

CAMILA FEIER VIEGAS

**OSTEORRADIONECCROSE TRATADA COM OZONIOTERAPIA EM MODELO
ANIMAL: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMAGINOLÓGICA**

BRASÍLIA

2018

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

CAMILA FEIER VIEGAS

**OSTEORRADIONECCROSE TRATADA COM OZONIOTERAPIA EM MODELO
ANIMAL: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMAGINOLÓGICA**

Dissertação apresentada como requisito 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: Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo

Co-Orientador: Prof. Dr. Sérgio Bruzadelli Macedo

BRASÍLIA

2018

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram e me incentivaram na realização desse sonho.

Aos meus pais, por terem me oferecido o suporte necessário para vencer cada etapa dessa pesquisa. À minha irmã pelo incentivo e compreensão.

Ao meu orientador, Prof. Paulo, por toda a dedicação, orientação, prestatividade e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de realizar o Mestrado, por me acompanhar e me dar forças durante toda essa jornada.

Agradeço grandemente aos queridos professores Paulo Tadeu, André Leite e Nilce Melo pela orientação prestativa, estímulo à pesquisa e dedicação à docência.

Ao Professor Sérgio Bruzadelli, que com seu conhecimento ímpar sobre o assunto estudado, possibilitou a realização desta pesquisa.

Ao Professor Sasha Braum pelos ensinamentos e suporte técnico na realização e interpretação das microtomografias.

Ao Professor Paulo Yamaguti que gentilmente auxiliou nas etapas iniciais da pesquisa, com ensinamentos sempre pertinentes.

À Professora Ana Carolina pela contribuição na análise histológica.

Aos Veterinários Rafael e Ana Luíza, pelo suporte técnico e demonstração da ética no uso animal em pesquisas.

À Professora Ana Tereza por sua contribuição na análise estatística.

Ao Físico Médico Samuel Avelino e ao Médico Radioterapeuta Dr. Marcos Santos, pelos ensinamentos e disponibilidade para as sessões de Braquiterapia.

Aos técnicos do Biotério, pelos cuidados e dedicação aos animais.

Ao amigo Túlio, pela ajuda, empenho e apoio em todas as fases dessa pesquisa.

Aos colegas de mestrado, Andréia, Nathália, Raíza, Daniele e Josy pela empatia, contribuição e força durante a execução da pesquisa.

Ao aluno de graduação Luan Filipe, pela contribuição na fase laboratorial da pesquisa.

À Capes pelo auxílio financeiro.

À FAP-DF pelo suporte financeiro, sem o qual a pesquisa não seria possível.

*“O começo de todas as ciências é o espanto
de as coisas serem o que são”.*

Aristóteles

RESUMO

Introdução: A osteorradição é uma complicação potencialmente grave da radioterapia no tratamento de câncer de cabeça e pescoço. É definida como uma área maior que 1cm de osso exposto, em região previamente irradiada, e que não apresenta nenhuma evidência de cura durante pelo menos três meses. Diversas modalidades terapêuticas foram propostas, mas o seu tratamento permanece, ainda hoje, desafiador. Dentre estas modalidades está a ozonioterapia, considerada promissora devido ao efeito antioxidante e às propriedades bioestimuladoras do ozônio. **Objetivo:** Avaliar por meio de microtomografia computadorizada (Micro-CT) e análise histológica os efeitos terapêuticos do ozônio sistêmico, no osso mandibular murino irradiado. **Métodos:** Vinte ratos Wistar, com idade de 90 dias, foram divididos igualmente em dois grupos: grupo ozonioterapia (OZT) e grupo controle (CNT). Ambos os grupos receberam irradiação através de Braquiterapia de Alta Taxa de Dose (HDR), com dose semanal de 10Gy, durante 5 semanas, totalizando 50Gy de dose de irradiação. O grupo OZT foi submetido à aplicação de gás ozonizado, via insuflação retal, três vezes por semana, durante seis semanas, iniciando uma semana antes do início da radiação ionizante, enquanto o grupo CNT não recebeu qualquer intervenção com ozônio. Todos os animais, de ambos os grupos, foram submetidos ao escaneamento microtomográfico, antes (T0), durante (T1) e após (T2) as intervenções. Os animais foram eutanasiados 15 dias após a finalização dos tratamentos e as peças foram submetidas ao processamento histológico. **Resultados:** A quantificação dos dados microtomográficos mostrou diferença estatisticamente significativa entre o T0 e T2, em ambos os grupos, no parâmetro de Volume ósseo e o Volume da Amostra (BV/TV), evidenciando o desenvolvimento de osteorradição. Nos lados irradiados, a análise histológica demonstrou danos osteogênicos, como desorganização tecidual, fibrose e sinais de necrose. Não foram encontradas diferenças significativas na Micro-CT óssea e nos parâmetros histológicos entre OZT e CNT. **Conclusão:** Nosso modelo animal induziu a osteorradição, permitindo a análise imagiológica e histológica do dano ósseo causado pela radiação. Entretanto, no protocolo utilizado, a ozonioterapia não foi eficaz na prevenção e no tratamento de osteorradição.

Palavras-Chave: Osteorradição, modelo animal, Braquiterapia, Ozonioterapia.

ABSTRACT

Introduction: Osteoradionecrosis is a potentially serious complication of radiation therapy in the treatment of head and neck cancer. It is defined as an area larger than 1 cm of exposed bone in a previously irradiated region, which shows no evidence of cure for at least three months. Several therapeutic modalities have been proposed, but their treatment remains challenging. Among these modalities there is the ozone therapy, which is considered promising due to the antioxidant effect and the biostimulating properties of ozone. **Objective:** To evaluate therapeutic effects of the systemic ozone in the irradiated murine mandibular bone, by means of computerized microtomography and histological analysis. **Methods:** Twenty Wistar rats, aged 90 days, were equally divided into two groups: ozone therapy group (OZT) and control group (CNT). Both groups received irradiation through High Dose Rate Brachytherapy (HDR) with a weekly dose of 10Gy for 5 weeks, totaling 50Gy doses of irradiation. The OZT group was submitted to ozonized gas via rectal insufflation, three times a week for six weeks, starting one week before the beginning of the ionizing radiation while the CNT group received no ozone intervention. All animals of both groups were submitted to microtomographic scanning, before (T0), during (T1) and after (T2) the interventions. The animals were euthanized 15 days after finishing the treatments and their pieces were submitted to histological processing. **Results:** The quantification of the microtomographic data presented a statistically significant difference between T0 and T2 in both groups, in the parameter of Bone Volume and Volume of the Sample (BV/TV), evidencing the development of osteoradionecrosis. On the irradiated sides, the histological analysis showed osteogenic damage, such as tissue disorganization, fibrosis and signs of necrosis. No significant differences were found in the bone Micro-CT and in the histological parameters between OZT and CNT. **Conclusion:** Our animal model induced the osteoradionecrosis, allowing imaging and histological analysis of the bone damaged caused by radiation. However, in the protocol used, the ozone therapy was not effective on the prevention and treatment of osteoradionecrosis.

Key words: Osteoradionecrosis, animal model, Brachytherapy, Ozone therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Timeline* do delineamento da pesquisa do grupo ozonioterapia (OZT)

Figura 2. *Timeline* do delineamento da pesquisa do grupo controle (CNT)

Figura 3. Aquisição das imagens por meio do micro-CT

A/B/C. Aspecto externo do micro-CT *in vivo* Skyscan 1076 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica)

D. Aspecto da canaleta de disposição dos animais para escaneamento microtomográfico

E. Aspecto da disposição do animal dentro da canaleta

F. Aspecto do *software* durante a aquisição das imagens

Figura 4. Alojamento e alimentação dos animais, procedimentos de anestesia, analgesia e sedação dos animais

A. Disposição das gaiolas no biotério

B. Caixa de acomodação dos animais

C. Cloridrato de Cetamina e Xilazina

D. Administração da medicação dos animais

Figura 5. Irradiação com aparelho de braquiterapia e Ozonioterapia

A. Aparelho de braquiterapia

B. Aplicador do tipo sonda

C. Visão ampliada do posicionamento da sonda

D. Visão geral das sessões de braquiterapia

E. Inserção da cânula de nelaton no reto do animal

F. Insuflação retal do gás ozonizado

Figura 6. Região de interesse e reconstruções tridimensionais e bidimensionais de Micro-CT de hemimandíbula esquerda (lado irradiado)

A. ROI trabecular mandibular

B. ROI trabecular mandibular em maior aumento

C/D. Grupo CNT

E/F. Grupo OZT

Figura 7. Comparação dos achados histológicos entre a região mandibular não irradiada e irradiada

A/B. Fotomicrografia do lado direito da mandíbula (lado não irradiado) do grupo ozonioterapia e do grupo controle

C/D/E. Mudanças ósseas arquitetônicas promovidas pela irradiação no lado mandibular irradiado do grupo ozonioterapia (C e D) e do grupo controle (E)

F. Ampliação da área retangular selecionada representada em E

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais trabalhos de indução de osteorradionecrose em modelo animal e resultados histológicos e/ou microtomográficos

Tabela 2. Comparação dos valores médios dos parâmetros estruturais da Micro-CT entre o grupo controle e grupo ozonioterapia

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCP: Câncer de Cabeça e Pescoço

O3: Ozônio

OZT: Ozonioterapia

ORN: Osteorradionecrose

ON: Osteonecrose

BRONJ: Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos

MRONJ: Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de medicamentos

RT: Radioterapia

BQT: Braquiterapia

QT: Quimioterapia

Micro-CT: Microtomografia Computadorizada

TV: Volume Total da Amostra

BV: Volume ósseo

BV/TV: Proporção entre Volume Ósseo e o Volume da amostra

Tb.Th: Espessura Trabecular

Tb.N: Número de trabéculas ósseas

Tb.Sp: Separação trabecular

DF: Dimensão Fractal

ROI: Região de Interesse

HE: Hematoxilina-Eosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Osteorradionecrose: Definição.....	18
2.2 Osteorradionecrose: Epidemiologia	18
2.3 Osteorradionecrose: Patogênese	19
2.4 Achados clínicos.....	20
2.5 Achados radiográficos	20
2.6 Achados Microscópicos.....	21
2.7 Osteorradionecrose: Fatores de risco	22
2.7.1 Osteorradionecrose: Fatores de risco relacionados ao paciente	22
2.7.2 Osteorradionecrose: Fatores de risco relacionados à localização do tumor ...	23
2.7.3 Osteorradionecrose: Fatores de risco relacionados à modalidade de tratamento oncológico	23
2.7.4 Osteorradionecrose: Fatores de risco relacionados à dose de radiação	24
2.7.5 Osteorradionecrose: Fatores de risco relacionados à técnica de radiação	24
2.8 Osteorradionecrose em Modelo Animal	24
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4. MÉTODOS	36
4.1 Amostra	36
4.2 Desenho experimental.....	36
4.3 Microtomografia computadorizada (Micro-CT).....	38
4.4 Sedação animal	40
4.5 Braquiterapia	40
4.6 Ozonioterapia.....	42
4.7 Eutanásia.....	43
4.8 Análise histológica.....	43
4.9 Análise estatística	45
5. RESULTADOS	46
5.1 Parâmetros microtomográficos	47

5.2 Avaliação histológica	47
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE.....	68
ANEXO.....	88

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A incidência de câncer de cabeça e pescoço (CCP) está cada vez mais em ascensão e os tratamentos desse tipo de câncer incluem cirurgia, radioterapia (RT), quimioterapia (QT) ou uma combinação destas modalidades (1). A RT é largamente utilizada como terapia primária ou adjuvante à cirurgia, como tratamento paliativo ou em tumores não ressecáveis (2). Já para o tratamento de câncer de cavidade oral, um tipo específico de RT, a Braquiterapia de Alta Taxa de Dose (HDR), pode ser utilizada (3).

No entanto, altas doses de radiação ionizante, em áreas da cavidade oral como maxila, mandíbula e glândulas salivares podem resultar em efeitos colaterais indesejados, com implicações tanto a curto quanto a longo prazo (1). Dentre os efeitos negativos desta terapia sobre a saúde bucal, estão a diminuição do fluxo salivar, a mucosite, a cárie de radiação e a osteorradionecrose (ORN) (4). A ORN é o efeito adverso mais sério e grave do tratamento combinado dos tumores de cabeça e pescoço (2). É definida como uma área maior que 1cm de osso exposto em região previamente irradiada e que não apresenta nenhuma evidência de cura durante pelo menos três meses (5).

Esse processo patológico afeta mais frequentemente a mandíbula e o diagnóstico clínico inclui história de exposição a uma dose maior de 60 Gy de radiação ionizante (6,7). Os principais sintomas são dor e trismo. Os sinais clínicos incluem a ulceração e/ou necrose da mucosa oral, exposição de osso subjacente, o mau odor, e em estágios avançados, ulceração da pele sobreposta e fratura patológica (8).

Diversas teorias foram propostas para explicar o mecanismo patológico da ORN. A teoria aceita atualmente propõe que a ORN ocorre devido a um processo fibroatrófico local e tardio, induzido pela radiação. Esse mecanismo inclui a formação de radicais livres - espécies reativas de oxigênio - que induzem efeitos endoteliais, inflamatórios e citotóxicos (9).

O tratamento desta condição é bastante desafiador. Ao longo das últimas décadas, diversas modalidades terapêuticas foram propostas, dentre elas, a ozonioterapia. O gás ozônio (O₃) é obtido artificialmente a partir do oxigênio (O₂). Ripamonti et al. (10) relatam que o O₃ apresenta múltiplos efeitos considerados vantajosos, propriedades antimicrobianas, estimulação da reação biológica e

indução do reparo tecidual e ósseo no tratamento de pacientes com lesões de necrose óssea.

Segundo Agrillo et al. (11), o O₃ atua na área necrótica realizando um pré-condicionamento oxidativo, estimulando e/ou preservando o sistema antioxidante endógeno e inibindo a via xantina-oxidase e a consequente geração de espécies reativas de oxigênio. O O₃ também pode exercer um efeito benéfico na circulação sanguínea, aumentando a concentração de células vermelhas, o índice de hemoglobina, a diapedese e os fagócitos.

Em estudos realizados em animais de laboratório, o aumento nas taxas de enzimas antioxidantes foi observado quando realizado o pré-condicionamento oxidativo com O₃. Foglielini et al. (12) realizaram isquemia renal em ratos e verificaram que o grupo de animais submetidos ao pré-condicionamento oxidativo preservou a arquitetura e a função renal em relação aos animais não tratados com O₃. Semelhantemente, Di Filippo et al. (13) induziram isquemia cardíaca também em ratos sem e com pré-condicionamento oxidativo através do uso do O₃ e observaram que o dano cardíaco foi estatisticamente menor no grupo pré-condicionado em relação aos animais do grupo controle, demonstrando a eficácia do O₃ em preservar a arquitetura cardíaca normal.

Portanto, os estudos anteriores demonstraram o efeito do O₃ através do condicionamento oxidativo do organismo, em modelo animal e em estudos clínicos fase I e II. No entanto, a ação do O₃ na prevenção do dano ósseo induzido por radiação não foi avaliada em modelos animais. Considerando que as espécies reativas do oxigênio estão intimamente relacionadas com o aparecimento das sequelas ósseas pós-radioterapia, torna-se fundamental a avaliação da ação prévia do ozônio em animais irradiados, assim como a sua ação no tratamento de ORN.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OSTEORRADIONECROSE: DEFINIÇÃO

Descrita pela primeira vez em 1922 por Regaud, a ORN é uma complicação potencialmente grave da RT no CCP e seu tratamento representa, ainda hoje, um grande desafio (14). Diversas foram as tentativas para definir esta condição patológica. Ewing (15) usou inicialmente o termo "Osteíte de Radiação" para descrever as alterações ósseas após a RT. Desde então, vários termos foram usados, incluindo Osteíte de Radiação, Osteorradionecrose e Necrose Óssea Avascular (16).

Em 1983, Marx (5) definiu ORN como uma "área de exposição óssea maior que 1 cm em local submetido à irradiação e que não apresenta qualquer evidência de cura durante pelo menos seis meses". Já em 1987, Marx e Johnson (17) alteraram a definição de ORN para "a exposição de osso não viável que não cura sem intervenção". Nesse mesmo ano, Epstein et al. (18) definiram ORN como "uma ulceração ou necrose da mucosa, com exposição de osso necrótico há mais de 3 meses".

Outros autores (19,20) propuseram definições semelhantes para a ORN. De acordo com a literatura publicada nos últimos 15 anos, atualmente, a ORN dos maxilares é definida como "osso exposto irradiado que não cicatriza durante um período de 3 meses sem evidência de persistência ou recorrência tumoral" (21-24).

2.2 OSTEORRADIONECROSE: EPIDEMIOLOGIA

A prevalência de ORN varia amplamente na literatura, entre 0,4% a 56% (25-34). É sabido que a mandíbula apresenta maior predisposição ao desenvolvimento de ORN que a maxila. A proporção é de 24:1 (35). A ORN afeta especialmente pacientes com mais de 55 anos (23,33). A sua incidência após extrações dentárias em pacientes irradiados, por sua vez, é estimada entre 2-18% (36,37).

Esta patologia pode ocorrer como consequência da irradiação exclusiva ou adjuvante à cirurgia, seja através da radioterapia de feixe externo, BQT ou da combinação destas modalidades terapêuticas (38). Revisão sistemática feita por Nabil e Samman (39) mostrou diminuição na incidência de ORN em comparação

com estudos mais antigos (25-34). Esse mesmo achado foi evidenciado por Clayman (40), que associou tal resultado à substituição do uso de megavoltagem e supervoltagem na maioria dos aparelhos das unidades de tratamento oncológico que ocorreu no ano de 1968. Segundo ele, a incidência de ORN diminuiu de 11,8% no período anterior para 5,4%.

Além disso, a realização de consultas odontológicas pré-RT para a avaliação das necessidades bucais dos pacientes e realização dos tratamentos odontológicos prévios à terapia de radiação, também foi fator fundamental para o declínio da ORN nos últimos anos. Segundo Ben-David et al. (41), este fator, associado aos avanços na tecnologia da RT e a melhor compreensão da reação do tecido biológico à radiação, foram fundamentais para a redução da incidência de ORN nos últimos anos.

2.3 OSTEORRADIONECROSE: PATOGÊNESE

A patogênese da ORN não é completamente conhecida e ainda está sob minuciosa investigação. Inicialmente, a teoria proposta foi a tríade de radiação, trauma e infecção. No entanto, em 1983 essa teoria foi substituída por outra, na qual se afirmava que a radiação levaria ao desenvolvimento de um tecido hipóxico-hipocelular-hipovascular, ou seja, a teoria 3H (5). A partir disso, foi relatado que os microorganismos não são agentes causadores, mas sim contaminantes na ORN e que o trauma, da mesma forma, propicia a entrada dos microorganismos para invadir o osso irradiado (9).

O processo fibroatrófico induzido por radiação é outro mecanismo proposto e atualmente aceito. Mudanças atróficas no osso são demonstráveis em exames de imagem e podem ser consideradas como o primeiro evento não complicado da ORN. Segundo Howland et al. (42) os eventos relacionados à ORN seguem a seguinte sequência: radiação, atrofia, trauma e exposição óssea. Delanian et al. (9) explicaram que o mecanismo patológico da ORN inclui a formação de radicais livres - espécies reativas de oxigênio - que induzem efeitos endoteliais, inflamatórios e citotóxicos. Três fases clínicas e histopatológicas sucessivas são distinguidas: a fase inflamatória pré-fibrótica, a fase celular fibrótica constitutiva e a fase de remodelação e densificação da matriz, que levam à necrose óssea e tecidual (9).

