UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba - Faculdade de Odontologia

BRUNA MAZIERO DE JESUS

INFLUÊNCIA DA OZONIOTERAPIA SISTÊMICA ASSOCIADA A TERAPIAS ADJUVANTES LOCAIS NA MODULAÇÃO DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES: ESTUDO EM RATAS OVARIECTOMIZADAS.

Araçatuba - SP
2026

BRUNA MAZIERO DE JESUS

INFLUÊNCIA DA OZONIOTERAPIA SISTEMICA ASSOCIADA A TERAPIAS ADJUVANTES LOCAIS NA MODULAÇÃO DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES: ESTUDO EM RATAS OVARIECTOMIZADAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de bacharelado em odontologia.

Orientadora: Profª. Drª. Ana Paula Farnezi Bassi

Araçatuba – SP

2026

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** todos os dias pela oportunidade de chegar até aqui, com saúde, sabedoria e foco em cada passo do caminho. Cada aprendizado que tive foi um degrau na minha evolução, e poder estudar, crescer e me tornar uma pessoa melhor ao lado de gente tão especial é, sem dúvida, a maior conquista da minha vida.

Agradeço a meus pais, **Eliana Aparecida Maziero de Jesus e Antonio Oliveira de Jesus**, por serem, sem sombra de dúvida, os melhores pais que eu poderia ter. Vocês jamais mediram esforços para me proporcionar não apenas tempo e estudo, mas uma vida repleta de oportunidades e amor. Mesmo diante das dificuldades e dos contratempos que a vida nos impôs, vocês nunca vacilaram em me sustentar, em acreditar em mim e em abrir caminhos para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigado por me apoiarem incondicionalmente em cada sonho, em cada escolha, em cada passo dessa jornada. Vocês são meu maior exemplo e minha maior fonte de gratidão. Amo vocês, com todo o meu coração.

Agradeço ao meu namorado **Gabriel Lima de Araújo**, por estar ao meu lado desde o princípio, acompanhando de perto cada etapa da minha vida com apoio incondicional, paciência, cuidado e disposição para me ajudar sempre que precisei. Obrigada por jamais duvidar das minhas capacidades ou me desanimar, muito pelo contrário, você sempre acreditou em mim, mesmo quando eu mesma hesitava. Seu apoio constante foi, e continua sendo, um dos meus maiores pilares. Por tudo isso e por tanto mais, te amo muito.

Aos meus avós, **Odete Honório, Sebastião Pedro Maziero, Luiz de Jesus e Maria de Oliveira** (in memoriam), minha eterna gratidão. Obrigada pelo apoio, pelos conselhos sábios e por tudo o que fizeram, cada um à sua maneira, para que esse sonho se tornasse realidade. À minha avó Maria, minha eterna saudade, mas a certeza de que você estaria orgulhosa é ainda maior. À minha prima **Gessica Maziero**, por ser minha irmã de coração. Obrigada pelo apoio constante e por tornar essa caminhada muito mais leve, com sua presença, seu carinho e sua amizade sincera, ter você ao meu lado fez toda a diferença. Aos familiares, padrinhos, madrinhas, tios, tias, primos e primas, obrigado por estarem presentes em todos os momentos importantes da minha vida.

À minha orientadora, Profa. **Ana Paula Farnezi Bassi**, meu sincero agradecimento por todo o carinho, a paciência e as oportunidades que me proporcionou ao longo dessa trajetória, além de tudo o que me ensinou com tanta dedicação. Obrigada por estar sempre disposta a ajudar, em qualquer momento. A senhora significa muito para mim, professora, pois é uma das pessoas que mais admiro dentro da faculdade, tanto profissionalmente quanto como ser humano.

À Profa. **Jéssica Marcela de Luna Gomes**, agradeço por toda a paciência e dedicação ao nos ensinar, tanto no laboratório quanto nas clínicas. Gostei muito de estar em sua ala, foram dias leves e repletos de aprendizado, que despertaram em mim um interesse pela prótese muito maior do que eu imaginava ter. Agradeço também por todos os conselhos e pelas oportunidades que me proporcionou ao longo dessa caminhada.

A doutoranda **Izabela Fornazari Delamura**, que se fez presente durante toda a minha jornada na faculdade, muito obrigada por todos os momentos de ajuda, apoio, ensinamentos e, é claro, aqueles puxões de orelha necessários. Não tenho palavras suficientes para agradecer tudo o que você fez e continua fazendo por mim. Sem o seu apoio, eu certamente não estaria onde estou hoje. Você é minha inspiração a cada dia, e sou imensamente grata por sua amizade, que levo como um dos maiores presentes dessa caminhada.

