:155, 2006
- 54) Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, et al. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 66:767, 2008.
- 55) Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW, Sedghizadeh PP. The role of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate therapy. *Curr Osteoporos Rep.* 2010 Mar;8(1):40-8.
- 56) Manzano-Moreno, F.J., Ramos-Torrecillas, J., de Luna-Bertos, E. et al. *Clin Oral Invest* 2018.
- 57) Freiburger, J.J, 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: 573-1583.
- 58) Del Fabbro M, Gallesio G, Mozzati M. Autologous platelet concentrates for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw treatment and prevention. A systematic review of the literature. *Eur J Cancer.* 2015;51(1):62-74
- 59) Ripamonti CI et. al. Efficacy and safety of medical ozone (O₃) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: Preliminary results of a phase I-II study. *Oral Oncol.* 2011 Mar;47(3):185-90.
- 60) Nicolatou-galitis, O, Et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: definition and best practice for prevention, diagnosis, and treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018 in press.
- 61) Bocci, V. *Ozônio: Uma nova droga médica.* (1 ed.). PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, Holanda: Springer; 2005.
- 62) Audran, G, Marque, S.R.A, Santelli, M. Ozone, chemical reactivity and biological functions. *Tetrahedron.* 2018;74: 6221-6261.
- 63) Bocci, V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm.* 2004;13(1): 3-11.

- 64) Loeb, B.L. Ozone: Science & Engineering: Thirty-Three Years and Growing. *Ozone Sci Eng.* 2011;33: 329–342.
- 65) Pandiselvam, R, Sunoj, S, Manikantan, M.R, Kothakota, A, Hebbar, K.B. Application and Kinetics of Ozone in Food Preservation. *Ozone Sci Eng.* 2017;39(2): 115–126.
- 66) Potivejkul, S, Pimdee, P. Water Ozonisation/Ozonation for ASEAN Environmental Resource Sustainability: A Structural Equation Model Analysis. *Asia Pac Soc Sci Rev.* 2018;17(3): 142-154.
- 67) Liu J, Zhang P, Tian J, Li L, Li J, Tian JH, Yang K. Ozone therapy for treating foot ulcers in people with diabetes. *Cochrane Database of Syst Rev.* 2015, (10). Art. No.: CD008474.
- 68) Di Paolo N et al. Necrotizing fasciitis successfully treated with extracorporeal blood oxygenation and ozonization (EBOO). *Int J Artif Organs* 2002; 25:1194–1198.
- 69) Agrillo A et al. New Therapeutic Protocol in the Treatment of Avascular Necrosis of the Jaws. *J Craniofac Surg.* 2006 Nov;17(6):1080-3.
- 70) Zanardi I et al. What Is the Best Strategy for Enhancing the Effects of Topically Applied Ozonated Oils in Cutaneous Infections? *Biomed Res Int.* 2013; 702949
- 71) Leon OS, Menendez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Perez L, et al. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediators Inflamm* 1998; 7:289-94
- 72) Borrego A, Zamora ZB, Gonzalez R, Romay C, Menendez S, Hernandez F, et al. Protection by ozone preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatininduced nephrotoxicity in rats. *Mediators Inflamm* 2004; 13:13-9.
- 73) Grant SS e Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence* 2013; 4:4, 273-283.
- 74) García-Heredia A, Kensicki E, Mohny RP, et al. Paraoxonase-1 deficiency is associated with severe liver steatosis in mice fed a high-fat high-cholesterol diet: a metabolomic approach. *J Proteome Res.* 2013.
- 75) Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, et al. Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomed Pharmacother* 2011; 65: 516–24.

- 76) Koçer G, Naziroglu M, Celik O, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Attenuates Bisphosphonate-Induced Oxidative Injury but Decreases Zinc and Copper Levels in Oral Epithelium of Rat. *Biol Trace Elem Res* 2013; 153: 251–6.
- 77) Bagan, J, et al. Oxidative stress in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Pathol Med.* 2014;43: 371–377.
- 78) Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, et al. Ozone oxidative preconditioning inhibits inflammation and apoptosis in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2008; 581:306-14.
- 79) Frascino AV, Mantesso A, Corrêa L, Deboni MC. Aqueous ozone irrigation of bone monocortical wounds in hyperglycemic rats. *Acta Cir Bras.* 2013 May;28(5):327-33.
- 80) Erdemci F 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 Jun;43(6):777-83.
- 81) Zandi, M, et al. Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016; 44: 271-278.
- 82) Fernández, O.S.L, et al. Ozone oxidative preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/ reperfusion. *Transplant Int.* 2008; 21: 39–48.
- 83) Viegas CF. Osteorradionecrose tratada com ozonioterapia em modelo animal: avaliação histológica e imaginológica. Brasília: Universidade de Brasília. Faculdade de Ciências da Saúde, 2018. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde.
- 84) Ripamonti, C.I et al. Efficacy and tolerability of medical ozone gas insufflations in patients with osteonecrosis of the jaw treated with bisphosphonates—Preliminary data Medical ozone gas insufflation in treating ONJ lesions. *J Bone Oncol.* 2012;1: 81–87.
- 85) Agrillo, A, Sassano, P, Rinna, C, Priore, P, Iannetti, G. Ozone Therapy in Extractive Surgery on Patients Treated With Bisphosphonates. *J Craniofacial Surg.* 2007;16(5): 1069-1070.