2.4 ACHADOS CLÍNICOS

A ORN é caracterizada clinicamente pela ulceração ou necrose da mucosa, com exposição de osso necrótico por mais de 3 meses, associada a dor, trismo e supuração, podendo estar presente também anestesia ou disestesia (alteração de sensibilidade) na área. Outros sinais clínicos incluem disgeusia, disfagia, impactação alimentar no local da exposição e halitose. Em estágio de progressão avançado, a ORN pode levar a fraturas patológicas, com presença de fístulas intra ou extraorais (31).

Pacientes submetidos à RT externa ou RT convencional geralmente apresentam alterações no corpo da mandíbula, em região de pré-molar e molar. Já com a BQT, as lesões costumam aparecer nas superfícies lingual ou vestibular da mandíbula (43). A realização de biópsia é obrigatória para o diagnóstico final, a fim de excluir a possibilidade de câncer metastático (44).

2.5 ACHADOS RADIOGRÁFICOS

A ORN é dificilmente detectável em exames de imagem em seu estágio inicial (43). No entanto, em estágios mais avançados, exames radiográficos são constantemente indicados para auxiliar no diagnóstico. Dentre eles estão a radiografia panorâmica, a cintilografia óssea, a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética, a ultrassonografia com Doppler e a espectroscopia infravermelha (11). Inicialmente, a alteração radiográfica que mais caracteriza a ORN é o aumento da radiodensidade, além de lesão mista radiopaca com áreas radiolúcidas, que representam a destruição óssea (44).

O exame de imagem mais frequentemente utilizado para o diagnóstico de ORN é a radiografia panorâmica, que eventualmente poderá ser complementada por outros exames radiográficos. Para que a ORN seja observada nesse tipo de radiografia, é necessário que tenha ocorrido substancial alteração do conteúdo mineral e envolvimento significativo do osso. Segundo Ardran (45), variações radiográficas só são visíveis quando há perda de pelo menos 30% do conteúdo mineral ósseo. Assim, em fases mais tardias a ORN é demonstrada radiograficamente como uma radiolucência indefinida, sem demarcação esclerótica

que envolve a zona de necrose. Áreas radiopacas podem ser vistas quando sequestros ósseos são formados (18).

A cintilografia óssea é outro exame que também pode ser utilizado no diagnóstico de ORN, permitindo estimar a extensão e a localização da lesão. No entanto, embora tenha alta sensibilidade (de até 100%), mostra-se pouco específico (cerca de 60%). Outra desvantagem deste exame é a sua baixa resolução e a sobreposição por tecidos moles (46). O radiofármaco ^{99m}Tc -MDP permite a descrição de lesões mandibulares como resultado de alterações no metabolismo de fosfato (47).

A tomografia computadorizada mostra, por sua vez, alterações ósseas que incluem áreas líticas focais, interrupções das corticais e perda de trabeculado no lado afetado. Essas imagens podem causar dificuldades no diagnóstico diferencial entre ORN e a ocorrência de recidiva tumoral (43). Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) também tem sido utilizada no diagnóstico de ORN, podendo ser um importante meio para a diferenciação entre esta patologia e tumor recidivante (48).

Já a ressonância magnética apresenta como vantagem o contraste do tecido e a alta resolução (46). Com a administração de agentes de contraste como o gadolínio, sinais de osso medular anormal, destruição da cortical e aumento irregular de leve a moderado são observados (49).

2.6 ACHADOS MICROSCÓPICOS

Segundo Marx (5), diversos achados histológicos são observados, como morte endotelial, hialinização e trombose dos vasos com um periósteo fibrótico. Diminuição dos osteoblastos e osteócitos, além de fibrose dos espaços medulares também são relatados. A falta de nucléolos nas lacunas ósseas e a necrose propriamente dita do osso medular são outros aspectos histológicos observados.

É descrita ainda a redução acentuada da celularidade e da vascularização do tecido conjuntivo, cujo resultado é o desenvolvimento de uma mucosa e pele também fibróticas, hipocelulares e hipovasculares (5).

2.7 OSTEORRADIONECCROSE: FATORES DE RISCO

Vários fatores estão associados ao desenvolvimento de ORN como idade, gênero, comorbidades do paciente, tumores da cavidade oral, proximidade do tumor com o osso, estado da dentição, trauma, tipo de tratamento oncológico (cirurgia, técnica de RT) e doses de radiação (39,50). Hábitos relacionados ao paciente, como etilismo e tabagismo também são sugeridos como fatores de risco para ORN nesses pacientes (33,51).

O risco de desenvolvimento de ORN espontânea é maior entre os seis primeiros meses até dois anos após a RT, enquanto o risco de desenvolver ORN induzida por trauma permanece indefinidamente (17). Segundo relatado por Thorn et al. (52), a ORN pode ocorrer após mais de 10 anos de conclusão de RT.

2.7.1 Osteorradioneccrose: Fatores de risco relacionados ao paciente

O uso de álcool e tabaco tem impacto negativo para a ocorrência de ORN (51). Zevallos et al. (53) relataram um aumento de 32% na incidência de ORN nos pacientes que fumaram durante a RT. Raguse et al. (54), por sua vez, evidenciaram que pacientes mais saudáveis tem menor risco de desenvolvimento de ORN.

A condição bucal do paciente antes da RT também é fator essencial para a predição do risco de ORN (55). O risco de desenvolvimento de ORN é aumentado em pacientes com más condições bucais, devido à maior possibilidade de ocorrência de procedimentos dentários traumáticos (30,51,55). Os resultados do estudo de coorte de Raguse et al. (54) sugeriram igualmente que pacientes com má higiene oral apresentam um risco significativamente aumentado de desenvolver ORN. A extração dentária após a RT, no campo de irradiação, também resulta em um risco elevado de ORN (5,30,52,55). Pacientes edêntulos, ao contrário, têm menor risco de desenvolver ORN (30).

2.7.2 Osteorradição: Fatores de risco relacionados à localização do tumor

Tumores localizados em cavidade oral, especialmente em língua, soalho bucal, rebordo alveolar e região retromolar são sítios com maior risco de desenvolvimento de ORN, devido à proximidade da irradiação na região mandibular (33,56,57). Os tumores localizados na região nasofaríngea, por sua vez, apresentam maior risco de desenvolvimento de ORN em maxila (56-58).

Em revisão realizada por Glanzmann e Gratz (59) não foi observada ocorrência de ORN em pacientes irradiados cujos tumores eram localizados fora da cavidade oral, orofaringe ou nasofaringe. De forma semelhante, Thorn et al. (52) relataram que dos 80 casos avaliados em sua série de casos, apenas um desenvolveu ORN fora do campo de radiação, enquanto os outros 79 pacientes desenvolveram nas áreas irradiadas.

Com base nos resultados de sua revisão sistemática, Nabil e Samman (39) presumiram que tumores da cavidade oral ou orofaringe apresentam maior taxa de incidência de ORN devido à inclusão da mandíbula na área de irradiação, visto a sua maior predisposição à ORN quando comparado à maxila. Tumores nasofaríngeos ou sinonasais, por sua vez, apresentam menor risco de ORN, vista a exclusão da maior parte da mandíbula do campo de radiação e a característica de maior resistência à necrose óssea da maxila.

2.7.3 Osteorradição: Fatores de risco relacionados à modalidade de tratamento oncológico

Glanzmann e Gratz (59) não encontraram relação entre a adição de QT ao regime terapêutico oncológico e o aumento do risco de ORN. Em conformidade com este resultado, Nabil e Samman (39) relataram que a realização da QT associada à RT não aumenta o risco de desenvolvimento de ORN. Wang et al. (60) também corroboraram esses resultados em seu estudo.

A associação entre a cirurgia ablativa (resseção óssea ou osteotomia) e a RT, no entanto, oferece maior risco de desenvolvimento de ORN nos ossos residuais (30,33,52). Thorn et al. (52) observaram em seu estudo que 10% dos casos de ORN tiveram início devido à cirurgia do tumor. Raguse et al. (54)

confirmaram que pacientes submetidos à osteotomia pré-RT, especialmente aqueles com ressecções periféricas tem um risco aumentado para a ORN.

2.7.4 Osteorradionecrose: Fatores de risco relacionados à dose de radiação

A dose de radiação é outro fator de risco importante para a ORN. A relação é diretamente proporcional: quanto maior a dose administrada, maior o risco de desenvolvimento de ORN (20,45,55). Para o desenvolvimento de ORN é necessário que a dose de radiação seja de, no mínimo, 60Gy (7). No entanto, segundo Widmark et al. e Thorn et al. (19,52), embora reduzido, o risco de desenvolvimento de ORN não está ausente mesmo em doses abaixo de 60Gy. Além da dose total de radiação, a taxa da dose e o fracionamento também desenvolvem relação com o risco de ORN (18,19,31).

2.7.5 Osteorradionecrose: Fatores de risco relacionados à técnica de radiação

Diferentes modalidades de RT apresentam níveis distintos de risco para o desenvolvimento de ORN (17,30,61,62). Diminuição contínua na taxa relatada de ORN foi observada com o uso de técnicas de radioterapia modernas em comparação com as técnicas anteriormente usadas (63-65). Publicações recentes associaram o uso da Radioterapia de Intensidade modulada (IMRT) e da Radioterapia com Arco Volumétrico (VMAT) a uma possível redução no risco de ORN para 1-7.5% (66-69), além da diminuição de outras complicações na região irradiada, como a hipossalivação (70). Com o uso dessas técnicas de RT, partes da mandíbula podem ser preservadas, reduzindo assim o risco de ORN (68).

Alguns autores (71,72) relatam que a BQT está relacionada ao maior risco de desenvolvimento de ORN devido à proximidade da fonte radioativa com o osso. Store et al. (62) afirmam que nesse tipo de radioterapia, doses maiores de radiação são absorvidas pelo osso.

2.8 OSTEORRADIONECROSE EM MODELO ANIMAL

Na literatura, vários modelos experimentais de indução de ORN utilizando BQT e RT convencional foram descritos. Damek-Poprawa et al. (73) realizaram

estudo com BQT de alta taxa de dose. Oito ratos receberam 50Gy de dose de radiação em sessão única em mandíbula direita, utilizando como fonte radioativa o Iridio-192, mesma fonte utilizada no presente estudo. Adicionalmente, os animais receberam pequenos traumas cirúrgicos nos sítios irradiados. Alterações esqueléticas estruturais e celulares foram avaliadas com Micro-CT, histologia e imunohistoquímica 10 semanas após a irradiação. Os resultados demonstraram eritema e edema pronunciado na área irradiada, além de ulceração dos tecidos moles, ORN e sequestro ósseo.

Cohen et al. (74) realizaram um estudo com o objetivo de criar um modelo animal de ORN na mandíbula, também utilizando BQT de alta taxa de dose. Seis ratos foram irradiados em única dose de 30Gy, enquanto quatro animais serviram como controle. Os molares inferiores de todos os ratos foram extraídos no dia seguinte à irradiação e após 28 dias foi feita a análise microscópica fluorescente, histológica e microtomográfica. Os resultados demonstraram cicatrização completa nas mandíbulas do grupo controle e exposição óssea nos alvéolos de extração dos animais do grupo experimental, que receberam irradiação.

Niehoff et al. (75) também relataram situação semelhante em seu estudo, no qual 24 ratos foram divididos em um grupo tratado com BQT em dose única de 20Gy e um grupo controle não irradiado. Nesse estudo não foi criado trauma cirúrgico ou feita extração dentária. Os autores concluíram, após acompanhamento de 100 dias pós-irradiação, que é possível induzir danos radiogênicos na mandíbula usando BQT com dose única de 20Gy.

Tamplen et al. (76) desenvolveram um protocolo de indução à ORN composto por 10 ratos (6 experimentais e 4 controles), os quais tiveram o segundo molar inferior esquerdo extraído 7 dias após a irradiação de 20 Gy com BQT (no grupo experimental) ou após a simulação de BQT (grupo controle). Os resultados histológicos e microtomográficos evidenciaram o desenvolvimento da ORN na região esquerda da mandíbula dos animais que foram submetidos à BQT e concluíram que o parâmetro microtomográfico utilizado forneceu a quantificação da perda óssea necessária para a determinação da indução de ORN neste modelo animal.

Partindo-se do pressuposto que a mandíbula é mais suscetível à lesão óssea radiogênica e ao desenvolvimento de ORN (25), Armin et al. (77) fizeram um estudo com o objetivo de avaliar os achados clínicos e radiográficos da irradiação direta na maxila de ratos e comparar com os resultados de outro modelo animal de ORN

mandibular recentemente desenvolvido. Dez ratos foram divididos em um grupo experimental que recebeu a BQT na parte esquerda da maxila ($n = 6$) e um grupo controle que recebeu terapia simulada de BQT ($n = 4$). O segundo molar dessa região foi extraído uma semana após a radiação e a maxila analisada clinicamente e microtomograficamente três semanas após a extração dentária. Os autores afirmaram que semelhante à mandíbula, a maxila é suscetível à lesão óssea radiogênica, demonstrada pela diminuição significativa do volume ósseo da maxila do lado irradiado e submetido à extração dental.

Poort et al. (78), por sua vez, investigaram alterações ósseas induzidas pela RT convencional externa. Os animais ($n=16$) foram divididos em quatro grupos, que receberam dosagens de 25Gy, 50Gy, 75Gy e um grupo não irradiado que serviu como controle. Esses animais também foram submetidos à exodontia dos dentes posteriores da hemimandíbula esquerda. Os autores concluíram que ambas as intervenções (extração dentária e RT) causaram alterações no osso irradiado, que levaram ao dano da vascularização óssea e que resultaram em um estado hipóxico crônico do osso mandibular.

Fenner et al. (79) validaram alterações histológicas induzidas por irradiação externa na mandíbula de ratos. As mandíbulas esquerdas de 20 ratos foram irradiadas por meio de RT estereotáxica hipofracionada, com dose total de 60Gy, durante um período de seis semanas. Após um acompanhamento de doze semanas, alterações histológicas atribuídas à ORN foram detectadas em todos os sítios irradiados. Assim, os autores concluíram, a partir da análise histológica, que o protocolo de irradiação utilizado foi adequado para a avaliação do dano ósseo radiogênico.

Outros autores avaliaram o efeito imediato e tardio da teleterapia fracionada por cobalto-60 sobre o percentual médio de osteoplastos em mandíbula de ratos (80). Os animais ($n= 45$) foram divididos em três grupos: grupo 1 ($n= 15$) – submetidos a teleterapia fracionada e eutanasiados logo após a última dose de irradiação; grupo 2 ($n= 15$) – idêntico ao grupo 1, porém mortos 30 dias após a conclusão da RT; grupo 3 ($n= 15$) – não-irradiado, servindo como grupo-controle. O protocolo radioterápico consistiu de 30 sessões de teleterapia, fracionadas em doses de 2 Gy/dia, totalizando 60 Gy. A hemimandíbula esquerda de cada animal foi processada histologicamente e os resultados mostraram que a irradiação, na dose estabelecida, provocou um aumento no número de osteoplastos e na diminuição do

número de osteócitos no tecido mandibular irradiado de ratos, componente importante na etiologia da ORN.

Kuriashi et al. (81) fizeram um estudo experimental para avaliar o efeito da radiação sobre o processo de reparo ósseo em ratos submetidos à extração do primeiro molar superior esquerdo. Dose de 10Gy foi aplicada na maxila esquerda dos animais, em sessão única, e sete dias após foram submetidos à exodontia. Os animais foram eutanasiados três, sete e quatorze dias após a odontectomia e em seguida foi realizada a análise microtomográfica e histológica. Os resultados mostraram diminuição estatisticamente significativa do volume ósseo no grupo irradiado em comparação ao grupo não irradiado. A tabela 1 apresenta os principais trabalhos de indução de ORN em modelo animal e os resultados histológicos e/ou microtomográficos.

Tabela 1. Principais trabalhos de indução de ORN em modelo animal e resultados histológicos e/ou microtomográficos.

REFERÊNCIA	DOSE DE RADIAÇÃO	COLORAÇÃO	MICRO/CT E PARÂMETROS USADOS	RESULTADOS	ENDPOINT	PRINCIPAIS CONCLUSÕES
POORT et al. 2017⁷⁸	25Gy, 50Gy or 70Gy (Convencional)	Masson's trichrome	Não fizeram Micro-CT	A quantidade de fibrose, reação de reabsorção, necrose e as proporções ósseas foram aumentadas após altas doses de radiação. A taxa de remodelação óssea diminuiu após a irradiação.	Fibrose, formação de lacunas, destruição cortical, sequestro ósseo no processo alveolar.	O aumento das doses de irradiação causaram alterações ósseas arquitetônicas e danificaram a vascularização. Isso pode resultar em um estado hipóxico crônico do osso mandibular. Em geral, a taxa de formação óssea foi marcadamente diminuída após a radioterapia.
DAMEK-POPRAWA et al. 2013⁷³	50Gy (Braquiterapia)	HE	BV/TV	Perda óssea.	Osso necrótico acelular com perda de osteócitos, formação de sequestro, vasos rompidos com eritrócitos extravasados e substância moída amorfa eosinofílica infiltrada por células basofílicas.	ORN tem um início mais rápido na mandíbula em relação à tíbia no rato.
COHEN et al. 2011⁷⁴	30Gy (Braquiterapia)	HE, blue, fluorcromo	BV/TV	Redução da formação óssea nas mandíbulas irradiadas.	Fibrose, inflamação, aumento dos osteoclastos	O modelo de braquiterapia HDR que incorporou extrações dentárias pós-RT demonstrou com sucesso dano ósseo mandibular radiogênico reproduzível, análogo à ORN clínica.
TAMPLEN et al. 2011⁷⁶	20Gy (Braquiterapia)	HE	BV/TV	Redução da formação óssea e aumento da presença de fibrose e inflamação. Reduções brutas na largura cortical, diminuição da formação óssea nas áreas de extração e aumento da reabsorção nas áreas traumática e atraumática de	Fibrose, aumento do número de osteoclastos e diminuição dos osteoblastos, redução da formação óssea.	Perda óssea significativa após a radiação e a extração dentária. Este modelo limita com sucesso a quantidade de morbidade animal, aumenta a viabilidade experimental e limita os animais necessários para a experimentação, bem como fornece a evidência histológica de um mecanismo de desequilíbrio celular na patogênese da ORN.

				mandíbulas irradiadas.		
FENNER et al. 2010⁷⁹	60Gy (Convencional)	HE, Elastica/van Giesson	Não realizaram micro-CT	Alterações histológicas atribuídas a ORN (lacunas vazias, fibrose, necrose)	Fibrose, redução do número de células, lacunas vazias e necrose focal foram detectados em todos os locais irradiados	A irradiação externa com uma dose de referência total de 60 Gy é viável em ratos e produz todas as alterações histológicas atribuídas a ORN após um seguimento de 6 semanas.
PELISSER et al. 2007⁸⁰	60Gy (convencional fracionada)	HE	Não realizaram micro-CT	Alterações nucleares nos osteócitos e células endoteliais na área de irradiação caracterizadas pelo surgimento de regiões fracamente coradas, assemelhando-se a bolhas ou vacúolos.	Hipocelularidade no tecido ósseo exposto à radiação.	A diminuição do número de osteócitos no tecido ósseo irradiado é um componente importante na etiologia da osteorradionecrose.
ARMIN et al. 2012⁷⁷	20Gy (Braquiterapia)	Não fez histologia	BV/TV	Redução bruta na largura cortical, redução óssea, formação de fendas na área de extração e aumento da reabsorção em áreas traumáticas e atraumáticas de maxila irradiada em comparação com amostras do grupo controle.	Índice BV/TV significativamente reduzido no grupo experimental em comparação com o grupo controle.	A maxila é altamente suscetível à lesão óssea radiogênica.
KURIHASHI et al. 2002⁸¹	10Gy (Convencional)	HE, Mallory- Azan, ALP (fosfatase alcalina), TRAP	BV/TV	Redução da formação óssea na região irradiada.	Menor quantidade de fibroblastos no tecido de granulação no interior do alvéolo.	Os efeitos de radiação são mais nocivos quando a odontectomia é realizada muito tempo após a exposição ao raio X do que quando é realizada logo após a irradiação.