Aos pós-graduandos, **Francieli Flores, Arthur Viotto, Juliana Mazzini e Douglas Biagi**, sou imensamente grata a vocês por todo o apoio, por estarem sempre dispostos a me ouvir e a orientar da melhor forma possível. Obrigada também por todas as oportunidades que me proporcionaram, sempre me ensinando com tanta generosidade e paciência.

Às minhas amigas**, Rafaela Fuzishima, Brenda Justo, Maria Clara Venceslau e Sthefany Missiato**, que estão comigo desde o primeiro dia de faculdade, agradeço por cada instante compartilhado nesses anos. Fomos parceiras em tudo: nos apoiando, estudando juntas e trocando aprendizados sobre a faculdade e a vida. Tive muita sorte de ter feito aquele trabalho de Bioquímica ao lado de vocês. Vocês deixaram essa caminhada mais leve e foram peça fundamental para eu chegar até aqui, sempre com cumplicidade e um carinho que guardarei para sempre. Sou muito

feliz por finalizar essa etapa junto de vocês**.** Um agradecimento especial à minha dupla, **Rafaela Fuzishima**. Desde o primeiro dia de aula, você esteve ao meu lado, e o que começou como uma parceria de faculdade se transformou em uma amizade para a vida toda. Obrigada por sua ajuda constante, por dividir comigo as alegrias e as dificuldades dessa jornada, e por ser, sem dúvida, um dos maiores presentes que a graduação me deu.

Agradeço à **Moradia Estudantil** por todos os momentos vividos ao longo dessa jornada, que fizeram parte da minha formação não só acadêmica, mas também pessoal.

Agradeço à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP (FOA),** pela oportunidade de realizar essa formação, pelo conhecimento adquirido e por todo o suporte oferecido ao longo desses anos, que foram fundamentais para minha formação acadêmica e profissional.

“*Para tudo há uma ocasião certa, há um tempo certo para cada propósito debaixo do céu.”*

— Eclesiastes | 3:1

RESUMO

JESUS, B. M. **Influência da Ozonioterapia sistêmica associada a terapias adjuvantes locais na modulação da osteonecrose dos maxilares: estudo em ratas ovariectomizadas.** 2026. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho tópico de uma pasta a base de metronidazol e o gel de clorexidina 2%, associado ao uso sistêmico de ozonioterapia na prevenção da MRONJ após procedimento de exodontia em ratas senis ovariectomizadas e submetidas a terapia com Zoledronato (100µg/kg). Para isso, 42 ratas de 12 meses de idade foram divididas em 7 grupos (n=6). O grupo SAL as ratas foram submetidas a aplicações de solução de cloreto de sódio 0,9% e o grupo ZOL receberá aplicação de Zoledronato 100µg/kg, ambos a cada 3 dias durante 7 semanas; O grupo ZOL: ZOL+OZ; ZOL+CLX; Z O L +MTZ; ZOL+OZ+MTZ; ZOL+OZ+CLX, receberam aplicação de zoledronato seguindo o mesmo protocolo e aplicação tópica da pasta ou do gel na região de 1°molar inferior, associada ou não a administração intraperitoneal de Ozônio (0,7mL/kg), o logo após a extração do 1º molar inferior esquerdo, no segundo e quarto dia após a extração, sendo que a extração do molar será realizada na terceira semana de experimento. A eutanásia foi realizada na sétima semana de experimento, 28 dias após a exodontia. As mandíbulas foram ressecadas, reduzidas e preparadas para as análises histométricas, histopatológicas e análise clínica. A normalidade dos dados foi avaliada para a definição do teste estatístico mais adequado, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados a ozonioterapia sistêmica demonstraram ter um efeito benéfico no tratamento da MRONJ e o uso de terapias locais como pasta de metronidazol 10% e gel de clorexidina 2% colaboraram para melhorar quadros de prevenção da osteonecrose.

Palavras-chave: regeneração óssea; ozônio; osteoporose.

ABSTRACT

JESUS, B. M. **Influence of systemic Ozone therapy combined with local adjuvant therapies on the modulation of Osteonecrosis of the jaws: an experimental study in ovariectomized rats.** 2026. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