- 86) Agrillo, A, 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: 1741-1747.
- 87) Steinhart, H, Schulz, S, Mutters, R. Evaluation of ozonated oxygen in an experimental animal model of osteomyelitis as a further treatment option for skull-base osteomyelitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1999; 256: 153–157.
- 88) Duman, I.G, Et al. Effects of Gaseous Ozone Treatment on Bone Regeneration in Femoral Defect Model in Rats. *J Hard Tissue Biology.*2017;26(1): 7- 12.
- 89) 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 Periodont Res* 2013; 48: 722–726.
- 90) Calunga, J.L, et al. Ozone Therapy on Rats Submitted to Subtotal Nephrectomy: Role of Antioxidant System. *Mediators Inflamm.* 2005; 4(2005): 221-227.
- 91) Barber, E, Et al. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediators Inflamm.* 1999; 8: 37–41.
- 92) Siniscalco, D, Et al. Intraperitoneal Administration of Oxygen/Ozone to Rats Reduces the Pancreatic Damage Induced by Streptozotocin. *Biology.* 2018;7(10): 1-13.
- 93) Poubel, V.L.N, Silva, C.A.B, Mezzomo, L.A.M, Canto, G.D.L, Rivero, E.R.C. The risk of osteonecrosis on alveolar healing after tooth extraction and systemic administration of antiresorptive drugs in rodents: a systematic review. *J Craniomaxillofacial Surg.* 2018; 46: 245-256.
- 94) Marino, K.L, et al. Development of a Rat Model of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ). *J Oral Implantol.*2012;38(1): 511-518.
- 95) Janovszky, A, Et al. Periosteal microcirculatory reactions in a zoledronate-induced osteonecrosis model of the jaw in rats. *Clin Oral Invest.* 2015; 19: 1279–1288.
- 96) Vilarinho, J.L.P, Et al. Early bony changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats: A longitudinal in vivo study. *Arch Oral Biol.* 2017; 82: 79–85.
- 97) Moreira, A.M.R. Modelo animal de osteonecrose associada ao uso de bisfosfonato: avaliação das características histopatológicas de hemimandíbulas

- sem extração dentária, Brasília: Universidade de Brasília. Faculdade de Ciências da Saúde, 2018. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde.
- 98) De pPnte, F.S, et al. Effect of bisphosphonates on the mandibular bone and gingival epithelium of rats without tooth extraction. *Exp Ther Med.* 2016; 11: 1678-1684.
- 99) Ağaçayak, K.S, Et al. Experimental investigation of relationship between trauma and bisphosphonate-related osteonecrosis. *Nigerian J Clin Prac.* 2014;17(5): 559-564.
- 100)Howie RN, Borke JL, Kurago Z, Daoudi A, Cray J, Zakhary IE, et al. (2015) A Model for Osteonecrosis of the Jaw with Zoledronate Treatment following Repeated Major Trauma. *PLoS ONE* 10(7).
- 101)Ying, G, Bo, L, Yanjun, J, Lina, W, Binquan, W. Effect of a local, one time, low-dose injection of zoledronic acid on titanium implant osseointegration in ovariectomized rats. *Arch Med Sci.* 2016; 5: 941-949.
- 102)Alqhtani, N.R, Logan, N.J, Meghji, S, Leeson, R, Brett, P.M. Low dose effect of bisphosphonates on hMSCs osteogenic response to titanium surface in vitro. *Bone Rep.* 2017; 6: 64–69.
- 103)Dodson, T.B. Intravenous Bisphosphonate Therapy and Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(1): 44-52.
- 104)Crépin, S, Laroche, M.L, Sarry, B, Merle, L. Osteonecrosis of the jaw induced by clodronate, an alkylbiphosphonate: case report and literature review. *Eur J Clin Pharmacol.* 2010; 66: 547–554.
- 105)Poubel, V.L.N, et al. Evaluation of Mandibular Bone After Dental Extraction in Rats Treated With Antiresorptive Drugs. *J Oral Maxillofac Surg.*2018;76: 474-482.
- 106)Ali-Erdem, M, et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: Animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(7): 879-83.
- 107)Pacheco, V.N, Langie, R, Etges, A, Ponzoni, D, Puricelli, E. Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in rats – a blind randomized controlled trial. *Int J Exp Pathol.* 2015; 96: 255–260.
- 108)Sharma, D, Hamlet, S, Petcu, E, Ivanovski, S. Animal models for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - an appraisal. *Oral Dis.* 2013;19: 747–754.

- 109) Takaoka K, Yamamura M, Nishioka T, Abe T, Tamaoka J, Segawa E, et al. Establishment of an Animal Model of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws in Spontaneously Diabetic Torii Rats. 2015; PLoS ONE 10(12)
- 110) Zhao N, Foster BL, Bonewald LF. The Cementocyte-An Osteocyte Relative? J Dent Res. 2016; 95(7):734-41.
- 111) De Rossi, A, et al. Cementocytes Express Receptor Activator of the Nuclear Factor Kappa-B Ligand in Response to Endodontic Infection in Mice. J Endod. 2016;42(8): 1251-1257.
- 112) Paglioni, M.P, Et al. Intravenous bisphosphonate therapy does not thicken cementum or change periodontal ligaments of cancer patients. Pathol Oral Radiol. 2017;123(5): 591-599.
- 113) Erasquin, J, Muruzabal, M. Necrosis of cementum induced by root canal treatments in the molar teeth of rats. Archs oral Biol. 1967; 12: 1123-1132.



Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 2 de junho de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "ZOLEDRONATO X DENOSUMAB: AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DA ANÁLISE POR MICROTOMOGRAFIA E HISTOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES ÓSSEAS EM MANDIBULAS DE RATAS", Protocolo n.º 34/2017, sob responsabilidade do Professor Paulo Tadeu de Souza Figueiredo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus* (81 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/06/2017 a 1º/06/2018.



Prof. Dra. Paula Diniz Galera
 Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

9. ANEXO