2.8 OZONIOTERAPIA

O O₃ apresenta-se naturalmente na camada superior da atmosfera, protegendo os seres vivos dos raios ultravioletas. A molécula de O₃ é composta por três átomos de oxigênio (82,83). Por ser mais pesado que o ar, à medida que desce para a terra, combina-se com qualquer poluente que entra em contato e realiza a limpeza do ar (84). A definição da palavra O₃ vem do grego 'ozein' e significa odor, fazendo referência ao seu odor característico e penetrante (85).

A utilização do O₃ para fins terapêuticos tem sido descrita desde o século XIX. O primeiro a mencioná-la, em 1785, foi o físico holandês Martin van Marun, mas foi Christian Friedrich Schonbein, um químico alemão e professor da Universidade de Basileia, em 1840, que demonstrou as mudanças nas propriedades do oxigênio com a formação do gás ozônio (O₃). Dessa forma, Christian Friedrich Schonbein é considerado o pai da ozonioterapia (85).

O gás ozônio é obtido artificialmente a partir do oxigênio (O₂). Possui propriedades antimicrobianas, apresentando atividade bactericida, virucida e fungicida (85). Tem alto potencial de oxidação, sendo 1,5 vezes mais efetivo que o cloreto quando usado como agente antimicrobiano. De acordo com o Comitê Científico Internacional sobre Ozonioterapia (85), o O₃ é capaz de destruir todos os tipos conhecidos de bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo a *Pseudomona aeruginosa* e *Eschericea coli*, bactérias extremamente resistentes aos antibióticos. O efeito antimicrobiano do O₃ pode ser explicado por sua ação direta no citoplasma das células, promovendo a ozonólise de ligações duplas e modificações no conteúdo intracelular (86).

Bocci et al. (87) afirmaram que alguns mecanismos bioquímicos essenciais e o sistema antioxidante podem ser ativados com uma pequena dose de O₃. Além disso, o O₃ também estimula a circulação sanguínea e a resposta imune (80). Tem ainda a capacidade de reagir com componentes sanguíneos (eritrócitos, leucócitos, plaquetas, células endoteliais e sistema vascular), afetando de forma positiva o metabolismo do oxigênio, a energia celular, a imunomodulação e a microcirculação (87,88).

Existem três formas básicas de aplicação do O₃: gás ozonizado, água ozonizada e óleo ozonizado (82). O O₃ pode ser aplicado no corpo através da vagina (89), reto (90), via intramuscular, via subcutânea (91) ou ainda através da

autohemoterapia (92). A aplicação do O₃ está tornando-se cada vez mais comum na prática odontológica e tem sido utilizado em diferentes indicações, como no tratamento de lesões de cárie incipientes, desinfecção de cavidades, canais e bolsas periodontais, lesões herpéticas e úlceras em cavidade oral, além da desinfecção de próteses dentárias (82,93).

Devido às suas propriedades de desinfecção, o O₃ tem sido utilizado na Odontologia também como alternativa ou adicionalmente aos antissépticos padrões. Na cirurgia oral, tem sido proposto o seu uso durante o procedimento cirúrgico e no pós-cirúrgico como desinfetante tópico (94). Segundo Baysan et al. (88) a água ozonizada promove a hemostasia, aumenta o suprimento local de oxigênio e inibe a proliferação bacteriana.

Segundo Ripamonti et al. (10), o O₃ estimula ainda a reação biológica e induz o reparo tecidual e ósseo no tratamento de lesões de necrose óssea. Esses autores associam o seu efeito benéfico à estimulação da proliferação celular e a cicatrização dos tecidos moles. Em estudo semelhante, Ripamonti et al. (95) utilizaram o O₃ em sua forma gasosa para o tratamento de 24 pacientes com lesões de ON > 2,5cm. Todos os pacientes tratados com gás ozonizado, associado ou não à cirurgia para excisão de osso necrótico, apresentaram cura total da lesão.

Agrillo et al. (11) relataram a cura de 94 pacientes com Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos (BRONJ) utilizando a ozonioterapia duas vezes por semana, durante três minutos, num total de oito sessões. Em outro estudo, Agrillo et al. (96) trataram 131 casos de BRONJ com O₃ e em 90% deles obtiveram resultados satisfatórios, com a cura das exposições ósseas. Segundo esses autores, o O₃ induz a formação de sequestro ósseo, aumenta a vascularização do osso subjacente e estimula a formação de tecido de granulação. Consequentemente, a excisão dessa lesão expõe o tecido regenerado, evitando assim, o tratamento cirúrgico.

Petrucci et al. (97) utilizaram também o O₃ no tratamento de ON em pacientes com mieloma múltiplo e sugeriram, com base nos resultados positivos deste estudo, que, se aplicado por 15 dias, a terapia com O₃ pode tratar com sucesso BRONJ. Steinhart et al. (98) avaliaram o efeito da terapia com O₃ no tratamento da osteomielite refratária de cabeça e pescoço e relataram seu efeito benéfico também nessa patologia.

Assim, os estudos apresentados nesta revisão de literatura demonstraram os aspectos clínicos, imaginológicos e histológicos relacionados à ORN e a sua indução em modelo animal. De forma semelhante, o efeito do O₃ através do condicionamento oxidativo do organismo foi demonstrado em diversos estudos clínicos e em estudos de modelo animal, no tratamento de lesões em tecido mole. No entanto, não existem trabalhos na literatura que demonstrem a ação do O₃ sobre o tecido ósseo, especialmente o seu efeito na prevenção e reparo do dano ósseo. Assim, estabelecer um protocolo de indução de ORN em modelo animal que torne viável a avaliação do efeito do O₃ sobre o tecido mandibular irradiado é essencial para a compreensão dos eventos associados a esta patologia e à terapêutica proposta nesse estudo. Assim, este estudo objetiva avaliar histologicamente e imaginologicamente a ORN tratada com ozonioterapia em modelo animal.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar por meio de microtomografia computadorizada e análise histológica os efeitos terapêuticos do ozônio sistêmico no osso mandibular irradiado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar clínica e macroscopicamente os efeitos de altas doses de braquiterapia na mandíbula de ratos*;
- Fazer a caracterização histológica do osso mandibular irradiado e submetido à insuflação da mistura gasosa de ozônio/oxigênio;
- Comparar, por meio de critérios histopatológicos, as características histológicas do tecido ósseo mandibular antes e após as sessões de braquiterapia e ozonioterapia;
- Mensurar as alterações microarquiteturais vistas pela Micro-CT do osso mandibular irradiado entre os grupos;
- Comparar, por meio de microtomografia computadorizada, as características microestruturais do tecido ósseo mandibular antes, durante e após as sessões de braquiterapia e ozonioterapia.

*Estes dados foram apresentados no Trabalho de Conclusão de Curso do Programa de Residência Multiprofissional em Atenção Oncológica – Odontologia, intitulado “Ozonioterapia no manejo de efeitos adversos da braquiterapia em mandíbula: estudo laboratorial em modelo animal experimental” (Pesquisadores responsáveis: Camila Feier Viegas e Prof. Dr. Sérgio Bruzadelli Macedo).

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

Esse estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (CEUA, UnB, Brasília, Brasil) e aprovado sob o protocolo UnBDoc nº 147275/2015.

4.1 AMOSTRA

A amostra foi composta por 20 animais, *Rattus norvegicus albinus* (Wistar), machos, com idade de 90 dias e peso de aproximadamente 250g. Os animais foram mantidos no Biotério de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e climatizados por uma semana antes do início do experimento. Os animais foram selecionados e aleatoriamente distribuídos em 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*.

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Após o período de adaptação no biotério, os ratos foram divididos em dois grupos com 10 animais cada:

- Grupo ozonioterapia (OZT)
- Grupo controle (CNT)

Os animais do grupo ozonioterapia (OZT) foram submetidos à BQT (10Gy), uma vez por semana, durante cinco semanas e à aplicação da mistura gasosa de oxigênio/ozônio (O₂/O₃), via insuflação retal, três vezes por semana, durante seis semanas, iniciando uma semana antes do início da radiação ionizante. Já o grupo controle (CNT) foi submetido apenas à BQT (10Gy), uma vez por semana, durante cinco semanas. Além disso, todos os animais foram submetidos à realização de Micro-CT. O primeiro escaneamento foi obtido no dia zero do experimento, previamente a qualquer intervenção; já a segunda tomada microtomográfica foi realizada na terceira semana do experimento; e o último, ao final das cinco semanas de experimento (Figura 1 e 2).

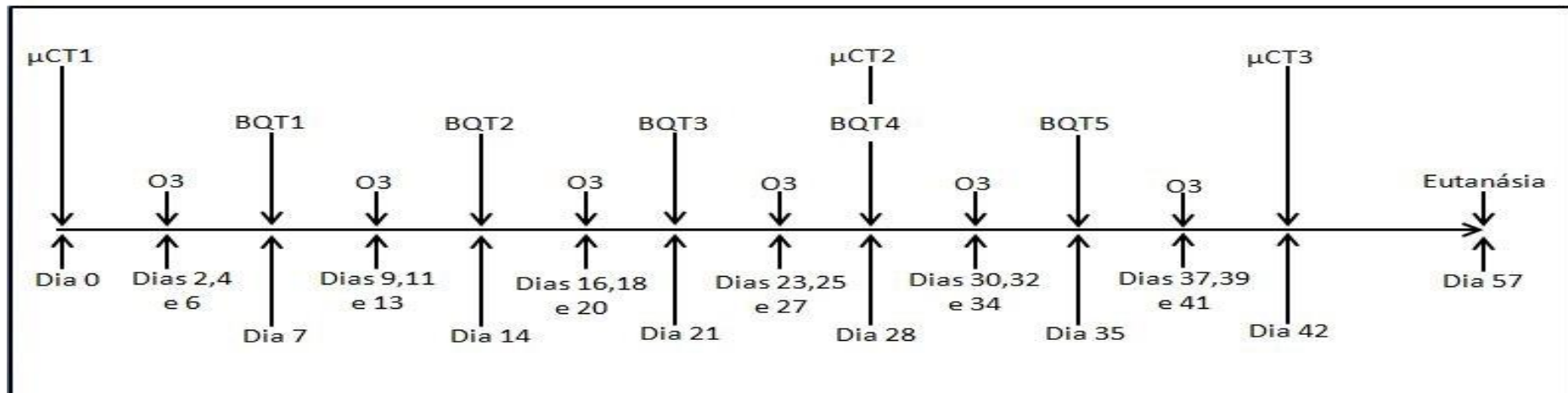


Figura 1. *Timeline* do delineamento da pesquisa do grupo ozonioterapia (μCT: Microtomografia; O3: Ozonioterapia; BQT: Braquiterapia).

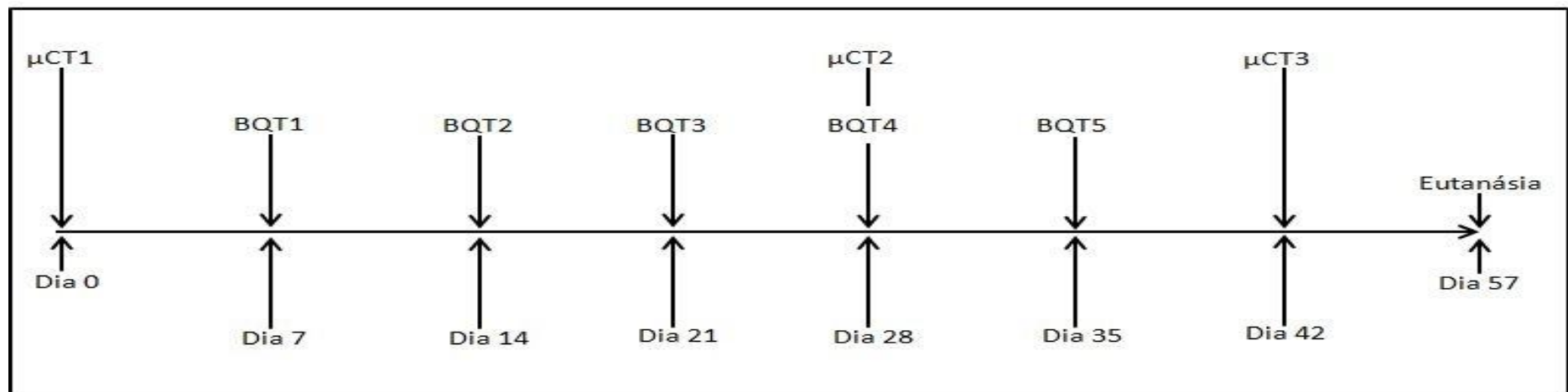


Figura 2. *Timeline* do delineamento da pesquisa do Grupo Controle (μCT: Microtomografia; BQT: Braquiterapia).

4.3 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MICRO-CT)

Para a realização da Micro-CT foi utilizado o aparelho de microtomografia *in vivo* Skyscan 1076 – Bruker MicroCT (Skyscan, Aartselaar, Bélgica), instalado no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Figuras 3 A-F). A Micro-CT foi realizada com tamanho de voxel isotrópico de 36 x 36 x 36µm e um tempo de exposição aproximado de 7 minutos por escaneamento. O escaneamento foi realizado por um único operador, sob supervisão do Professor Sasha Braun.

As reconstruções bidimensionais foram realizadas com o software NRecon (V 1.6.9, versão 64 bits com aceleração GPU, Skyscan, Kontich, Bélgica) e a tridimensional com o CTvox (V 1.5.0, versão 64 bits, Skyscan, Kontich, Bélgica). Em seguida, foram realizadas avaliações por meio das reconstruções multiplanares/2D e reconstruções tridimensionais utilizando o software CT- Analyser (V 1.15.4.0, versão 64 bits, Skyscan, Kontich, Bélgica).

O software utilizado para a medição em três secções (transversal, coronal e sagital) foi o CT- Analyser. Diversos parâmetros microestruturais foram mensurados a partir desse programa. A região de interesse (ROI) para avaliação do osso trabecular em mandíbula foi obtido na região após o primeiro molar, acima do forame mentoniano. Foram selecionadas 20 imagens de interesse por animal. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo avaliador.

Os parâmetros avaliados foram: Volume Total da amostra (TV), Volume ósseo (BV), Proporção entre Volume Ósseo e o Volume da amostra (BV/TV), Espessura Trabecular (Tb.Th), Número de trabéculas ósseas (Tb.N), Separação trabecular (Tb.Sp) e Dimensão Fractal (FD).

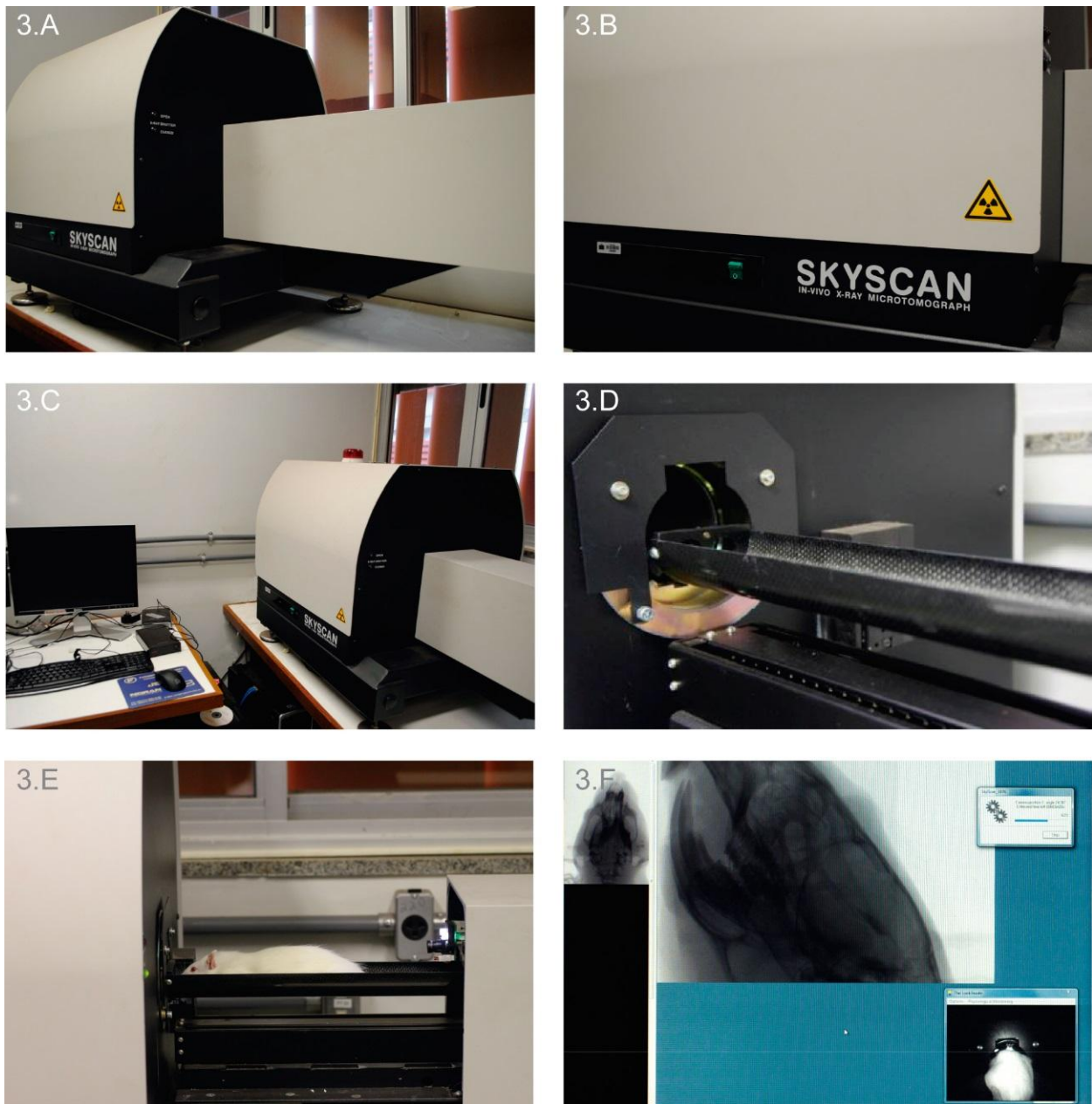


Figura 3. Aquisição das imagens por meio do micro-CT. A, B e C - Aspecto externo do Micro-CT *in vivo* Skyscan 1076 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica); D - Aspecto da canaleta onde os animais a serem escaneados foram dispostos; E- Aspecto da disposição do animal dentro da canaleta. As luzes acesas à direita que correspondem ao local da câmera de monitoramento dos sinais vitais do animal; F- Aspecto do *software* durante a aquisição das imagens.