The objective of this study was to evaluate the topical performance of a metronidazole-based paste and 2% chlorhexidine gel, combined with systemic ozone therapy, in preventing MRONJ following tooth extraction in senile ovariectomized rats treated with Zoledronate (100 µg/kg). For this purpose, 42 rats, 12 months of age, were divided into seven groups (n=6). In the SAL group, the rats received applications of 0.9% sodium chloride solution, and the ZOL group received Zoledronate (100 µg/kg) every three days for seven weeks. The ZOL: ZOL+OZ, ZOL+CLX, ZOL+MTZ, ZOL+OZ/MTZ, and ZOL+OZ/CLX groups received Zoledronate following the same protocol and topical application of the paste or gel to the region of the lower first molar, with or without intraperitoneal administration of ozone (0.7 ml/kg). These applications were conducted immediately after the extraction of the left lower first molar, as well as on the second and fourth days post-extraction. The molar extraction was performed during the third week of the experiment. Euthanasia was carried out in the seventh week of the experiment, 28 days post-extraction. The mandibles were dissected, reduced, and prepared for histometric, histopathological, and clinical analyses. Data were subjected to normality testing to determine the most appropriate statistical test ($p<0.05$). The results of systemic ozone therapy have a beneficial effect in the treatment of MRONJ and the use of local therapies such as 10% metronidazole paste and 2% chlorhexidine gel have helped to improve the prevention of osteonecrosis.

Keywords: bone regeneration; ozone; osteoporosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Amarria com fio de algodão no primeiro molar inferior esquerdo 19

Figura 2 - Etapas cirúrgicas do procedimento de ovariectomia. (A) Realização de antissepsia do animal com degermante; (B) e (C) Incisão do peritônio e acesso a cavidade abdominal; D) Localização do ovário e chifre uterino; (E) e (F) Laqueadura do chifre uterino e reposição dos tecidos laqueados; (G) Ovários removidos; (H) e (I) Sutura do plano superficial após remoção do ovário e reposição dos tecidos laqueados 20

Figura 3 – Exodontia do primeiro molar inferior. (A) Remoção da ligadura de algodão; (B) Inicio dos movimentos de extração; (C) Luxação do primeiro molar inferior esquerdo; (D) Extração do dente e visualização do alvéolo sem fratura de raizes 22

Figura 4 – Molar pós exodontia 22

Figura 5 – Exodontia e aplicação de gel de clorexidina 2%. (A) Alvéolo pós-cirúrgico imediato. (B) Gel de Clorexidina 2% sendo aplicado na região do alveólo imediato e foi repetido ao 2 e 4 dias pós-exodontia. (C) Gel de Clorexidina 2% 23

Figura 6 – Exodontia e aplicação da pasta de metronidazol. (A) Alvéolo pós-cirúrgico imediato. (B) Pasta de metronidazol sendo aplicado na região do alveólo imediato e foi repetido ao 2 e 4 dias pós-exodontia. (C) Pasta de metronidazol 24

Figura 7 - Esquema representando a aplicação de ozônio intraperitoneal 25

Figura 8- Representação da área microscópica de interesse (AMI) 27

Figura 9 - Fotos clínicas dos animais, envolvendo exame extra e intraoral pré-eutanásia. (1) Grupo Sal; (2) Grupo Zol; (3) Grupo Ozônio; (4) Grupo MTZ; (5) Grupo MTZ + Ozônio; (6) Grupo CLX; (7) Grupo CLX + Ozônio 29

Figura 10 – Prancha dos órgãos (rim, pulmão e fígado), nos respectivos aumentos 5x, 10x e 40x 31

Figura 11 - Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios (TONF). (a – g) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL (a), ZOL (b), OZ (c), MTZ (d), MTZ+OZ (e), CLX (f), CLX+OZ (g). Abreviações e símbolos: setas verdes, osteoclastos; setas pretas, osteoblastos; bt, tecido ósseo; Aumento original: 60x. Barras de escala: 100 μm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E) 32

Figura 12 - Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios (TONV). (a – g) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL(a), ZOL (b), OZ (c), MTZ (d), MTZ+OZ (e), CLX (f), CLX+OZ(g). Abreviações e símbolos: setas amarelas, lacunas vazias; setas pretas, osteoblastos; bt tecido ósseo; nvbt, tecido ósseo não vital. Aumento original: 60x. Barras de escala: 100 μm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E) 33

Figura 13 - Tecido ósseo neoformado (TONF) no sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas entre os grupos 34

Figura 14 - Tecido ósseo não vital (TONV) no sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas entre os grupos 35

Figura 15 – Perfil inflamatório do sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas entre os grupos 36