4.4 SEDAÇÃO ANIMAL

A realização dos escaneamentos microtomográficos e das sessões de BQT seguiu um protocolo adequado para promover a analgesia, a anestesia e a sedação dos animais durante tais procedimentos. Os ratos foram anestesiados com cloridrato de Ketamina 10% e sedados com Xylazina 2% (doses de 100 mg/kg e 10mg/kg respectivamente) aplicados por via intramuscular com agulha hipodérmica 0,30 x 13mm (BD Precision Glide®) (Figuras 4A-D).

4.5 BRAQUITERAPIA

A deposição da dose de radiação foi feita por meio da técnica de BQT de alta taxa de dose, usando como fonte radioativa o Iridio-192, cujas dimensões da fonte cilíndrica utilizadas foram: diâmetro de 1 mm e comprimento de 4 mm (Nucletron, Microselectron HDR, Holanda). Tal equipamento pertence ao serviço de Radioterapia do Centro de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital Universitário de Brasília (CACON/HUB) e foi disponibilizado para realização da pesquisa após os períodos de atendimento aos pacientes oncológicos (Figura 5A-D).

Foi utilizado um aplicador do tipo sonda, que ficou em contato íntimo com a hemimandíbula esquerda dos animais. O comprimento irradiado de mandíbula, percorrido pela fonte radioativa no interior dessa sonda, foi de 1,0 cm. Foram feitas cinco sessões de BQT (1x por semana) com doses diárias de 10 Gy.

Aplicando o modelo de Dose Efetiva Biológica (*Biological Effective Dose*), o fracionamento realizado correspondeu biologicamente a mais de 70 Gy para o fracionamento convencional de 2 Gy por dia em 35 frações. A dose foi prescrita a 0,5 cm do eixo da sonda. A atividade aproximada da fonte radioativa foi de 4,0 Ci (148 GBq) e o tempo médio de exposição à radiação foi de aproximadamente 1 minuto para cada sessão.



Figura 4. Alojamento e alimentação dos animais, procedimentos de anestesia, analgesia e sedação dos animais. A - Disposição das gaiolas no biotério; B - Caixa de acomodação dos animais; C - Cloridrato de Cetamina e Xilazina; D - Administração da medicação dos animais.

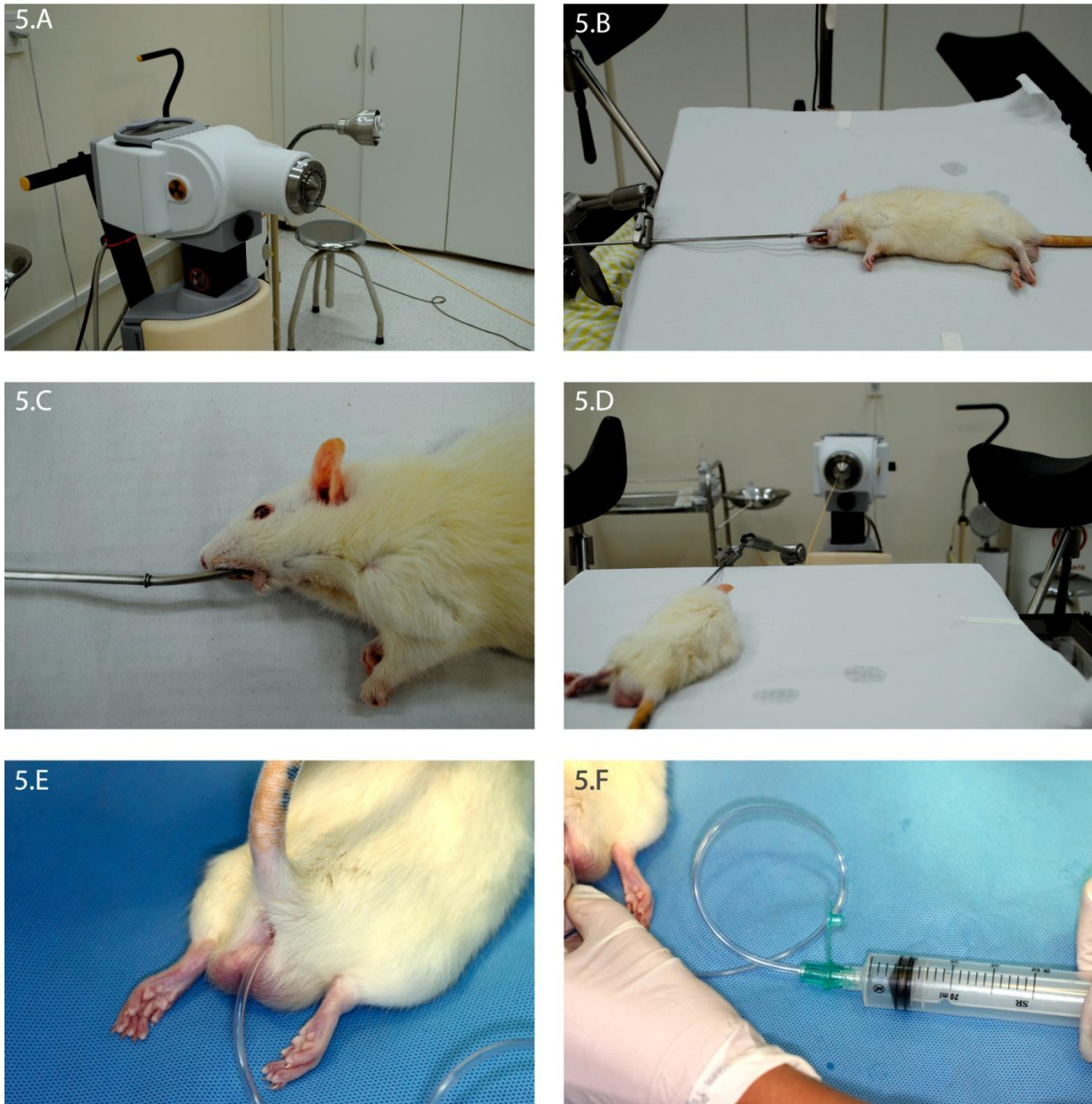


Figura 5. Irradiação com aparelho de Braquiterapia e Ozonioterapia. A – Aparelho de braquiterapia; B – Aplicador do tipo sonda posicionado na cavidade oral em contato com a hemimandíbula esquerda do animal; C – Visão ampliada do posicionamento da sonda; D – Visão geral das sessões de braquiterapia; E - Inserção da cânula de relaton no reto do animal; F - Insuflação retal do gás ozonizado.

4.6 OZONIOTERAPIA

Os animais do grupo OZT receberam insuflação via retal de uma mistura gasosa de ozônio/oxigênio (O₃/O₂), três vezes por semana, durante as seis semanas do experimento, iniciando uma semana antes da primeira sessão de BQT (Figura 5E e F). Esse procedimento foi realizado somente com a contenção do animal, sem a necessidade de anestesia.

A dose de ozônio utilizada foi representada pela concentração de O₃ (expressada por mg/L) pelo volume (L) de gás (O₂-O₃), sendo considerada a concentração de 3% de ozônio e 97% de oxigênio. Dessa forma, uma mistura gasosa O₂-O₃ na concentração de 50µg de ozônio, foi obtida a partir de um gerador de ozônio medicinal (OzoneLife, São Paulo, Brasil) que produz O₃ a partir de oxigênio medicinal (99,5% de pureza), com fluxo constante de 1L/min.

Imediatamente após a obtenção da mistura gasosa, que foi colhida por intermédio de seringa plástica tipo Luer siliconizada, esta foi administrada por insuflação retal, utilizando sonda de Nelaton nº 8, a qual foi inserida 6,0cm no reto do animal com auxílio de gel lubrificante. O protocolo com Ozonioterapia foi constituído de insuflação retal de uma mistura gasosa de O₂-O₃ na concentração de 50µg/mL, totalizando o volume de 4,0-5,0mL por sessão, conforme metodologia adaptada de Fernández et al. (99).

4.7 EUTANÁSIA

Todos os animais, de ambos os grupos, foram submetidos à eutanásia por hipóxia em câmara de gás carbônico 15 dias após a última sessão de BQT, no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As cabeças foram guilhotinadas e fixadas em solução de paraformaldeído a 4% durante 48h para análise histológica.

4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As mandíbulas dos animais foram seccionadas sagitalmente e o excesso de tecido mole dissecado. Após, foram descalcificadas em EDTA 4,13%, com o auxílio

de um processador de tecidos por micro-ondas Biowave.Pro (Pelco/Ted Pella, USA), durante um período de três meses com trocas a cada 72 horas. As hemimandíbulas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 80%, 95% e 100%), as amostras impregnadas no tolueno e incluídas em parafina Paraplast®. Cortes axiais seriados em micrótomo foram realizados, obtendo-se espécimes com 7µm de espessura e após, submetidos a processamento histológico por Hematoxilina e Eosina (HE). Foram analisadas 40 lâminas, correspondentes às hemimandíbulas do grupo OZT e do grupo CNT, divididas da seguinte forma:

Grupo Ozonioterapia (OZT)

- Lado irradiado (esquerdo) - OZTLE
- Lado não irradiado (direito) - OZTLD

Grupo Controle (CNT)

- Lado irradiado (esquerdo) - CNTLE
- Lado não irradiado (direito) - CNTLD

As lâminas foram analisadas seguindo o padrão semi-seriado, em Microscópio biológico binocular 1600x – Opton (Anatomic, São Paulo, Brasil), presente no Laboratório de Histopatologia Bucal, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília. Os seguintes parâmetros foram verificados em cada lâmina, de acordo com Damek-Poprawa et al. (73), Cohen et al. (74); Tamplen et al. (76), Poort et al. (78); Fenner et al. (79) e Pelisser et al. (80):

- Presença de osteoclastos (evidência de reabsorção óssea ativa);
- Desorganização tecidual (alterações ósseas arquitetônicas);
- Fibrose (em substituição ao conteúdo medular normal);
- Sinais de necrose (lacunas vazias ou osteoplastos vazios);
- Necrose (áreas focais ou não);
- Sequestro ósseo (fragmento ósseo desprendido do arcabouço mandibular e com sinais evidentes de necrose).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes às variáveis Volume Total da amostra (TV), Volume ósseo (BV), Proporção entre Volume Ósseo e o Volume da amostra (BV/TV), Espessura Trabecular (Tb.Th), Número de trabéculas ósseas (Tb.N), Separação trabecular (Tb.Sp) e Dimensão Fractal (FD) foram tabulados em planilhas de Microsoft Excel® e avaliados quanto as estatísticas descritivas de média e desvio padrão em função dos grupos CNT e OZT ao longo de três momentos distintos: T0 – momento inicial, dia zero do experimento; T1 – na terceira semana do experimento; T2 – final do experimento, após cinco semanas. Todas as variáveis foram avaliadas do lado esquerdo (lado irradiado).

Uma vez que a experimentação foi realizada em um delineamento inteiramente casualizado, os dados foram avaliados por meio de testes paramétricos. Foi aplicada a Análise da Variância Fatorial para Medidas Repetidas, testando-se a hipótese nula de igualdade de médias entre os grupos experimentais ao longo dos três momentos de análise. Esta análise foi seguida do teste de acompanhamento de LSD-Fisher em caso de significância estatística ($p < 0,05$). As análises foram realizadas nos programas Statistica 7.0 (Statsoft, 2004), assumindo um nível de significância de 0,05.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Da amostra inicial de 20 animais e com a perda de quatro animais, sendo dois do grupo CNT e dois do grupo OZT, a amostra final foi composta, portanto, por 16 animais. A seguir serão apresentados os resultados relativos aos parâmetros microtomográficos analisados e às características histológicas.

5.1 PARÂMETROS MICROTOMOGRÁFICOS

Os parâmetros microtomográficos foram comparados entre oito animais do grupo CNT e oito animais do grupo OZT. Neste estudo, baseado em estudo prévio (100), todas as análises foram comparadas nos três tempos estudados (análise basal, durante e após a braquiterapia), com comparação intragrupo (OZTLE x OZTLD e CNTLE x CNTLD) e entre os dois grupos (CNT x OZT).

A tabela 2 mostra a comparação dos parâmetros da porção óssea trabecular da mandíbula entre os animais do grupo CNT e os animais do grupo OZT. Nesta tabela, observa-se que a análise basal (T0) permitiu a confirmação da normalidade de cada grupo estudado. Não foram identificadas alterações nos parâmetros ósseos microtomográficos no primeiro tempo de avaliação (T1). Após o ciclo de BQT, observou-se um aumento significativo da proporção entre o Volume Ósseo e o Volume da amostra (BV/TV), tanto no Grupo Ozonioterapia quanto no Grupo Controle (entre T0 e T2), uma característica do osso necrótico. Os demais parâmetros, Volume Total da Amostra (TV), o Volume Ósseo (BV), a Espessura Trabecular (Tb.Th), o Número de trabéculas ósseas (Tb.N), a Separação trabecular (Tb.Sp) e a Dimensão Fractal (DF) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tempos avaliados, nos dois grupos. A análise intergrupos (CNT x OZT) não demonstrou diferenças estatisticamente significantes para todos os parâmetros ósseos microtomográficos. A figura 6 apresenta o ROI para avaliação do osso trabecular (6A e B) e as reconstruções tridimensionais e bidimensionais de Micro-CT da hemimandíbula esquerda (lado irradiado), do grupo CNT (6C e D) e do grupo OZT (6E e F).

Tabela 2. Comparação dos valores médios dos parâmetros estruturais da Micro-CT entre o Grupo Controle e Grupo Ozonioterapia.

	Grupo Controle (CNT)						Grupo Ozonioterapia (OZT)					
	T0		T1		T2		T0		T1		T2	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
TV	15.978 ^{aA}	0.008	15.978 ^{aA}	0.006	15.976 ^{aA}	0.010	15.978 ^{aA}	0.007	15.976 ^{aA}	0.009	15.974 ^{aA}	0.004
BV	81.418 ^{aA}	13.988	55.130 ^{aA}	22.602	55.913 ^{aA}	26.889	27.566 ^{aB}	15.185	36.645 ^{aA}	25.768	41.641 ^{aA}	24.826
BV/TV	1.368^{aA}	2.515	18.195^{bA}	15.477	28.199^{bA}	22.937	2.868^{aA}	2.279	15.898^{abA}	15.832	26.067^{bA}	15.538
Tb.Th	7.246 ^{aA}	0.000	9.730 ^{abA}	2.626	11.259 ^{bA}	4.454	8.201 ^{aA}	2.076	9.244 ^{abA}	1.955	10.952 ^{bA}	2.259
Tb.N	0.0001 ^{aA}	0.0003	0.0014 ^{bA}	0.0012	0.0018 ^{bA}	0.0017	0.0005 ^{aA}	0.0004	0.0015 ^{bA}	0.0012	0.0022 ^{bA}	0.0009
Tb.Sp	36.684 ^{aA}	3.929	32.668 ^{abA}	4.914	29.552 ^{bA}	8.534	34.422 ^{aA}	5.213	30.893 ^{aA}	6.314	29.035 ^{aA}	6.655
DF	1.156 ^{aA}	0.267	1.292 ^{aA}	0.352	1.519 ^{aA}	0.428	1.183 ^{aA}	0.190	1.458 ^{abA}	0.337	1.771 ^{bA}	1.183

TV - Volume Total da amostra, BV - Volume ósseo, BV/TV - Proporção entre Volume Ósseo e o Volume da amostra, Tb.Th - Espessura Trabecular, Tb.N - Número de trabéculas ósseas, Tb.Sp - Separação trabecular, DF - Dimensão Fractal. T0 - Avaliação Micro-CT inicial, T1 - Avaliação Micro-CT após 3 sessões de braquiterapia, T2 - Avaliação Micro-CT após 5 sessões de braquiterapia.

^{a,b,c} Comparações intragrupo (linha): as médias seguidas pela mesma letra minúscula não são significativamente diferentes para animais do grupo ozonioterapia ou aqueles do grupo controle ($p > 0,05$).

^{A,B,C} Comparações intergrupos (linha): as médias seguidas pela mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes entre o grupo ozonioterapia e grupo controle ($p > 0,05$).

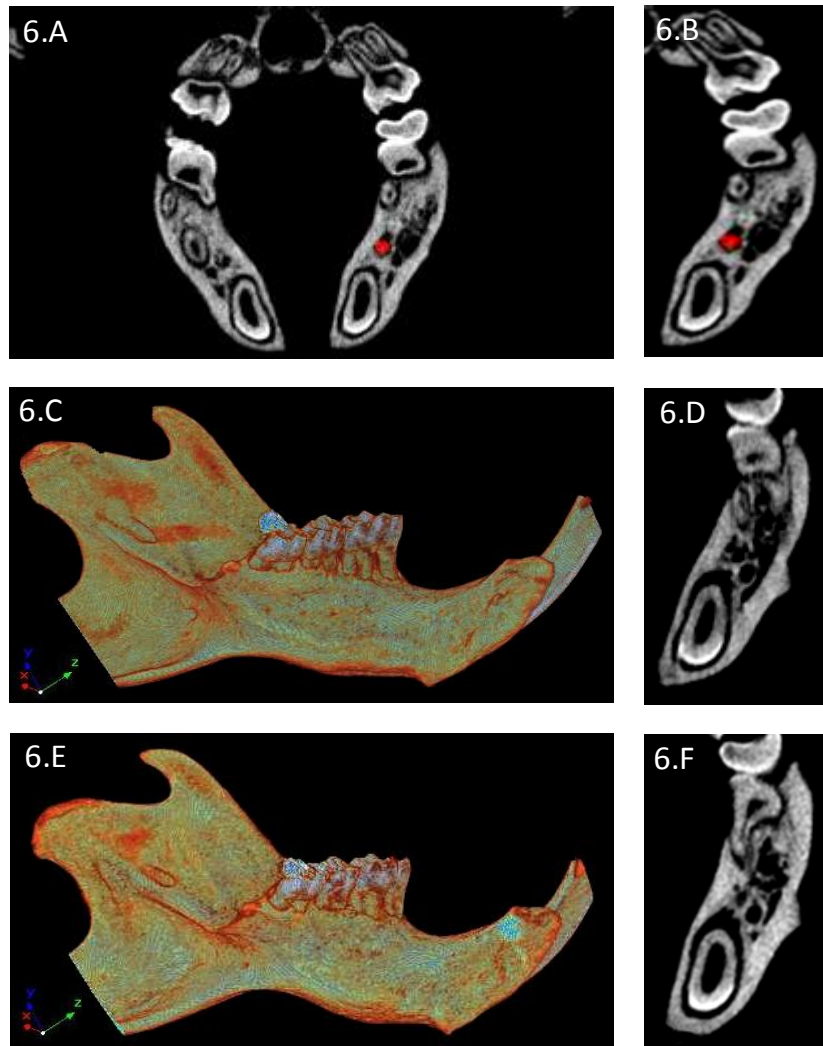


Figura 6. Região de interesse e reconstruções tridimensionais e bidimensionais de Micro-CT de hemimandíbula esquerda (lado irradiado). A – Corte axial demonstrando o ROI trabecular mandibular (círculo em vermelho); B - ROI trabecular mandibular em maior aumento; C e D – Reconstrução tridimensional e bidimensional do grupo CNT; E e F - Reconstrução tridimensional e bidimensional do grupo OZT.

5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Na análise dos grupos irradiados (OZTLE e CNTLE), ambos apresentaram características morfológicas típicas do quadro de ORN. Isto é, observou-se desorganização tecidual, fibrose e em vários pontos, sinais claros de necrose. Os sinais de necrose podem ser vistos pela ausência de osteócitos nos osteoplastos. De forma menos intensa também foram visualizadas áreas compatíveis com sequestro ósseo. A análise dos grupos não irradiados (OZTLD e CNTLD) apresentou características de normalidade óssea, com a manutenção da arquitetura do tecido ósseo (Figura 7A e B). Quando comparados os parâmetros histológicos entre os grupos OZT e CNT, não foram observadas diferenças morfológicas e arquitetônicas (Figura 7C - F). Assim, os resultados obtidos por meio da análise histológica corroboraram os resultados da análise microtomográfica.

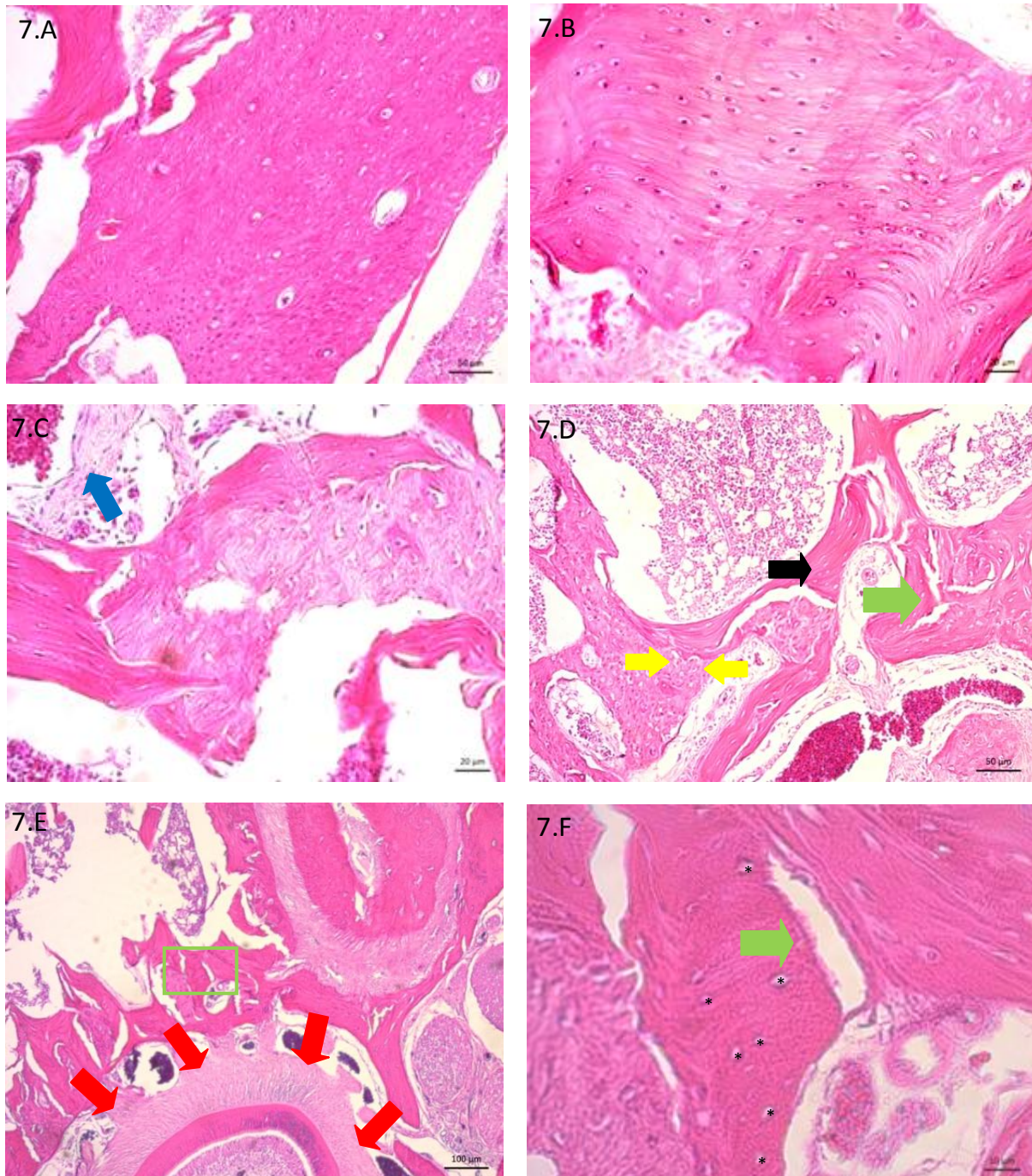


Figura 7. Comparação dos achados histológicos entre a região mandibular irradiada (lado esquerdo) e não irradiada (lado direito). A e B – Grupo ozonioterapia e grupo controle: mandíbula do lado direito (H&E, 10x, 20X). C-E - Mudanças ósseas arquitetônicas promovidas pela irradiação no lado mandibular irradiado do grupo ozonioterapia (C e D) e em E, grupo controle (H&E, 20x, 10x e 5x); F - Ampliação da área retangular selecionada representada em E; (H&E, 40X). Setas verdes (perda da continuidade do osso, possivelmente sequestros ósseos); Seta preta (ausência de osteócitos); Setas amarelas (osteoclastos – reabsorção óssea ativa); Seta azul (fibrose em área medular); Setas vermelhas (dente); Asteriscos (osteoplastos vazios – sinais de necrose).

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Pelo nosso conhecimento, este foi o primeiro trabalho a avaliar, em modelo animal, o efeito da ozonioterapia na prevenção e redução do dano ósseo relacionado à irradiação com BQT. Embora tenha havido clara indução de ORN, neste modelo animal, não houve resultados positivos quanto ao O3. As alterações ósseas típicas da ORN foram perceptíveis nos animais irradiados, tanto no grupo que recebeu ozonioterapia como no grupo que foi somente irradiado pela BQT. Estas alterações foram encontradas em ambas as análises histopatológicas e microtomográficas, corroborando os achados da literatura (Tabela 1). No entanto, o O3 não se mostrou eficaz na redução dos danos ósseos relacionados à RT.

O resultado negativo da ozonioterapia neste protocolo não pode ser comparado uma vez que não existem trabalhos com o mesmo delineamento. No entanto, o O3 em modelo animal já se mostrou eficaz no tratamento de lesões em tecido mole, isquemia e reperfusão cardíaca e renal (12,13,101). Também mostrou resultados positivos no processo de cicatrização de alvéolos dentários em ratos submetidos à exodontia e na aceleração do reparo de defeitos ósseos produzidos na calvária de ratos (102,103). Em estudos clínicos a eficácia do O3 também foi comprovada, embora em outros tipos de ON (10,11,95,96,104). No entanto, ainda que tenha sido testado em outros tipos de ON com resultados positivos, deve-se ressaltar que, tanto do ponto de vista histológico quanto imaginológico, o comportamento da Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de medicamentos (MRONJ) é diferente do comportamento da ORN (105,106). Por esse motivo, o O3 foi selecionado para esse estudo em modelo animal.

Em relação aos efeitos da radiação no tecido ósseo, os nossos resultados corroboram com estudos anteriores (Tabela 1). Os resultados do nosso estudo são reforçados pela coerência entre os resultados histológicos e microtomográficos. Alguns autores mostraram somente a análise histológica (78-80) ou microtomográfica (77). Esse trabalho, assim como Damek-Poprawa et al. (68), Cohen et al. (69) e Tamplen et al. (76), mostrou a correlação entre ambos os resultados. A despeito de pequenas diferenças metodológicas de outros estudos relacionadas à dose, fracionamento da dose, tempo de tratamento, tempo de eutanásia, o modelo experimental utilizado foi eficaz na indução da ORN.

Na análise histológica, ambos os grupos apresentaram desorganização tecidual, fibrose, presença de lacunas vazias, perda de osteócitos e em áreas focais sinais evidentes de necrose óssea. Os resultados histológicos deste estudo estão em conformidade com o trabalho de Fenner et al. (79), o qual relata achados histológicos semelhantes atribuídos também à indução de ORN nos sítios irradiados.

Os resultados microtomográficos estão de acordo com o modelo animal de indução à ORN proposto por Tamplen et al. (76), que buscou analisar o efeito da radiação no osso por meio da análise do volume ósseo. Damek-Poprawa et al. (73), Cohen et al. (74); Armin et al. (77); Kurihashi et al. (81) também fizeram modelo animal semelhante e utilizaram o parâmetro BV/TV (Proporção entre Volume Ósseo e o Volume da amostra), para a análise do dano ósseo radiogênico. Segundo Junquera et al. (107), a medida de proporção de Volume Ósseo (BV/TV) representa a quantidade real de osso na área de interesse e tal valor é geralmente maior no osso necrótico em comparação ao osso saudável. Dessa forma, esses estudos, em consonância com o nosso estudo, evidenciaram o desenvolvimento de ORN nos modelos experimentais utilizados, vistas à diferença estatisticamente significativa entre o tempo inicial (animais sem qualquer intervenção) e o tempo final (após irradiação).

Durante o desenvolvimento desse estudo houve preocupação constante para que o desenho experimental fosse similar ao realizado na prática clínica. Por esse motivo, a BQT foi realizada de forma fracionada (dose de 10Gy por sessão). Ao final das cinco sessões, os 50Gy corresponderam biologicamente a mais de 70Gy para o fracionamento convencional de 2 Gy por dia em 35 frações, aplicando o modelo de Dose Efetiva Biológica (*Biological Effective Dose*). Sabe-se que a dose típica de radiação frequentemente empregada para tumores de cabeça e pescoço em seres humanos está entre 50 e 70Gy (108). Assim, a dose utilizada neste estudo correspondeu àquela que se encontra a maioria dos tratamentos radioterápicos para o CCP. No entanto, o fracionamento do esquema radioterapêutico aumentou a toxicidade dos anestésicos utilizados para a sedação animal durante as sessões de BQT e também para a realização dos escaneamentos microtomográficos. Este fato, associado ainda à desnutrição e à desidratação dos animais, gerados pelos efeitos adversos da radiação, fizeram com a eutanásia fosse antecipada e o tempo de seguimento pós-RT fosse de apenas 15 dias. Apesar disto, o prazo curto pode ser comparável com o estudo de Pelisser et al. (80), o qual pareceu não afetar

sobremaneira os resultados quando contrapostos aos resultados obtidos nos animais submetidos à eutanásia tardia.

Como o dano celular induzido por radiação é atribuído principalmente aos efeitos nocivos dos radicais livres, moléculas com propriedades diretas de eliminação de radicais livres são radioprotetores e particularmente promissoras. Tem sido demonstrado que a administração controlada de O₃ pode promover uma adaptação ao estresse oxidativo, com redução do dano induzido pelas espécies reativas de oxigênio (109). Assim, nós hipotetizamos que o O₃ poderia prevenir e/ou reduzir o dano causado pela irradiação na hemimandíbula esquerda dos animais e para isso foi estabelecido um protocolo de modelo animal que pudesse avaliar esse efeito.

O protocolo de terapia com O₃ utilizado seguiu a metodologia de ozonioterapia sistêmica via retal proposta por Fernández et al. (99). Diferentemente do nosso trabalho que avaliou o potencial de ação do O₃ sobre o tecido ósseo mandibular irradiado, este autor avaliou seu efeito em lesões de isquemia e reperfusão em fígado. Por não haverem trabalhos com o mesmo delineamento que a nossa pesquisa, optamos por utilizar esse protocolo já estabelecido. Durante a realização do nosso experimento, nas sessões de ozonioterapia, a inserção da cânula de Nelaton para a insuflação do gás O₃ produziu estimulação retal com peristalse reflexa nos ratos, fazendo com que eles evacuassem durante ou logo após a aplicação do gás. Dessa forma, supomos que o gás não esteve biodisponível em quantidade suficiente para produzir um efeito, que se esperava ser benéfico. Infere-se assim, baseado nos nossos achados e no relatado por Gultekin et al. (109), Aslan et al. (110) e Schulz et al. (111) que, para a realização de pesquisa utilizando modelo animal, o método de insuflação do O₃ mais adequado seja através da via intraperitoneal.

Da mesma forma, o volume de gás ozonizado utilizado também foi baseado no protocolo de Fernández et al. (99), que propuseram o volume de 5,0-5,5mL por sessão. Erdemci et al. (102) e Kan et al. (103), embora analisando o efeito do O₃ na cicatrização de alvéolos pós-exodontia de molares de ratos e de defeitos ósseos produzidos na calvária de ratos, respectivamente, utilizaram aproximadamente 30mL de O₃ por sessão. O maior volume utilizado em (102,103) pode ter aumentado o percentual de aproveitamento, pelo organismo, do O₃. A diferença da concentração de O₃ também deve ser considerada. Enquanto na presente pesquisa a

concentração utilizada foi de 50µg/mL, nos estudos citados a concentração utilizada foi de 60µg/mL.

Apesar das diferenças metodológicas abordadas, devem-se considerar ainda as distintas características do osso necrótico em comparação ao osso normal. Sabe-se que a formação e o reparo do tecido ósseo dependem da indução regulada de novos vasos sanguíneos dentro de uma zona de crescimento (112) e que a angiogênese tem papel fundamental na formação óssea, através do fornecimento de nutrientes e de oxigênio ao tecido em proliferação (113). O osso irradiado, no entanto, é hipóxico, hipovascular e hipocelular (5). Essas características, especialmente a hipoxicidade e a hipovascularidade, podem ter privado a absorção do O₃ pelo osso necrótico, diminuindo assim a sua biodisponibilidade. Este provavelmente tenha sido o fator mais importante para a não observação de qualquer efeito benéfico do O₃ no osso.

A ausência de estudos com o mesmo delineamento em modelo animal para comparação e reprodutibilidade dos resultados encontrados foi uma limitação importante dessa pesquisa. Assim, propomos, baseados nos estudos citados nessa seção e nos nossos achados, a realização do mesmo modelo animal de indução à ORN, utilizando, no entanto, a via intraperitoneal para a insuflação do O₃, a concentração de 60µg/mL e o volume de 30mL para aumentar a biodisponibilidade do O₃ no osso necrótico e dessa forma, ter possíveis subsídios para avaliar a ação do O₃ na prevenção e tratamento de ORN.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- O modelo animal utilizado nesse estudo foi capaz de desenvolver ORN de forma reprodutível e em consonância com os aspectos histológicos e microtomográficos descritos pela literatura.
- As três fases distintas de Micro-CT possibilitaram observar a temporalidade das alterações ósseas da ORN, bem como afirmar que houve alterações ósseas microestruturais e histopatológicas após a dose de 50Gy em osso mandibular irradiado.
- Foi possível verificar que nesse modelo animal a ozonioterapia não atuou de maneira benéfica, não sendo eficaz na prevenção e no tratamento de ORN.
- Novas pesquisas com o mesmo delineamento de indução à ORN devem ser feitas, com modificações, entretanto, no protocolo de ozonioterapia, seja na dose, volume ou via de administração, com o intuito de aumentar a biodisponibilidade do O₃ no osso necrótico.

REFERÊNCIAS

1. Jawad H, Hodson NA, Nixon PJ. A review of dental treatment of head and neck cancer patients, before, during and after radiotherapy: part 1. *Br Dent J.* 2015 Jan; 218(2):65-8.
2. Madrid C, Abarca M, Bouferrache K. Osteoradionecrosis: An update. *Oral Oncology* 2010; 46:471–474.
3. Unetsubo T, Matsuzaki H, Takemoto M, Katsui K, Hara M, Katayama N, et al. High-dose-rate brachytherapy using molds for lip and oral cavity tumors. *Radiation Oncology.* 2015 Apr; 10:81.
4. Margalit DN, Losi SM, Tishler RB, Schoenfeld JD, Ann Fugazzotto J, Stephens J, et al. Ensuring Head and Neck Oncology Patients Receive Recommended Pretreatment Dental Evaluations. *J Oncol Pract.* 2015 Jan; 11(2):151-4.
5. Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg* 1983; 41(5):283–8.
6. Lye KW, Wee J, Gao F, Neo PS, Soong YL, Poon CY. The effect of prior radiation therapy for treatment of nasopharyngeal cancer on wound healing following extractions: incidence of complications and risk factors. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 36: 315–320.
7. Nabil, S. Samman, N. Incidence and prevention of osteoradionecrosis after dental extraction in irradiated patients: a sistematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011 Mar; 40(3): 229-43.
8. Shaw RJ, Dhanda J. Hyperbaric oxygen in the management of late radiation injury to the head and neck. Part I: treatment. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 49(1):2–8.
9. Delanian S, Lefaix JL. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiotherapy and Oncology.* 2004; 73:119–13.
10. Ripamonti CI, Cislighi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O₃) delivery 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 Oncology.* 2011 Mar; 47(3): 185-90.

11. Agrillo A, Ungari C, Filiaci F, Priore P, Iannetti G. Ozone therapy in treatment of avascular bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *The Journal of Craniofacial Surgery*. 2007 Sep; 18(5): 1071-1075.
12. Foglielini C, Fulgenzi A, Belloni D, Sciorati C, Ferrero E, Ferrero ME. Ozonated autohemotherapy: protection of kidneys from ischemia in rats subjected to unilateral nephrectomy. *BMC Nephrology*. 2011; 12:61.
13. Di Filippo C, Luongo M, Marfella R, Ferraraccio F, Lettieri B, Capuano A, et al. Oxygen/Ozone protects the heart from acute myocardial infarction through local increase of and NOS activity and endothelial progenitor cells recruitment. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2010 Sep; 382(3):287-91.
14. Regaud C. Sur la sensibilité du tissu osseux normal vis-à-vis des rayons X et gamma et sur la mécanisme de l'ostéoradionécrose. *CR Soc Biol* 1922 87: 629–932.
15. Ewing J. Radiation osteitis. *Acta Radiol* 1926 6: 399–412.
16. Jereczek-Fossa BA, Orecchia R. Radiotherapy-induced mandibular bone complications. *Cancer Treat Rev* 2002 28: 65–74.
17. Marx RE, Johnson RP. Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987;64:379-390.
18. Epstein JB, Rea G, Wong FL, Spinelli J, Stevenson-Moore P. Osteonecrosis—study of the relationship of dental extractions in patients receiving radiotherapy. *Head Neck Surg* 1987 10: 48–54.
19. Widmark G, Sagne S, Heikel P. Osteoradionecrosis of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1989 18: 302–306.
20. Wong JK, Wood RE, McLean M. Conservative management of osteoradionecrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997 84: 16–21.
21. Teng MS, Futran ND. Osteoradionecrosis of the mandible. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;13:217–221.
22. London SD, Park SS, Gampper TJ, Hoard MA. Hyperbaric oxygen for the management of radionecrosis of bone and cartilage. *Laryngoscope* 1998 108: 1291–1296.
23. Pitak-Arnnon P, Sader R, Dhanuthai K, Masaratana P, Bertolus C, Chaine A, et al. Management of osteoradionecrosis of the jaws: an analysis of evidence. *Eur J Surg Oncol* 2008 34: 1123–1134.