Figura 16 – Perfil inflamatório do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. (a – g) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOMS	Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais
ARI	Área de interesse
AMI	Área microscópica de interesse
BPs	Bifosfonatos
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comite de Ética em Uso de Animais
CLX	Clorexidina
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
g	Grama
HE	Hematoxilina e eosina
IV	Via Endovenosa
Kg	Quilograma
Ml	Mililitro
MTZ	Metronidazol
MRONJ	Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Medicamentos
n	Número de Animais
O3	Ozônio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PSR	Picrosirius
SAL	Soro Fisiológico
TONF	Tecido ósseo neoformado
TONV	Tecido ósseo não vital
ZOL	Zoledronato
ZOL+CLX	Zoledronatp + Gel de Clorexidina 2%
ZOL+MTZ	Zoledronato + Pasta de Metrodinazol 10% e lidocaína 2%
ZOL+OZ	Zoledronato + Ozônio
ZOL+OZ+CLX	Zoledronato + Ozônio + Gel de Clorexidina 2%
ZOL+OZ+MTZ	Zoledronato + Ozônio + Pasta de Metrodinazol 10% e Lidocaína 2%
µg	Microgramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. OBJETIVOS 16
3.MATERIAL E MÉTODOS 16
3.1 Desenho Experimental: Animais 16
3.2 Animais 16
3.3 Grupos Experimentais 17
3.4 Ovariectomia Bilateral 18
3.5 Período de Indução da Osteonecrose 20
3.6 Anestesia 21
3.7 Exodontia 21
3.8 Aplicação das Pastas Tópicas 23
3.8.1 Aplicação de Gel de Clorexidina 2% 23
3.8.2 Aplicação da Pasta de Metronidazol 23
3.8.3 Ozonioterapia 24
3.8.4 Eutanásia 25
3.8.5 Análise da condição geral de saúde dos animais e exame extra e intrabucal 25
3.8.6 Análise e Processamento dos tecidos descalcificados 26
3.8.7 Análise microscópica e área microscópica de interesse (AMI) 26
3.8.8 Análise e Processamento de tecidos calcificados 27
3.8.8.1 Análise histológica e histométrica 27
3.8.8.2 Análise Histológica 27
3.8.8.3 Avaliação do perfil Inflamatório 28
3.8.8.4 Calibração do Examinador 28
3.8.8.5 Análise de dados 28
4. RESULTADOS 29
4.1 Análise da condição geral da saúde dos animais e exame extra e intrabucal 29
4.2 Análise dos órgãos coletados dos animais na eutanásia 30
4.3 Análise histológica e histométrica 31
4.3.1 Análise Histológica 31

4.3.2 Histometria 34
4.4 Análise do Perfil Inflamatório 36
5.DISCUSSÃO 38
6. CONCLUSÃO 42
7. REFERÊNCIAS 43
8. ANEXOS 49

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é uma estrutura dinâmica, submetida a constante remodelação para manutenção de sua integridade e reparo de microdanos e fraturas. Esse processo depende da atividade coordenada das células ósseas e do equilíbrio entre formação e reabsorção. Alterações nessa homeostase, relacionadas a fatores como trauma, infecção e envelhecimento, podem resultar em doenças ósseas sistêmicas, entre as quais se destaca a osteoporose (1,2).

A osteoporose é uma doença osteometabólica de etiologia multifatorial, associada a fatores genéticos, imunológicos, inflamatórios, farmacológicos e comportamentais, além de idade avançada, sexo feminino e baixa ingestão de cálcio e vitamina D (3). Caracteriza-se pela perda de massa óssea e deterioração da microarquitetura, com consequente redução da resistência mecânica e aumento do risco de fraturas, inclusive após traumas de baixa intensidade (4).

A doença acomete principalmente mulheres na pós-menopausa, em razão da redução dos níveis de estrogênio (5). A deficiência estrogênica favorece a liberação de citocinas inflamatórias e o aumento da razão RANKL/OPG, estimulando a formação e a atividade dos osteoclastos e, consequentemente, a reabsorção e a perda de massa óssea (6).

O tratamento da osteoporose tem como objetivos reduzir o risco de fraturas, retardar a perda óssea e preservar a qualidade de vida. Para isso, são empregadas medidas não farmacológicas, como exercícios físicos e adequação nutricional, e terapias farmacológicas, entre elas bifosfonatos, anticorpos monoclonais e calcitonina (7). Os bifosfonatos estão entre os medicamentos mais prescritos por sua ação antirreabsortiva, compartilhada pelos anticorpos monoclonais anti-RANKL (8), e atuam principalmente pela inibição do recrutamento e indução da apoptose dos osteoclastos (9).

Apesar de seus benefícios, o uso de agentes antirreabsortivos está associado ao risco de osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos (MRONJ). A supressão da atividade osteoclástica e da remodelação óssea pode comprometer a renovação da matriz e favorecer condições de hipocelularidade,

hipóxia e redução da vascularização, contribuindo para o desenvolvimento da doença (10).

Segundo a American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS), a MRONJ é uma condição multifatorial associada principalmente a agentes antirreabsortivos, como bifosfonatos e denosumabe, além de medicamentos antiangiogênicos e imunomoduladores. Sua manifestação clínica característica é a exposição óssea ou a presença de osso sondável por fístula intra ou extraoral por mais de oito semanas, em pacientes tratados com esses medicamentos e sem histórico de radioterapia ou doença metastática nos maxilares. A condição é classificada em paciente em risco e estágios 0 a 3, de acordo com os achados clínicos, a presença de infecção e a extensão da lesão (11).