24. Khojastepour L, Bronoosh P, Zeinalzade M. Mandibular bone changes induced by head and neck radiotherapy. *Indian J Dent Res* 2012 23: 774–777.
25. Morrish RB Jr, Chan E, Silverman S Jr, Meyer J, Fu KK, Greenspan D. Osteonecrosis in patients irradiated for head and neck carcinoma. *Cancer* 1981 47: 1980–1983.
26. Watson WL, Scarborough JE. Osteoradionecrosis in intraoral cancer. *Am J Roentgenol* 1938 40: 524–534.
27. MacComb WS. Necrosis in treatment of intraoral cancer by radiation therapy. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1962 87: 431–440.
28. Grant BP, Fletcher GH. Analysis of complications following megavoltage therapy for squamous cell carcinomas of the tonsillar area. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1966 96: 28–36.
29. Bedwinek JM, Shukovsky LJ, Fletcher GH, Daley TE. Osteoradionecrosis in patients treated with definite radiotherapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and naso- and oropharynx. *Radiology* 1976 119: 665–667.
30. Murray CG, Herson J, Daly TE, Zimmerman S. Radiation necrosis of the mandible: a 10 year study. Part I. Factors influencing the onset of necrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1980 6: 543–548.
31. Epstein JB, Wong FLW, Stevenson-Moore P. Osteoradionecrosis: clinical experience and a proposal for classification. *J Oral Maxillofac Surg* 1987 45: 104–110.
32. Withers HR, Peters LJ, Taylor JM, Owen JB, Morrison WH, Schultheiss TE, et al. Late normal tissue sequelae from radiation therapy for carcinoma of the tonsil: patterns of fractionation study of radiobiology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995 33: 563–568.
33. Reuther T, Schuster T, Mende U, Kübler A. Osteoradionecrosis of the jaws as a side effect of radiotherapy of head and neck tumour patients—a report of a thirty year retrospective review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003 32: 289–295.
34. Daly TE, Drane JB, MacComb WS. Management of problems of the teeth and jaw in patients undergoing irradiation. *Am J Surg* 1972 124: 539–542.
35. Perrier M, Moeller P. Osteoradionecrosis. A review of the literature. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1994 104: 271–277.

36. Marx RE, Johnson RP, Kline SN. Prevention of osteoradionecrosis: a randomized prospective clinical trial of hyperbaric oxygen versus penicillin. *J Am Dent Assoc* 1985; 111: 49–54.
37. Sulaiman F, Huryn JM, Zlotolow IM. Dental extractions in the irradiated head and neck patient: a retrospective analysis of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center protocols, criteria, and end results. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 1123–1131.
38. Toita T, Nakano M, Takizawa Y, Sueyama H, Kakihana Y, Kushi A, et al. Intraoperative radiation therapy (IORT) for head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30: 1219-1224.
39. Nabil S, Samman N. Risk factors for osteoradionecrosis after head and neck radiation: a systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;113:54-69.
40. Clayman L. Clinical controversies in oral and maxillofacial surgery: part two. Management of dental extractions in irradiated jaws: a protocol without hyperbaric oxygen therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:275-81.
41. Ben-David MA, Diamante M, Radawski JD, Vineberg KA, Stroup C, Murdoch-Kinch CA, et al. Lack of osteoradionecrosis of the mandible after intensity-modulated radiotherapy for head and neck cancer: likely contributions of both dental care and improved dose distributions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;68:396-402.
42. Howland WJ, Loeffler RK, Starchman DE, Johnson RG. Postirradiation atrophic changes of bones and related complications. *Radiology* 1975; 117: 677±685.
43. Hermans R, Fossion E, Ioannides C, Van den Bogaert W, Ghekiere J, Baert AL. CT findings in osteoradionecrosis of the mandible. *Skeletal Radiol* 1996 25: 31–36.
44. Guttenberg SA. Osteoradionecrosis of the jaw. *Am J Surg* 1974 127: 326–332.
45. Ardran G. Bone destruction not demonstrable by radiography. *Br J Radiol* 1951 24: 107–109.
46. Bachmann G, Rössler R, Klett R, Rau WS, Bauer R. The role of magnetic resonance imaging and scintigraphy in the diagnosis of pathologic changes of the mandible after radiation therapy. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996 25: 189–195.
47. Alexander JM. Radionuclide bone scanning in the diagnosis of lesions of the maxillofacial region. *J Oral Surg* 1976 34: 249–256.
48. Minn H, Aitasalo K, Happonen RP. Detection of cancer recurrence in irradiated mandible using positron emission tomography. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993 250: 312–315.

49. Storey MR, Garden AS, Morrison WH, Eicher SA, Schechter NR, Ang KK. Postoperative radiotherapy for malignant tumors of the submandibular gland. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001 51: 952–958.
50. Niewald M, Mang K, Barbie O, Fleckenstein J, Holtmann H, Spitzer WJ, et al. Dental status, dental treatment procedures and radiotherapy as risk factors for infected osteoradionecrosis (IORN) in patients with oral cancer - a comparison of two 10 years' observation periods. *Springerplus*. 2014;3:263.
51. Kluth EV, Jain PR, Stuchell RN, Frich JC Jr. A study of factors contributing to the development of osteoradionecrosis of the jaws. *J Prosthet Dent* 1988;59:194-201.
52. Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: clinical characteristics and relation to the field of irradiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58:1088-1093. discussion 1093-1085.
53. Zevallos JP, Mallen MJ, Lam CY, Karam-Hage M, Blalock J, Wetter DW, et al. Complications of radiotherapy in laryngopharyngeal cancer: effects of a prospective smoking cessation program. *Cancer*. 2009;115:4636-4644.
54. Raguse JD, Hossamo J, Tinhofer I, Hoffmeister B, Budach V, Jamil B et al. Patient and treatment-related risk factors for osteoradionecrosis of the jaw in patients with head and neck cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016 Mar;121(3):215-21.
55. Murray CG, Daly TE, Zimmerman SO. The relationship between dental disease and radiation necrosis of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;49:99-104.
56. Evensen JF, Bjordal K, Knutsen BH, Olsen DR, Store G, Tausj JE. Side effects and quality of life after inadvertent radiation overdose in brachytherapy of head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:944-52.
57. van den Broek GB, Balm AJ, van den Brekel MW, Hauptmann M, Schornagel JH, Rasch CR. Relationship between clinical factors and the incidence of toxicity after intra-arterial chemoradiation for head and neck cancer. *Radiother Oncol* 2006;81: 143-50.
58. Cheng SJ, Lee JJ, Ting LL, Tseng IY, Chang HH, Chen HM, et al. A clinical staging system and treatment guidelines for maxillary osteoradionecrosis in irradiated nasopharyngeal carcinoma patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:90-7.
59. Glanzmann C, Grätz KW. Radionecrosis of the mandibula: a retrospective analysis of the incidence and risk factors. *Radiother Oncol* 1995;36:94-100.

60. Wang TH, Liu CJ, Chao TF, Chen TJ, Hu YW. Risk factors for and the role of dental extractions in osteoradionecrosis of the jaws: A national-based cohort study. *Head Neck*. 2017 Jul;39(7):1313-1321.
61. Notani K, Yamazaki Y, Kitada H, Sakakibara N, Fukuda H, Omori K, Nakamura M. Management of mandibular osteoradionecrosis corresponding to the severity of osteoradionecrosis and the method of radiotherapy. *Head Neck*. 2003 Mar;25(3):181-6.
62. Store G, Evensen J, Larheim TA. Osteoradionecrosis of the mandible. Comparison of the effects of external beam irradiation and brachytherapy. *Dentomaxillofac Radiol*. 2001 Mar;30(2):114-9.
63. Schratte-Sehn AU, Handl-Zeller L, Strassl H, Braun OM, Dobrowsky W. Incidence of osteoradionecrosis after combined radiotherapy-chemotherapy of head and neck tumours. *Strahlenther Onkol* 1991; 167: 165-168.
64. Miura M, Takeda M, Sasaki T, Inoue T, Nakayama T, Fukuda H, et al. Factors affecting mandibular complications in low dose rate brachytherapy for oral tongue carcinoma with special reference to spacer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41: 763-770.
65. Dische S, Saunders M, Barrett A, Harvey A, Gibson D, Parmar M. A randomised multicentre trial of CHART versus conventional radiotherapy in head and neck cancer. *Radiother Oncol* 1997; 44: 123-136.
66. Tsai CJ, Hofstede TM, Sturgis EM, Garden AS, Lindberg ME, Wei Q, et al. Osteoradionecrosis and radiation dose to the mandible in patients with oropharyngeal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013;85:415-420.
67. Gomez DR, Estilo CL, Wolden SL, Zelefsky MJ, Kraus DH, Wong RJ, et al. Correlation of osteoradionecrosis and dental events with dosimetric parameters in intensity modulated radiation therapy for head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;81:e207-213.
68. Studer G, Studer SP, Zwahlen RA, Huguenin P, Gratz KW, Lutolf UM, et al. Osteoradionecrosis of the mandible: minimized risk profile following intensity-modulated radiation therapy (IMRT). *Strahlenther Onkol*. 2006;182:283-288.
69. Nguyen NP, Vock J, Chi A, Ewell L, Vos P, Mills M, et al. Effectiveness of intensitymodulated and image-guided radiotherapy to spare the mandible from excessive radiation. *Oral Oncol*. 2012;48:653-657.

70. Beadle BM, Liao KP, Chambers MS, Elting LS, Buchholz TA, Kian Ang K, et al. Evaluating the impact of patient, tumor, and treatment characteristics on the development of jaw complications in patients treated for oral cancers: a SEER-Medicare analysis. *Head Neck*. 2013;35:1599-1605.
71. Katsura K, Sasai K, Sato K, Saito M, Hoshina H, Hayashi T. Relationship between oral health status and development of osteoradionecrosis of the mandible: a retrospective longitudinal study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:731-8.
72. Beumer J, Harrison R, Sanders B, Kurrasch M. Osteoradionecrosis: predisposing factors and outcomes of therapy. *Head Neck Surg* 1984;6:819-27.
73. Damek-Poprawa M, Both S, Wright AC, Maity A, Akintoye SO. Onset of mandible and tibia osteoradionecrosis: a comparative pilot study in the rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Feb;115(2):201-11.
74. Cohen M, Nishimura I, Tamplen M, Hokugo A, Beumer J, Steinberg ML et al. Animal model of radiogenic bone damage to study mandibular osteoradionecrosis. *Am J Otolaryngol*. 2011 Jul-Aug;32(4):291-300.
75. Niehoff P, Springer IN, Açil Y, Lange A, Marget M, Roldán JC, et al. HDR brachytherapy irradiation of the jaw - as a new experimental model of radiogenic bone damage. *J Craniomaxillofac Surg*. 2008 Jun;36(4):203-9.
76. Tamplen M, Trapp K, Nishimura I, Armin B, Steinberg M, Beumer J, et al. Standardized analysis of mandibular osteoradionecrosis in a rat model. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011 Sep;145(3):404-10.
77. Armin BB, Hokugo A, Nishimura I, Tamplen M, Beumer J 3rd, Steinberg ML, et al. Brachytherapy-mediated bone damage in a rat model investigating maxillary osteoradionecrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012 Feb;138(2):167-71.
78. Poort LJ, Ludlage JHB, Lie N, Böckmann RA, Odekerken JCE, Hoebbers FJ, et al. The histological and histomorphometric changes in the mandible after radiotherapy: An animal model. *J Craniomaxillofac Surg*. 2017 May;45(5):716-721.
79. Fenner M, Park J, Schulz N, Amann K, Grabenbauer GG, Fahrig A, et al. Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J Craniomaxillofac Surg*. 2010 Jan;38(1):47-53.
80. Pelisser A, Vier-Pelisser FV, Fontanella VRC, Figueiredo MAZ. Análise microscópica do efeito da radioterapia Fracionada por cobalto-60 em mandíbula de rato. *Radiol Bras* 2007;40(2):113–118.

81. Kurihashi T, Iwata H, Nasu M, Yosue T. Experimental study on wound healing of alveolar bone sockets in the rat maxilla after X-ray irradiation. *Odontology*. 2002 Sep;90(1):35-42.
82. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract* 2008; 9(4): 75-84.
83. Garg R, Tandon S. Ozone: A new face of dentistry. *Int J Dent Sci* 2009; 7: 2.
84. Kagan J. Are You Ready For This – Ozone Therapy. *Ozone Information for Clinicians*. 2003. Available from: <http://www.theozone.cc/HTMLOzoneF/ch37.html>
85. Ozone therapy and its scientific foundations In: *International Scientific Communications Ozonether*. Madrid (Spain): ISCO3 2012.
86. Sujatha B, Manoj Kumar MG, Pratap Gowd MJ. Raja Vardhan. Ozone therapy – a paradigm shift in dentistry. *An Open Access Peer Reviewed E. J Health Sci* 2013; 2(3): 1-10.
87. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev* 2009;29:646–82.
88. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Research* 2000;34:498–501.
89. Daniluk M, Fryczkowski M, Wielicki Z. Application of ozonotherapy in chronic inflammation of the urinary bladder. *Ortop Traumatol Rehabil* 2000;2:61–3.
90. Bocci V, Zanardi I, Borrelli E, Travagli V. Reliable and effective oxygen–ozone therapy at a crossroads with ozonated saline infusion and ozone rectal insufflation. *J Pharm Pharmacol* 2012;64:482–9.
91. Borrelli E. Mechanism of action of oxygen ozone therapy in the treatment of disc herniation and low back pain. *Acta Neurochir Suppl*. 2011;108:123-5.
92. Ciborowski M, Lipska A, Godzien J, Ferrarini A, Korsak J, Radziwon P, et al. Combination of LC–MS- and GC–MS-based metabolomics to study the effect of ozonated autohemotherapy on human blood. *J Proteome Res* 2012;11:6231–41.
93. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dentist* 2008;36: 104–16.
94. Filippi A. Ozone in oral surgery—current status and prospects. *Ozone Sci Eng* 1997;19: 387–93.
95. Ripamonti CI, Maniezzo M, Boldini S, Pessi MA, Mariani L, Cislighi E. Efficacy and tolerability of medical ozone gas insufflations in patients with osteonecrosis of

- the jaw treated with bisphosphonates—Preliminary data. *J Bone Oncol.* 2012 Dec; 1(3): 81–87.
96. Agrillo A, Filiaci F, Ramieri V, Riccardi E, Quarato D, Rinna C, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): 5 year experience in the treatment of 131 cases with ozone therapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012 Nov;16(12):1741-7.
97. Petrucci MT, Gallucci C, Agrillo A, et al. Role of ozone therapy in the treatment of osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Haematologica* 2007;92:1289–1290.
98. 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. *European Archives of Oto-rhino-laryngology* 1999;256:153–7.
99. Fernández LOS, Ajamieh HH, Berlanga J, Menéndez S, Viebahn-Hánsler R, Re L, et al. Ozone oxidative preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/reperfusion. *Transpl Int.* 2008 Jan; 21(1):39-48.
100. Vilarinho JLP, Ferrare N, Moreira AMR, Moura HF, Acevedo AC, Chaves SB, et al. Early bony changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats: A longitudinal in vivo study. *Arch Oral Biol.* 2017 Oct;82:79-85.
101. Calunga JL, Zamora ZB, Borrego A, Río Sd, Barber E, Menéndez S, et al. Ozone therapy on rats submitted to subtotal nephrectomy: role of antioxidant system. *Mediators Inflamm.* 2005(4):221-7.
102. Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M, Bassorgun I, Ozler M, Oter S, et al. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Jun;43(6):777-83.
103. Kan B, Sencimen M, Bayar GR, Korkusuz P, Coskun AT, Korkmaz A, et al. Histomorphometric and microtomographic evaluation of the effects of hyperbaric oxygen and systemic ozone, used alone and in combination, on calvarial defect healing in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015 Jun;73(6):1231.e1-10.
104. Agrillo A, Sassano P, Rinna C, Priore P, Iannetti G. Ozone therapy in extractive surgery on patients treated with bisphosphonates. *J Craniofac Surg.* 2007 Sep;18(5):1068-70.
105. Mitsimponas KT, Moebius P, Amann K, Stockmann P, Schlegel KA, Neukam FW, et al. Osteo-radio-necrosis (ORN) and bisphosphonate-related osteonecrosis of

- the jaws (BRONJ): the histopathological differences under the clinical similarities. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Jan 15;7(2):496-508.
106. Obinata K, Shirai S, Ito H, Nakamura M, Carrozzo M, Macleod I, et al. Image findings of bisphosphonate related osteonecrosis of jaws comparing with osteoradionecrosis. *Dentomaxillofac Radiol*. 2017 Jul;46(5):20160281.
107. Junquera, L., Pelaz, A., Gallego, L., García-Consuegra, L. & Costilla, S. Bisphosphonate-related osteonecrosis associated with dental implants: a microcomputed tomography study. *Implant Dent*. 2014 Jun;23(3):258-63.
108. Cooper JS. The oral cavity. In: Cox JD, Ang KK, editors. *Radiation oncology: Rationale, technique, results*. St. Louis: Mosby; 2003. 219–254.
109. Gultekin FA, Bakkal BH, Guven B, Tasdoven I, Bektas S, Can M, et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on radiation-induced organ damage in rats. *J Radiat Res*. 2013 Jan;54(1):36-44.
110. Aslan MK, Boybeyi O, Senyucel MF, Ayva S, Kisa U, Aksoy N, et al. Protective effect of intraperitoneal ozone application in experimental ovarian ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 2012;47:1730–4.
111. Schulz S, Ninke S, Watzer B, Nußing RM. Ozone induces synthesis of systemic prostacyclin by cyclooxygenase-2 dependent mechanism in vivo. *Biochem Pharmacol* 2012;83:506–13.
112. Wang Y, Wan C, Gilbert SR, Clemens TL. Oxygen sensing and osteogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007;1117:1-11.
113. Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *J Bone Miner Res*. 2009 Aug;24(8):1347-53.

APÊNDICE

The effect of ozone exposure on the mandibular microstructure of irradiated rats: a microtomographic and histologic study

Camila Feier Viegas, Túlio de Lucena Pires; Luan Filipe Alves do Nascimento; André Ferreira Leite; Nilce Santos Melo; Sérgio Bruzadelli Macedo; Sacha Braun Chaves; Samuel Ramalho Avelino; Carla Ruffeil Moreira-Mesquita, Ana Tereza Bittencourt Guimarães, Paulo Tadeu de Souza Figueiredo

Abstract

Background and Purpose: High doses of ionizing radiation can result in adverse effects, such as osteoradionecrosis. Ozone therapy should be investigated as a possible therapeutic approach. This study aimed to evaluate the effect of ozone therapy in the mandibular bone of irradiated rats. **Material and Methods:** Twenty rats were equally divided into two groups: Ozone therapy group (OZT) and Control group (CNT). All animals were irradiated by using High Dose Rate Brachytherapy of 50Gy in the left side of the mandible. In the OZT group, ozone was insufflated via rectal. Animals of both groups performed Computerized Microtomography (Micro-CT) in three experimental phases: prior to any intervention (T0); in the third week of the experiment (T1); and at the end of the five-week (T2). The following Micro-CT parameters were analyzed: Total Volume of the sample (TV), Bone Volume (BV), Bone Volume Ratio and Sample Volume (BV/TV), Trabecular Thickness (Tb.Th), Number of bone trabeculae (Tb.N), Trabecular Separation (Tb.Sp), Fractal Dimension (FD), Mandibular Cortical Width (MCW). Histological qualitative analysis was also performed. ANOVA test was used to compare Micro-CT bone parameters during the three phases of the experiment. **Results:** The radiotherapeutic protocol was effective in developing osteoradionecrosis. After the Brachytherapy cycle (between T0 and T2), BV/TV and MCW increased both in the OZT group and in the CNT group. In the histological analysis of the irradiated sides, typical osteoradionecrosis morphological characteristics, such as tissue disorganization, fibrosis, and clear signs of bone necrosis were observed. No significant differences were found in bone Micro-CT and histological parameters between OZT and CNT. **Conclusions:** In conclusion, our animal model was able to develop osteoradionecrosis in a reproducible way with structural bony changes detected in

both Micro-CT and histological analyses. On the other hand, ozone therapy was not effective for the prevention and treatment of osteoradionecrosis.