O tratamento da MRONJ envolve controle da infecção, debridamento ou ressecção cirúrgica e terapias adjuvantes voltadas à cicatrização e à regeneração tecidual. Nesse contexto, a ozonioterapia tem despertado interesse por suas propriedades antimicrobianas e por seu potencial de estimular o reparo tecidual (12). Em concentrações adequadas, o ozônio pode melhorar a oxigenação, o fluxo sanguíneo e o metabolismo celular, além de favorecer a regeneração e modular os resultados de tratamentos cirúrgicos e farmacológicos (12,13).

A ozonioterapia pode ser administrada por via local ou sistêmica. Na aplicação local, o ozônio é veiculado em soluções ou óleos e aplicado diretamente na área afetada. A administração sistêmica, investigada principalmente em estudos experimentais, tem apresentado resultados promissores relacionados à recuperação óssea, à melhora da microcirculação e à modulação da resposta imunológica (14,15).

Embora a infecção secundária exerça papel relevante na progressão da MRONJ, ainda não há consenso sobre protocolos tópicos destinados ao controle infeccioso e à prevenção de novas áreas de necrose. A doença pode causar dor e comprometer as funções do sistema estomatognático, com impacto direto na qualidade de vida (16). Por esse motivo, agentes antimicrobianos tópicos, como metronidazol e clorexidina, têm sido utilizados como terapias adjuvantes.

O metronidazol é um pró-fármaco da classe dos nitroimidazóis, com ação predominante contra bactérias anaeróbias em ambientes com baixa concentração

de oxigênio (17). Sua eficácia motivou o desenvolvimento de formulações tópicas, como a pasta composta por metronidazol a 10% e lidocaína a 2%, proposta por Poi et al., que apresentou resultados iniciais satisfatórios (18).

A clorexidina, por sua vez, é um antisséptico de amplo espectro, com ação sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, decorrente de alterações na permeabilidade da membrana celular dos microrganismos (19). Sua substantividade e ação prolongada favorecem o controle do biofilme, especialmente no período pós-operatório, quando a higiene bucal pode estar prejudicada (20). O uso tópico também pode reduzir o acúmulo de placa e a inflamação, evitando algumas limitações da antibioticoterapia sistêmica, como efeitos adversos e seleção de microrganismos resistentes (21).

O envelhecimento populacional e o aumento da prevalência de doenças osteometabólicas reforçam a necessidade de estratégias seguras para prevenção e tratamento de suas complicações. Entretanto, ainda são escassos os estudos *in vivo* que avaliam, isoladamente e em associação, os efeitos da ozonioterapia sistêmica e de agentes antimicrobianos tópicos sobre o reparo ósseo e dos tecidos moles em casos de MRONJ.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da ozonioterapia sistêmica, da pasta de metronidazol a 10% e do gel de clorexidina a 2%, como terapias adjuvantes no tratamento da osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos, por meio da análise do reparo ósseo alveolar e dos tecidos moles após exodontia.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito de três terapias adjuvantes no tratamento de osteonecrose dos maxilares em ratas ovariectomizadas tratadas com Zoledronato, em função do reparo ósseo alveolar e tecidos moles associados, pós- exodontia do primeiro molar inferior, sendo elas: Ozonioterapia sistêmica, aplicação tópica da pasta de Metronidazol a 10% ou do Gel de Clorexidina 2%.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho Experimental: Animais

Essa pesquisa seguiu todos os preceitos e princípios éticos para experimentação animal estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, Brasil) e pelas diretrizes institucionais para o cuidado e uso de animais de laboratório. Todos os procedimentos experimentais seguiram padrões éticos para garantir o bem-estar animal ao longo do estudo. O estudo foi delineado, conduzido e relatado em conformidade com as diretrizes ARRIVE 2.0 (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments).

Todos os protocolos experimentais foram enviados para o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, sobre o processo FOA nº 0268- 2022.

3.2 Animais

42 ratas da linhagem Wistar (Rattus norvegicus) foram obtidas do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista ‘‘Júlio de Mesquita Filho’’ aos 12 meses de idade (22). Os animais foram transferidos e mantidos no Biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. O acondicionamento dos animais durante o tempo de experimentação foi realizado em gaiolas plásticas (4 animais por caixa) com livre demanda de água e ração industrializada e sob condições ambientes de ciclo

claro/escuro de 12/12 horas, temperatura ambiente média de 22°C ± 2°C, umidade relativa do ar em 55% ± 5.

Todo o experimento foi planejado de acordo com o ‘‘The ARRIVE Guidelines 2.0” (23). Durante o tempo de experimento, os animais foram manualmente manipulados por operadores durante alguns segundos por semana com o objetivo de habituação à manipulação e aos operadores e redução do estresse durante as etapas experimentais seguintes. O número da amostra foi determinado através da ferramenta “Sample Size for Anova” do programa SigmaPlot 12.0, usando como referência o trabalho de Silva et al. (2022) (24) com metodologia semelhante e considerando a diferença entre duas médias (0,57) e um valor de desvio padrão de uma análise de desfecho primário (análise histomorfométrica), obtendo amostra total de 42 animais. Observando os riscos de perda de animais, como suportado pelo CONCEA, optou-se por aumentar um animal por grupo, sendo determinado n=6 animais por grupo.

3.3 Grupos Experimentais

Quarenta e dois animais foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos experimentais (n=6):

Grupo 1 (SAL): Controle positivo. 6 ratas foram submetidas a cirurgia de ovariectomia e receberam 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (solução salina) intraperitoneal, a cada 3 dias por 7 semanas, simulando os procedimentos com o zoledronato (controle positivo);

Grupo 2 (ZOL): Controle negativo. 6 ratas foram submetidas a cirurgia de ovariectomia e receberam aplicação do zoledronato 100ug/kg a cada 3 dias por 7 semanas (controle negativo);

Grupo 3 (ZOL+OZ): 6 ratas foram submetidas a cirurgia de ovariectomia e receberam aplicação do zoledronato 100ug/kg a cada 3 dias por 7 semanas e após a exodontia do 1 molar inferior foram tratadas com aplicação do ozônio por via intraperitoneal, na dosagem de 0,7ml/kg imediatamente, 2 e 4 dias pós-operatórios;

Grupo 4 (ZOL+MTZ): 6 ratas foram submetidas a cirurgia de ovariectomia e receberam aplicação do zoledronato 100ug/kg a cada 3 dias por 7 semanas e após a exodontia do 1º molar inferior, no final da terceira semana, houve a aplicação tópica da pomada de metronidazol no dia da exodontia, 2 e 4 dias pós-operatórios;

Grupo 5 (ZOL+MTZ+OZ): 6 ratas foram submetidas a cirurgia de ovariectomia e receberam aplicação do zoledronato 100ug/kg a cada 3 dias por 7 semanas e após a exodontia do 1º molar inferior, no final da terceira semana, houve a aplicação tópica da pomada de metronidazol no dia da exodontia, 2 e 4 dias pós-operatórios, juntamente com a aplicação sistêmica do ozônio, na dosagem de 0,7ml/kg, seguindo o mesmo protocolo (25);

Grupo 6 (ZOL+CLX): 6 ratas foram submetidas a cirurgia de ovariectomia e receberam aplicação do zoledronato 100ug/kg a cada 3dias por 7 semanas e após a exodontia do 1º molar inferior, no final da terceira semana, ocorreu a aplicação tópica do gel de clorexidina 2% no dia da exodontia, 2 e 4 dias pós-operatórios;

Grupo 7 (ZOL+OZ+CLX): 6 ratas foram submetidas a cirurgia de ovariectomia e receberam aplicação do zoledronato 100ug/kg a cada 3 dias por 7 semanas e após a exodontia do 1º molar inferior, no final da terceira semana, passaram pela aplicação tópica do gel de clorexidina 2% no dia da exodontia, 2 e 4 dias pós-operatórios, juntamente com a aplicação do ozônio por via intraperitoneal, na dosagem de 0,7ml/kg (25).

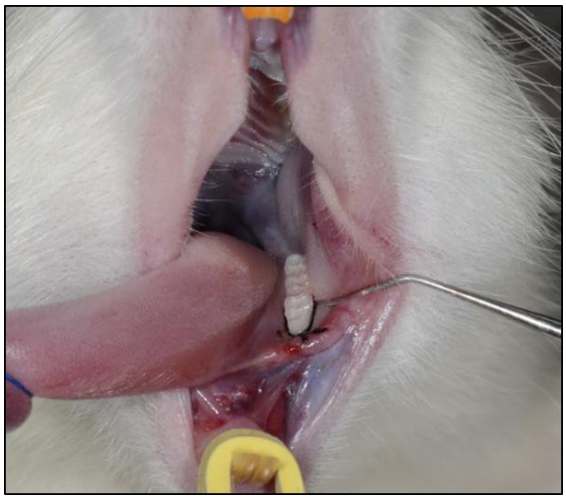
3.4 Ovariectomia Bilateral

Nos primeiros oito dias, após a ambientalização, que corresponderam a 2 ciclos estrais regulares (ciclo estrogênio), as ratas foram submetidas ao esfregaço vaginal, de acordo com a técnica descrita em estudos prévios(26). Foram obtidas células epiteliais através do esfregaço e dispostas em lâminas histológicas e analisadas em microscópio óptico, observou-se que nenhum animal apresentou irregularidades entre as fases estrais. Após esta fase, todas as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral (26,27).