Keywords: Osteoradionecrosis; Brachytherapy; Ozone therapy; Animal model; Rat.

Introduction

In the treatment of the head and neck tumours, radiotherapy (RT) is frequently used, either in primary therapy or adjuvant to surgery, as palliative treatment or in nonresectable tumors [1]. Brachytherapy (BQT) is an alternative to conventional RT and can be used as a single treatment, complementary to surgery or as a local boost in combination with conventional RT [2].

High doses of ionizing radiation can result in adverse effects, such as osteoradionecrosis (ORN). ORN is defined as an area larger than 1 cm of exposed bone in a previously irradiated region and has no evidence of cure for at least six months [3]. It affects mainly the jaw and clinical diagnosis includes history of exposure to a higher dose of 60 Gy of ionizing radiation [4].

The clinical signs are ulceration and/or necrosis of the oral mucosa, underlying bone exposure, oral malodour. Ulceration of the overlapping skin and pathological fracture can be found in advanced stages [3].

Treatment of this condition is challenging and generally requires multiple therapeutic approaches. Over the last decades, several treatment modalities have been proposed, i.e ozone therapy. Ozone gas (O₃) is artificially obtained from oxygen (O₂). Some authors have demonstrated the positive effect of ozone in preventing ORN and healing multiple post-extraction wounds at previously irradiated sites of a patient [5]. Based on the positive results in this case report, these authors indicated that ozone therapy may be a therapeutic option for the prevention and treatment of ORN.

The present study aimed to evaluate the effect of ozone therapy in the mandibular bone of rats irradiated by High Dose Rate (HDR) BQT. All of the animals were analyzed histologically and by computerized microtomography.

Materials and Methods

The present study was submitted to the Ethics Committee on Animal Use of the Biological Sciences Institute of the University of Brasília (CEUA, UnB, Brasilia, Brazil) and approved under the protocol UnBDoc nº 147275/2015.

Animals

Twenty male *Rattus norvegicus albinus* (Wistar), aged 90 days and weight of approximately 250g were randomly distributed in polypropylene boxes with zinc plated lids, at a mean temperature of $23^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ and with access to feed and water *ad libitum*. For the BQT sessions and microtomographic scans, the animals were anesthetized with 10% Ketamine hydrochloride and sedated with 2% Xylazine (doses of 100 mg/kg and 10 mg/kg, respectively) intramuscularly.

Experimental design

The rats were equally divided into two groups: Ozone therapy group (OZT) and Control group (CNT). All animals were irradiated by using BQT (10Gy per session) in the left side of the mandible, once a week for five weeks. Therefore, the total dose of irradiation was 50Gy.

Additionally, in the OZT group Oxygen/Ozone gas (O₂/O₃) was insufflated via rectal three times a week for six weeks, starting one week before the onset of ionizing radiation. Furthermore, the animals of both groups were submitted to Computerized Microtomography (Micro-CT). The first scanning was obtained on day zero of the experiment, prior to any intervention (T₀); the second microtomographic test was performed in the third week of the experiment (T₁); and the latter at the end of the five week (T₂). The right mandibular side of the animals (non-irradiated side) of each group served as a control for intragroup comparison.

Irradiation

For irradiating the animals, HDR BQT technique was performed using Iridium-192 as a radioactive source. The dimensions of the cylindrical source were, as follows: diameter 1 mm and length 4 mm (Nucletron, Microselectron HDR, The Netherlands). A sterile metallic HDR catheter was implanted across the left

mandibular first molar in both groups (OZT and CNT). The irradiated jaw length traversed by the radioactive source inside the probe was 1.0 cm.

Applying the Biological Effective Dose model [6], the fractionation performed corresponded biologically to more than 70 Gy for the conventional fractionation of 2 Gy per day in 35 fractions. The dose was prescribed 0.5 cm from the probe axis. The approximate activity of the radioactive source was 4.0 Ci (148 GBq) and the mean exposure time to radiation was approximately 1 minute for each session. This protocol was followed according to the technical recommendations of the physical-medical team of our institution.

Computerized microtomography

In order to perform the Micro-CT, the Skyscan 1076 (Skyscan, Aartselaar, Belgium) *in vivo* microtomography apparatus was used. Micro-CT was performed with isotropic voxel size of 18 x 18 x 18 μm and an approximate exposure time of 1.5 minutes per scan. The X-ray source, with a focal size of 5 μm and a power range of 20 to 100 KeV, and the detector (CCD camera 2.3 x 4K) rotated around the animal inside the machine.

Two-dimensional reconstructions were performed with the NRecon software (V 1.6.9, 64 bit version with GPU acceleration, Skyscan, Kontich, Belgium). Then, evaluations were performed through multiplanar/2D reconstructions and three-dimensional reconstructions using the CT-Analyzer software (V 1.15.4.0, version 64 bit, Skyscan, Kontich, Belgium). The region of interest (ROI) for evaluating trabecular bone in the left hemisphere was obtained in the region below the lingual root of the first molar, between the lingual cortical and the mandibular canal, based on a previous study [7] (Figure 1A).

All procedures were performed by the same observer. The parameters evaluated were: Total Volume of the sample (TV), Bone Volume (BV), Bone Volume Ratio and Sample Volume (BV/TV), Trabecular Thickness (Tb.Th), Number of bone trabeculae (Tb.N), Trabecular Separation (Tb.Sp) and Fractal Dimension (FD).

In addition, measurements of cortical width on the same side were also made to evaluate the effect of irradiation on this region of the bone. Thus, three parallel lines were made, one above, one below and one across the center of the trabecular ROI (Figure 1B). The width of the cortical on the left side of the mandible was

measured using the central line as reference. The cortical measurement protocol was adapted from a previous animal study [8].

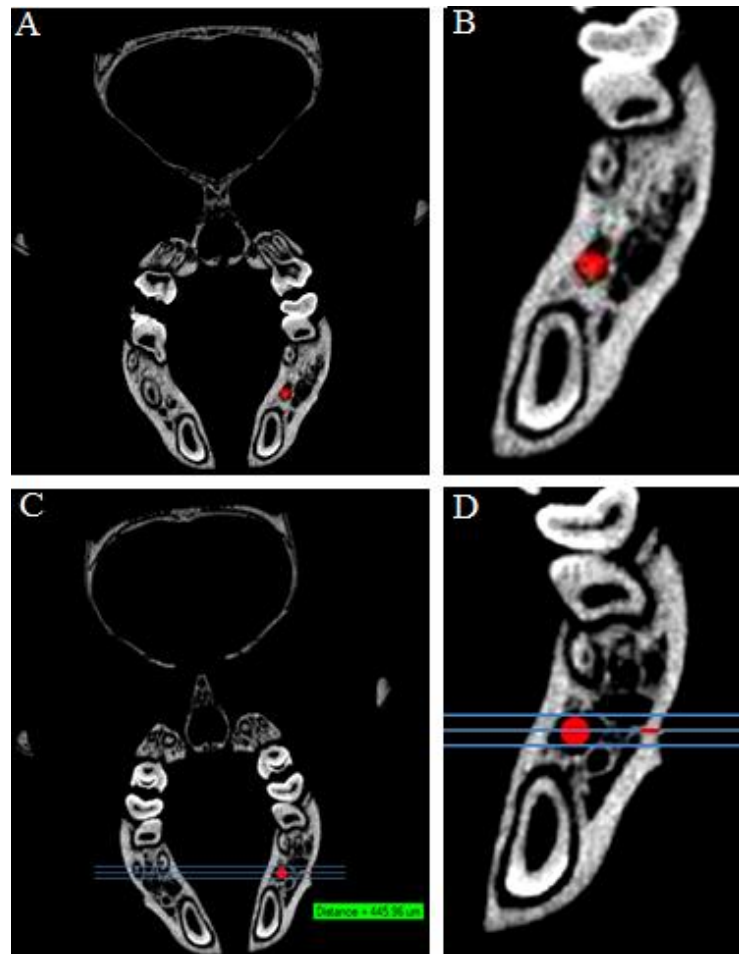


Figure 1. Micro-CT representation of the trabecular and cortical measurements. A and B – Region of interest for the trabecular parameters (circle). C and D – Mandibular cortical width measurement.

Ozone therapy

The Ozone therapy protocol was adapted from a previous study [9]. OZT rats were subjected to rectal insufflation of a gas mixture of O₃ and O₂ (97% O₂ + 3% O₃) three times a week for the six weeks of the experiment, starting one week before the first BQT. Ozone gas was generated from an OzoneLife medical ozone generator (Ozone & Life, Brazil). Immediately after obtaining the gas mixture, collected by a 10mL plastic syringe, a Nelaton No. 8 probe was inserted 6.0cm into the rectum of

the animal with the aid of lubricating gel and the insufflation of 4.0-5.0mL of ozonated gas by session with a concentration of 50µg.

Euthanasia

All animals from both groups underwent euthanasia by hypoxia in a carbon dioxide chamber 15 days after the last session of BQT. After decapitation, the heads were fixed in 4% paraformaldehyde solution for 48h for histological analysis.

Histological analysis

The jaws of the animals were sectioned sagittally, and they were decalcified in 4.13% EDTA for a period of three months. The mandibles were dehydrated in increasing concentrations of ethyl alcohol, impregnated with toluene and included in Paraplast® paraffin. Seven micro metre thick sections were cut and attached to coated glass slides. Haematoxylin-Eosin was used for routine staining. Thirty-one slides of the OZT and CNT groups were analyzed in a 1600x Optical Binocular Microscope (Anatomic, São Paulo, Brazil), corresponding to the left side of the mandible (irradiated side, OZTLS and CNTLS) and the right side of the mandible (non-irradiated side, OZTRS and CNTRS).

The following parameters were evaluated histologically [10-16]: presence of osteoclasts (evidence of active bone resorption), tissue disorganization (architectural bony changes), fibrosis (shifting the normal marrow tissue), necrosis signs (empty osteoplasts), necrosis (focal or non-focal areas) and bone sequestration (bone fragment detached from the mandibular scaffold and with obvious signs of necrosis).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed by the Statistica 7.0 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. Descriptive analysis was presented for the Micro-CT parameters data based on the groups (CNT and OZT) and assessment phases (T0, T1 and T2). The factorial analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used to compare the groups during the three phases of the experiment, followed by the (LSD)-Fisher test in case of statistical significance. All analyzes were performed in the three experimental times (baseline analysis, during and after brachytherapy), with

intragroup comparison (OZTLS x OZTLS and CNTRS x CNTRS) and between the two groups (CNT x OZT).

Results

Four animals were lost (two from the OZT group and two from the CNT group). Table 1 presents intra- and intergroup comparisons. The baseline analysis (T0) allowed the confirmation of the normality of each studied group. No changes in Micro-CT bone parameters were identified at the second evaluation time (T1). After the BQT cycle (between T0 and T2), a significant increase of BV/TV was observed both in the OZT group and in the CNT group, a characteristic of the necrotic bone. The other parameters did not present significant differences between the evaluated times in both groups. Regarding the intergroup analysis (CNT x OZT), no statistically significant differences for all Micro-CT bone parameters were also found.

When evaluating the thickness of the mandibular cortical, there were no significant differences when the interaction of the period and group factors was evaluated ($F_{2, 22} = 0.025$, $p = 0.975$, Table 2). Throughout the three measurements, both groups presented increased mandibular cortical thickness ($p < 0.05$), however, there were no statistical differences between the groups ($p > 0.05$) (Figure 2).

In the histological analysis of the irradiated sides (OZTLS and CNTLS), both had typical ORN morphological characteristics, such as tissue disorganization, fibrosis, and at various points, clear signs of bone necrosis were observed. The analysis of the non-irradiated sides (OZTRS and CNTRS) presented characteristics of bone normality (Figure 3A and 3B). When comparing the histological parameters between OZT and CNT groups, there were no morphological and architectural differences (Figure 3, C to F). Thus, the results obtained through the histological analysis corroborated the results of the Micro-CT analysis.

Table 1. Comparison of mean values of all structural Micro-CT bone parameters among control group and ozone therapy group

	Control Group (CNT)						Ozone therapy Group (OZT)					
	T0		T1		T2		T0		T1		T2	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
TV	15.978 ^{aA}	0.008	15.978 ^{aA}	0.006	15.976 ^{aA}	0.010	15.978 ^{aA}	0.007	15.976 ^{aA}	0.009	15.974 ^{aA}	0.004
BV	81.418 ^{aA}	13.988	55.130 ^{aA}	22.602	55.913 ^{aA}	26.889	27.566 ^{aB}	15.185	36.645 ^{aA}	25.768	41.641 ^{aA}	24.826
BV/TV	1.368^{aA}	2.515	18.195^{bA}	15.477	28.199^{bA}	22.937	2.868^{aA}	2.279	15.898^{abA}	15.832	26.067^{bA}	15.538
Tb.Th	7.246 ^{aA}	0.000	9.730 ^{abA}	2.626	11.259 ^{bA}	4.454	8.201 ^{aA}	2.076	9.244 ^{abA}	1.955	10.952 ^{bA}	2.259
Tb.N	0.0001 ^{aA}	0.0003	0.0014 ^{bA}	0.0012	0.0018 ^{bA}	0.0017	0.0005 ^{aA}	0.0004	0.0015 ^{bA}	0.0012	0.0022 ^{bA}	0.0009
Tb.Sp	36.684 ^{aA}	3.929	32.668 ^{abA}	4.914	29.552 ^{bA}	8.534	34.422 ^{aA}	5.213	30.893 ^{aA}	6.314	29.035 ^{aA}	6.655
DF	1.156 ^{aA}	0.267	1.292 ^{aA}	0.352	1.519 ^{aA}	0.428	1.183 ^{aA}	0.190	1.458 ^{abA}	0.337	1.771 ^{bA}	1.183

TV - Total Sample Volume, BV - Bone volume, BV/TV - Proportion between Bone volume and Sample volume, Tb.Th - Trabecular Thickness, Tb.N - Number of trabeculae bone, Tb.Sp - Trabecular separation, DF - Fractal Dimension T0 – Initial Micro-CT evaluation, T1- Micro-CT Evaluation after 3 brachytherapy sessions, T2 - Micro-CT Evaluation after 5 brachytherapy sessions .

^{a,b,c} Within-group comparisons (row): the averages followed by the same lowercase letter are not significantly different for animals in the ozone therapy group or those in the control group ($p > 0.05$).

^{A, B, C} Between-group comparisons (row): the averages followed by the same capital letter are not significantly different between the ozone therapy group and the control group ($p > 0.05$).

Table 2. Comparison of mean values of mandibular cortical width among control group and ozone therapy group.

	Control Group (CNT)			Ozone therapy Group (OZT)		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2
Mandibular cortical width (mean)	369.4 ^{aC}	477.3 ^{ab}	573.7 ^{aA}	376.0 ^{aC}	475.4 ^{ab}	584.2 ^{aA}

* lowercase letters represent statistical comparisons between groups within each period, with different letters indicating statistically significant differences ($p < 0.05$).

** capital letters represent the statistical comparisons between periods within each group, with different letters indicating significant statistical differences ($p < 0.05$).

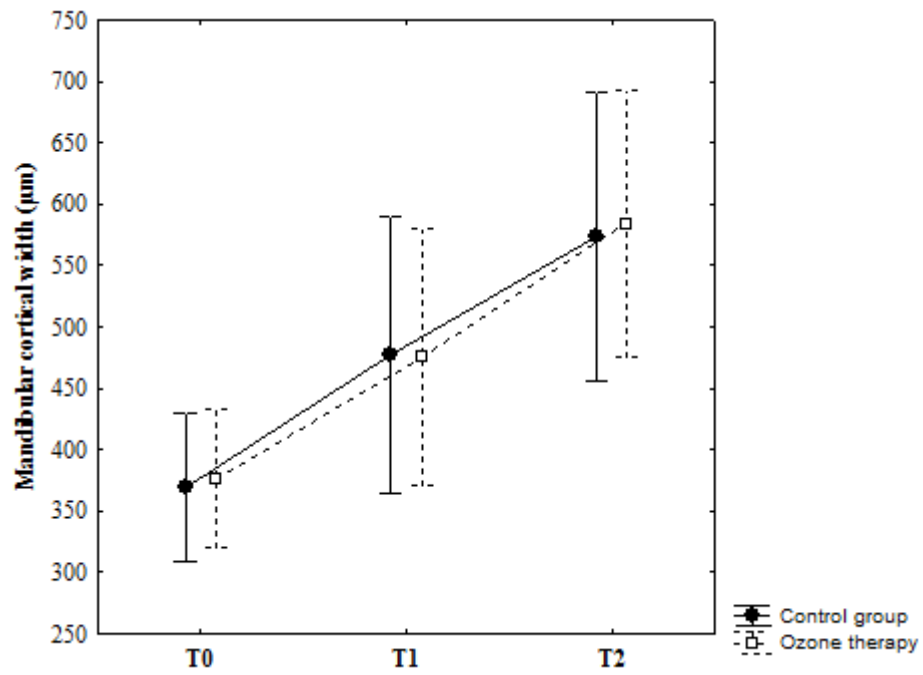


Figure 2. Comparison of mean values and confidence intervals of mandibular cortical width measurements between control and ozone therapy groups during the three experimental phases (T0, T1 and T2).

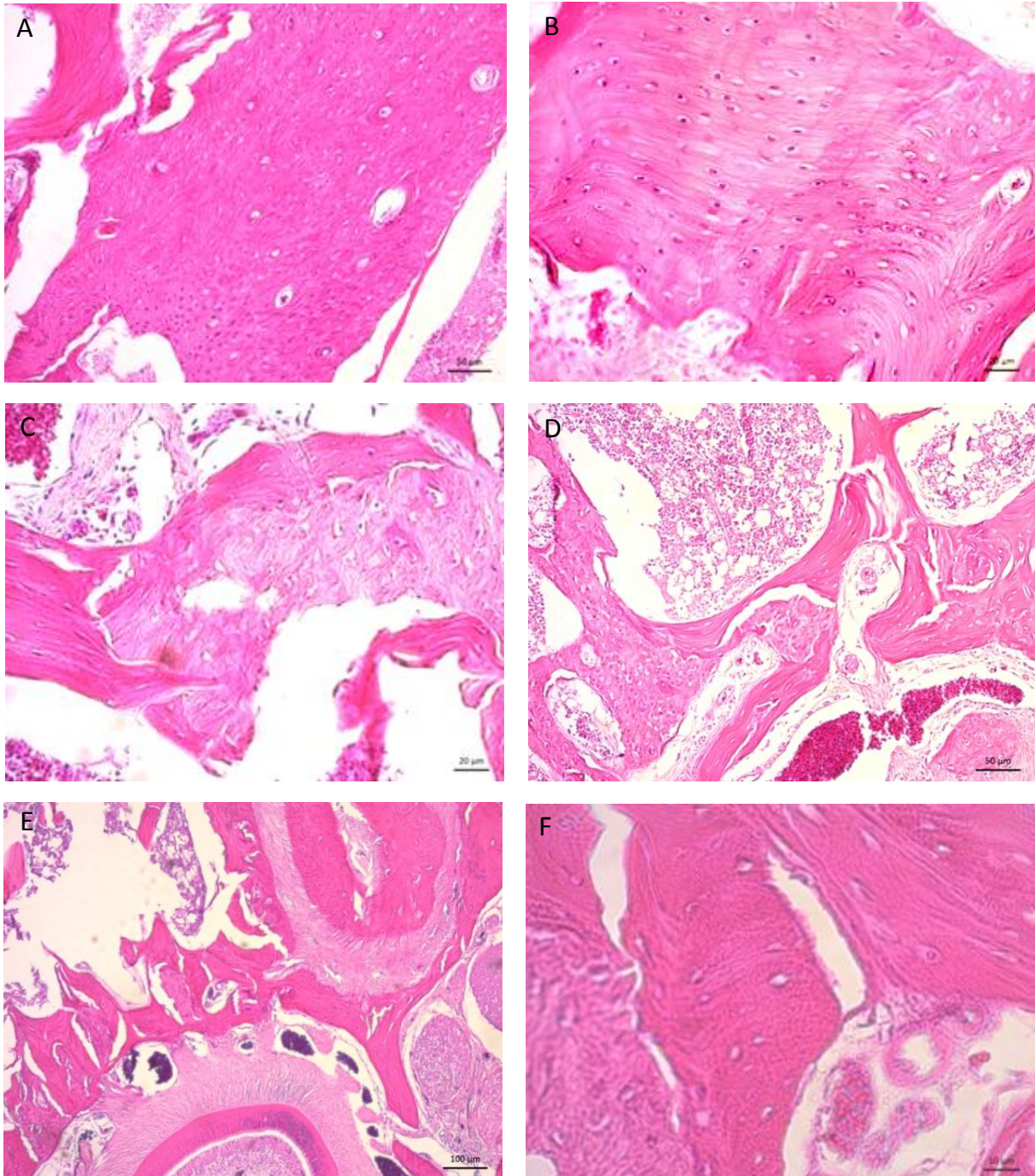


Figure 3. Comparison of histological findings between irradiated and non-irradiated mandibular areas. A and B - Photomicrography of the right side of the mandible (non-irradiated side) in the ozone therapy and control groups, respectively. C to F – Architectural bone changes promoted by irradiation in the irradiated mandibular side of the ozone therapy group (C and D) and the control group (E and F). F – Magnification of the selected rectangular area represented in E.