Inicialmente, os animais foram anestesiados com Quetamina (70 mg/kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e Xilazina (10 mg/kg, Rompum® Bayer, RS, Brasil),

via intraperitoneal e, a seguir foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral. Uma incisão de 1,5 cm em ambos os flancos foi realizada, seguida da divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio afim de ter acesso à cavidade abdominal. Os ovários e os chifres uterinos foram localizados e laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryltm – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Feito isso, foi realizada a remoção dos ovários (ovariectomia) e realizada a sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryltm – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Estas ratas permaneceram no biotério, sendo alimentadas com ração e água ad libitum durante todo o tempo experimental. A temperatura do ambiente se manteve estável (22 ± 2° C), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro).

Figura 1 – Amarria com fio de algodão no primeiro molar inferior esquerdo

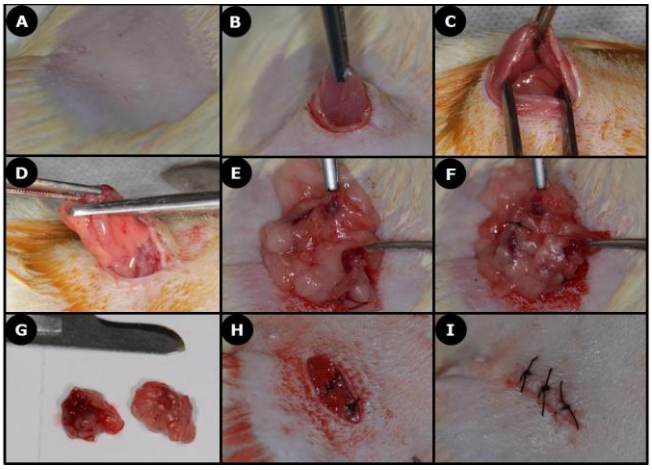


Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

Passados 60 dias da indução da osteoporose as ratas foram submetidas ao procedimento de amarria no dia -1 e ao final da 3ª semana ao procedimento de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo (Figura 1).

Figura 2 – Etapas cirúrgicas do procedimento de ovariectomia. (A) Realização de antissepsia do animal com degermante; (B) e (C) Incisão do peritônio e acesso a cavidade abdominal; D) Localização do ovário e chifre uterino; (E) e (F)

Laqueadura do chifre uterino e reposição dos tecidos laqueados; (G) Ovários removidos; (H) e (I) Sutura do plano superficial após remoção do ovário e reposição dos tecidos laqueados



Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

3.5 Período de Indução da Osteonecrose

No **dia 0** iniciou-se a indução de osteonecrose através da instituição do protocolo de 100µg/kg diluídos em 0,45 ml de solução salina, por via intraperitoneal, em uma seringa SLIP INSULINA de 1 ml, descartável com agulha de calibre 13mm x 0,38mm, a cada 3 dias por 7 semanas, até a eutanásia (28).

Os grupos que receberam o Zoledronato incluem o grupo **ZOL** (apenas aplicação do Zoledronato), **ZOL+OZ** (aplicação de Zoledronato e Ozonioterapia), **ZOL+CLX** (aplicação de Zoledronato e Gel de Clorexidina 2%), **ZOL+ MTZ** (aplicação de Zoledronato e Pasta base de Metronidazol), **ZOL+OZ+CLX** (aplicação de Zoledronato, Ozonioterapia e Clorexidina), **ZOL+OZ+MTZ** (aplicação de Zoledronato, Ozonioterapia e pasta base de Metronidazol). Os animais do grupo **SAL** não foram expostos ao medicamento, entretanto receberam 0,45 ml de solução salina também por via intraperitoneal, com o mesmo modelo de seringa, para mimetizar o estresse do manejo dos animais do grupo teste.