Discussion

To our knowledge, this was the first study to evaluate in an animal model the effect of ozone therapy in the prevention and reduction of bone damage related to BQT. The typical necrotic bony changes of the ORN were perceptible in all irradiated animals. These changes were found in both histopathological and microtomographic analyzes, corroborating the literature findings (Table 3). However, in our study O3 was not effective in reducing bone damage related to RT.

The absence of animal models that analyzed ozone therapy in ORN precludes the direct comparison. The choice of O3 for preventing and treating ORN in our study protocol was based on positive results in previous animal models for other purposes. The gas was effective in the treatment of soft tissue, cardiac and renal ischemia and reperfusion [17-19]. It also showed positive results in the healing process of dental alveoli in rats submitted to exodontia and in the acceleration of the repair of bone defects produced in the calvaria of rats, respectively [20,21]. In clinical studies, the efficacy of O3 has also been proven, although in other types of osteonecrosis [22-25]. However, it should be emphasized that despite being necrotic bone processes, MRONJ and ORN are different lesions [26, 27].

Regarding the effects of radiation on bone tissue, our results were in line with previous studies, showing coherence between the microscopic and microtomographic evaluations (Table 3). Microscopically, both groups presented tissue disorganization, fibrosis, focal areas, and evident signs of bone necrosis, as found in a previous study [15]. The Micro-CT results were similar to other animal models of ORN induction [10-13, 28]. In our study, it is important to emphasize significant differences between T0 and T2 regarding the Micro-CT parameter BV/TV. This parameter represents the actual amount of bone in the area of interest and such value is generally higher in the necrotic bone compared to healthy bone [29].

Increasing the width of the cortical bone in the irradiated region was an important finding of our study in agreement with other studies [30-32]. Persistent depression of osteoclasts impairs turnover, allowing continuity of unopposed anabolic activity and continued deposition of the mineral matrix [31]. Morphologically, the result is cortical thickening. Despite this, the quality of this matrix is compromised [33]. A recent study has demonstrated heterogeneity of necrotic changes in advanced

Table 3. Main studies of ORN induction in animal model and histological and/or microtomographic results.

REFERENC E	RADIATION DOSE	COLORING	MICRO/CT PARAMETERS	RESULTS	ENDPOINT	MAIN CONCLUSIONS
POORT et al. 2017¹⁴	25Gy, 50Gy or 70Gy (Conventional)	Masson's trichrome	Did not perform Micro-CT	The amount of fibrosis, reabsorption reaction, necrosis and bone proportions were increased after high doses of radiation. The rate of bone remodeling decreased after irradiation.	Fibrosis, formation of gaps, cortical destruction, bone sequestration in the alveolar process.	Increased irradiation doses caused architectural bone alterations and damaged vascularization. This can result in a chronic hypoxic state of the mandibular bone. In general, the rate of bone formation was markedly decreased after radiotherapy.
DAMEK- POPRAWA et al. 2013¹⁰	50Gy (Brachytherapy)	HE	BV/TV	Bone loss	Acellular necrotic bone with loss of osteocytes, sequestration formation, vessels ruptured with extravasated erythrocytes and amorphous ground eosinophilic substance infiltrated by basophilic cells.	ORN has a faster onset in the mandible relative to the tibia in the rat.
COHEN et al. 2011¹¹	30Gy (Brachytherapy)	HE, blue, fluorochrome	BV/TV	Reduction of bone formation in irradiated jaws.	Fibrosis, inflammation, increased osteoclasts	The HDR brachytherapy model incorporating post-RT dental extractions successfully demonstrated reproducible radiogenic mandibular bone damage analogous to clinical ORN.
TAMPLEN et al. 2011¹²	20Gy (Brachytherapy)	HE	BV/TV	Reduction of bone formation and increased presence of fibrosis and inflammation. Decreased bone formation in areas of extraction and increased resorption in	Fibrosis, increased number of osteoclasts and decreased osteoblasts, reduced bone formation.	Significant bone loss after radiation and tooth extraction. This model successfully limits the amount of animal morbidity, increases experimental viability and limits the animals required for experimentation, as well as provides the histological evidence of a mechanism of cellular imbalance in the pathogenesis of ORN.

				the traumatic and atraumatic areas of irradiated jaws.		
FENNER et al. 2010¹⁵	60Gy (Conventional)	HE, Elastic/van Giesson	Did not perform micro-CT	Histological changes attributed to ORN (empty gaps, fibrosis, necrosis)	Fibrosis, reduced number of cells, empty gaps and focal necrosis were detected in all irradiated sites	External irradiation with a total reference dose of 60 Gy is feasible in rats and produces all histological changes attributed to ORN after a 6-week follow-up.
PELISSER et al. 2007¹⁶	60Gy (fractional conventional)	HE	Did not perform micro-CT	Nuclear alterations in osteocytes and endothelial cells in the irradiation area characterized by the emergence of weakly colored regions, resembling blisters or vacuoles..	Hypocellularity in bone tissue exposed to radiation..	The decrease in the number of osteocytes in the irradiated bone tissue is an important component in the etiology of osteoradionecrosis.
ARMIN et al. 2012¹³	20Gy (Brachytherapy)	Did not do histology	BV/TV	Bone reduction, crevice formation in the extraction area and increased resorption in traumatic and atraumatic areas of irradiated maxilla compared to samples from the control group.	BV / TV index significantly reduced in the experimental group compared to the control group..	The maxilla is highly susceptible to radiogenic bone lesion.
KURIHASHI et al. 2002 28	10Gy (Conventional)	HE, Mallory-Azan, ALP (alkaline phosphatase), TRAP	BV/TV	Reduction of bone formation in the irradiated region.	Less amount of fibroblasts in granulation tissue within the alveoli.	Radiation effects are more harmful when odontotomy is performed long after exposure to X-ray than when it is performed shortly after irradiation.

ORN of the mandible and that necrotic changes was more prevalent in the cortical bone than in the trabecular bone, possibly due to the decreased periosteal blood supply caused by radiation [34]. The detection of cortical bone thickening has the potential to be a simple and quantitative method for detecting the initial stages of medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) [8, 35].

With respect to radiation-induced cell damage, this is attributed mainly to the deleterious effects of free radicals. Thus, molecules with direct free radical properties are radio protective and particularly promising. The controlled administration of O₃ may promote adaptation to oxidative stress, with reduction of damage induced by reactive oxygen species [36]. Thus, we hypothesized that O₃ could prevent and/or reduce the damage caused by irradiation in the left side of the mandible.

During the course of our experiment, in the ozone therapy sessions, insertion of the cannula to insufflate the O₃ gas produced rectal stimulation with reflex peristalsis in the rats, causing them to evacuate during or shortly after gas application. This stimulation may have interfered with the bioavailability of the gas. Further studies may test the effect of the therapy by using different routes of O₃ administration, such as the intraperitoneal via [21, 36, 37].

Likewise, the volume of ozone gas used a similar amount of other study [9]. Other studies used a greater quantity (30ml), but for the analysis of the effect of O₃ on the healing of alveoli post-exodontia of rat molars and of bone defects produced in the calvaria of rats [20, 21]. Further studies may elucidate whether a higher volume of O₃ would be more effective for ORN.

The characteristics of necrotic bone, such as hypovascularity, hypoxicity and hypocellularity, may have deprived the absorption of O₃ by the bone, thus decreasing its bioavailability. This has probably been the most important factor for not observing any beneficial effect of O₃ on the bone. Formation and repair of bone tissue depends on the regulated induction of new blood vessels within a growth zone [38] and that angiogenesis plays a key role in bone formation by supplying nutrients and oxygen to the proliferating tissue [39]. However, the theory of radiation-induced fibrosis is currently used to explain the pathological mechanism of ORN. This theory states that the main event in the progression of ORN is the activation and deregulation of fibroblastic activity, which leads to the formation of atrophic tissue in a previously irradiated area. This tissue presents endothelial cell damage, both due to direct radiation injury, and indirect stimuli by the formation of reactive oxygen species

or free radicals. These damaged endothelial cells trigger an acute inflammatory response, leading to the release of reactive oxygen species [40]. The destruction of endothelial cells with vascular thrombosis leads to necrosis of blood microvessels, to local ischemia with consequent tissue hypoxia and finally to bone and tissue necrosis [41].

The lack of similar animal studies which precluded the comparison of results may be considered as an important limitation of our study. The selected route and volume of O₃ insufflation may have also influenced the results.

In conclusion, our animal model was able to develop ORN in a reproducible way and in consonance with the histological and microtomographic aspects described in the literature. Our study firstly described the mandibular cortical thickening in an ORN model. This imaging finding should be further investigated as an early sign of ORN. On the other hand, ozone therapy was not effective for the prevention and treatment of ORN. Further animal studies with a similar protocol to induce ORN, but with a different ozone therapy protocol may elucidate whether a higher volume of O₃ via intraperitoneal would increase the bioavailability of O₃ in the necrotic bone.

Acknowledgments

The authors would like to thank the following for their help in technical assistance: Ricardo Bentes Azevedo, Paulo Márcio Yamaguti, Ana Carolina Acevedo, Rafael Rocha de Andrade, and Ana Luiza Sarkis Vieira Bittar.

Funding

This study was funded by the Foundation for Research Support of the District Federal (FAP/DF), grant number 0193.000971/2015.

Conflict of Interest Statement

None of the authors declare any conflict of interest.

Ethical Considerations

The experiment was conducted in accordance with the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). In addition, the ARRIVE guidelines were followed.

References

- [1] NCCN Guidelines—Head and Neck Cancers—Version 1.2017, February 6, 2017.
- [2] Yamazaki H, Yoshida K, Yoshioka Y et al. High dose rate brachytherapy for oral cancer. *J Radiat Res.* 2013 Jan; 54(1): 1–17.
- [3] Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg* 1983; 41(5):283–8.
- [4] Nabil S, Samman N. Incidence and prevention of osteoradionecrosis after dental extraction in irradiated patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011 Mar; 40(3): 229-43.
- [5] Batinjan G, Zore IF, Vuletić M, Rupić I. The use of ozone in the prevention of osteoradionecrosis of the jaw. *Saudi Med J.* 2014; 35(10): 1260–1263.
- [6] Fowler JF. A Review: The linear quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *Br J Radiol* 1989;62:679–675.
- [7] Vilarinho JLP, Ferrare N, Moreira AMR et al. Early bony changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats: A longitudinal in vivo study. *Arch Oral Biol.* 2017 Oct;82:79-85.
- [8] Gönen ZB, Yillmaz Asan C, Zararsiz G, Kiliç E, Alkan A. Osseous changes in patients with medication-related osteonecrosis of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol.* 2017 Nov 1:20170172.
- [9] Fernández LOS, Ajamieh HH, Berlanga J et al. Ozone oxidative preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/reperfusion. *Transpl Int.* 2008 Jan; 21(1):39-48.
- [10] Damek-Poprawa M, Both S, Wright AC, Maity A, Akintoye SO. Onset of mandible and tibia osteoradionecrosis: a comparative pilot study in the rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013 Feb;115(2):201-11.
- [11] Cohen M, Nishimura I, Tamplen M et al. Animal model of radiogenic bone damage to study mandibular osteoradionecrosis. *Am J Otolaryngol.* 2011 Jul-Aug;32(4):291-300.
- [12] Tamplen M, Trapp K, Nishimura I et al. Standardized analysis of mandibular osteoradionecrosis in a rat model. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011 Sep;145(3):404-10.
- [13] Armin BB, Hokugo A, Nishimura I et al. Brachytherapy-mediated bone damage in a rat model investigating maxillary osteoradionecrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012 Feb;138(2):167-71.

- [14] Poort LJ, Ludlage JHB, Lie N et al. The histological and histomorphometric changes in the mandible after radiotherapy: An animal model. *J Craniomaxillofac Surg*. 2017 May;45(5):716-721.
- [15] Fenner M, Park J, Schulz N et al. Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J Craniomaxillofac Surg*. 2010 Jan;38(1):47-53.
- [16] Pelisser A, Vier-Pelisser FV, Fontanella VRC, Figueiredo MAZ. Microscopical analysis of fractionated cobalt-60 radiotherapy effects on mandibles of rats. *Radiol Bras* 2007;40(2):113–118.
- [17] Foglielini C, Fulgenz A, Belloni D, Sciorati C, Ferrero E, Ferrero ME. Ozonated autohemotherapy: protection of kidneys from ischemia in rats subjected to unilateral nephrectomy. *BMC Nephrology*. 2011; 12:61.
- [18] Di Filippo C, Luongo M, Marfella R et al. Oxigen/Ozone protects the heart from acute myocardial infarction through local increase of and NOS activity and endothelial progenitor cells recruitment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2010 Sep; 382(3):287-91.
- [19] Calunga JL, Zamora ZB, Borrego A et al. Ozone therapy on rats submitted to subtotal nephrectomy: role of antioxidant system. *Mediators Inflamm*. 2005(4):221-7.
- [20] Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M 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.
- [21] Kan B, Sencimen M, Bayar GR et al. Histomorphometric and microtomographic evaluation of the effects of hyperbaric oxygen and systemic ozone, used alone and in combination, on calvarial defect healing in rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Jun;73(6):1231.e1-10.
- [22] Agrillo A, Ungari C, Filiaci F, Priore P, Iannetti G. Ozone therapy in treatment of avascular bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *The Journal of Craniofacial Surgery*. 2007 Sep; 18(5): 1071-1075.
- [23] Ripamonti CI, Maniezzo M, Boldini S, Pessi MA, Mariani L, Cislighi E. Efficacy and tolerability of medical ozone gas insufflations in patients with osteonecrosis of the jaw treated with bisphosphonates—Preliminary data. *J Bone Oncol*. 2012 Dec; 1(3): 81–87.
- [24] Agrillo A, Filiaci F, Ramieri V 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 Nov;16(12):1741-7.
- [25] Agrillo A, Sassano P, Rinna C, Priore P, Iannetti G. Ozone therapy in extractive surgery on patients treated with bisphosphonates. *J Craniofac Surg*. 2007 Sep;18(5):1068-70.

- [26] Obinata K, Shirai S, Ito H et al. Image findings of bisphosphonate related osteonecrosis of jaws comparing with osteoradionecrosis. *Dentomaxillofac Radiol.* 2017 Jul;46(5):20160281.
- [27] Grisar K, Schol M, Schoenaers J et al. Osteoradionecrosis and medication-related osteonecrosis of the jaw: similarities and differences. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016 Dec;45(12):1592-1599.
- [28] Kurihashi T, Iwata H, Nasu M, Yosue T. Experimental study on wound healing of alveolar bone sockets in the rat maxilla after X-ray irradiation. *Odontology.* 2002 Sep;90(1):35-42.
- [29] Junquera L, Pelaz A, Gallego L, García-Consuegra L, Costilla S. Bisphosphonate-related osteonecrosis associated with dental implants: a microcomputed tomography study. *Implant Dent.* 2014 Jun;23(3):258-63.
- [30] Wernle JD, Damron TA, Allen MJ, Mann KA. Local irradiation alters bone morphology and increases bone fragility in a mouse model. *J Biomech.* 2010 Oct 19;43(14):2738-46.
- [31] Oest ME, Franken V, Kuchera T, Strauss J, Timothy A. Damron. Long-Term Loss of Osteoclasts and Unopposed Cortical Mineral Apposition Following Limited Field Irradiation. *J Orthop Res.* 2015 March; 33(3): 334–342.
- [32] Keenawinna L, Oest ME, Mann KA, Spadaro J, Damron TA. *Radiat Res.* Zoledronic acid prevents loss of trabecular bone after focal irradiation in mice. 2013 Jul; 180(1):89-99.
- [33] Gong B, Oest ME, Mann KA, et al. Raman spectroscopy demonstrates prolonged alteration of bone chemical composition following extremity localized irradiation. *Bone.* 2013; 57:252–258.
- [34] Akashi M, Hashikawa K, Wanifuchi S et al. Heterogeneity of Necrotic Changes between Cortical and Cancellous Bone in Mandibular Osteoradionecrosis: A Histopathological Analysis of Resection Margin after Segmental Mandibulectomy. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 3125842.
- [35] Cardoso CL, Barros CA, Curra C et al. Radiographic Findings in Patients with Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Int J Dent.* 2017; 2017: 3190301.
- [36] Gultekin FA, Bakkal BH, Guven B et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on radiation-induced organ damage in rats. *J Radiat Res.* 2013 Jan;54(1):36-44.
- [37] Aslan MK, Boybeyi O, Senyucel MF, Ayva S, Kısa U, Aksoy N, et al. Protective effect of intraperitoneal ozone application in experimental ovarian ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 2012;47:1730–4.


[38] Wang Y, Wan C, Gilbert SR, Clemens TL. Oxygen sensing and osteogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007;1117:1-11.

[39] Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *J Bone Miner Res.* 2009 Aug;24(8):1347-53.

[40] Delanian S, Lefaix JL. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiotherapy and Oncology.* 2004; 73:119–13.

[41] Lyons A, Ghazali N. Osteoradionecrosis of the jaws: current understanding of its pathophysiology and treatment. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Dec;46(8):653-60.


ANEXO




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

Brasília, 2 de dezembro de 2015.


DECLARAÇÃO



Declaramos que o projeto intitulado "APLICAÇÃO DA MISTURA OZÔNIO/OXIGÊNIO NO TRATAMENTO DE OSTEORRADIONECCROSE DE MANDÍBULA: ESTUDO LABORATORIAL EM MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL.", UnBD0C n.º 147275/2015, sob responsabilidade do Professor Sérgio Bruzadelli Macedo 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 albinus*: 20. A presente aprovação é válida pelo período de 4/1/2016 a 4/1/2018.



Prof. Dra. Paula Diniz Galera
 Coordenadora da CEUA



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