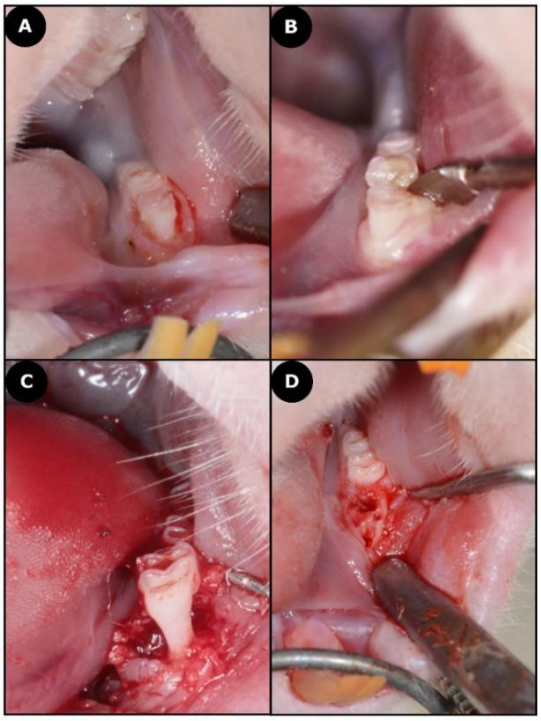
3.6 Anestesia

Todos os procedimentos (ligadura de algodão, extração dentária, aplicação das terapias e eutanásia) que poderiam causar algum desconforto ou dor nos animais foram realizados sob anestesia geral, utilizando Xilazina (10 mg/kg; Fort Dodge Sade Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) e Cetamina (80 mg/kg; Fort Dodge Sade Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil).

3.7 Exodontia

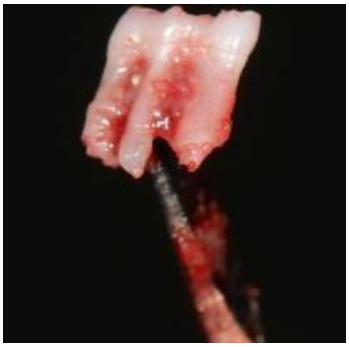
Sob sedação (Quetamina associada a Xilazina, como descrito anteriormente), após 3 semanas do início da medicação, as ratas foram posicionadas na mesa de operação; onde se removeu a ligadura de algodão e, após a antissepsia bucal com PVPI 10% (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), foi realizada a sindesmotomia dos tecidos adjacentes ao dente, luxação e, por fim, extração do primeiro molar inferior esquerdo, utilizando materiais cirúrgicos odontológicos adaptados aos animais. Todas as ratas, de todos os grupos experimentais, foram submetidas a esse procedimento (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Exodontia do primeiro molar inferior. (A) Remoção da ligadura de algodão; (B) Início dos movimentos de extração; (C) Luxação do primeiro molar inferior esquerdo; (D) Extração do dente e visualização do alvéolo sem fratura de raízes



Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

Figura 4 - Molar pós exodontia



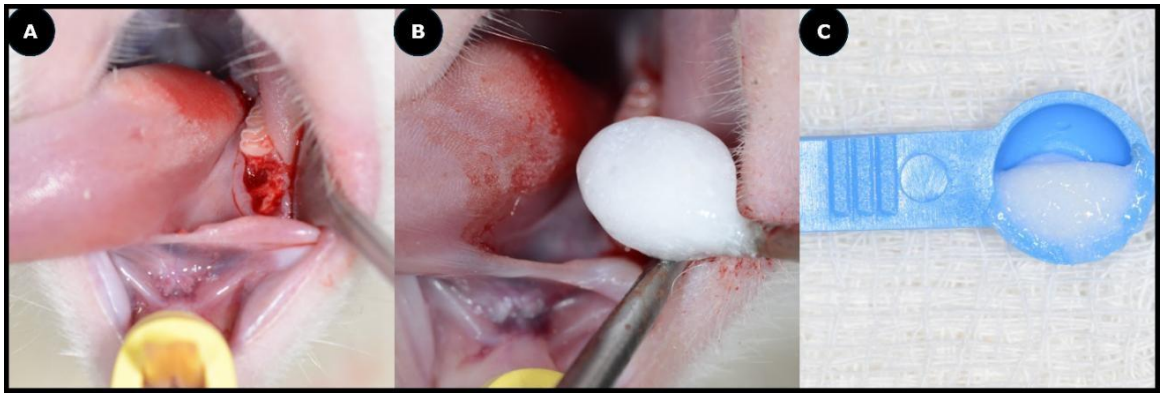
Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

3.8 Aplicação das Pastas Tópicas

3.8.1 Aplicação de Gel de Clorexidina 2%

Após a exodontia, os animais pertencentes aos grupos ZOL+CLX, E ZOL+OZ+CLX foram submetidos a aplicação tópica do gel de clorexidina 2% com auxílio de uma seringa de 5 ml e agulha de 27g, no momento da extração, no segundo e quarto dias pós-operatório, ficando mantida na região por dois minutos e por fim os animais mantidos na terapia com ZOL até o momento da eutanásia (Figura 5).

Figura 5 - Exodontia e aplicação de gel de clorexidina 2%. (A) Alvéolo pós-cirúrgico imediato. (B) Gel de Clorexidina 2% sendo aplicado na região do alvéolo imediato e foi repetido ao 2 e 4 dias pós-exodontia. (C) Gel de Clorexidina 2%

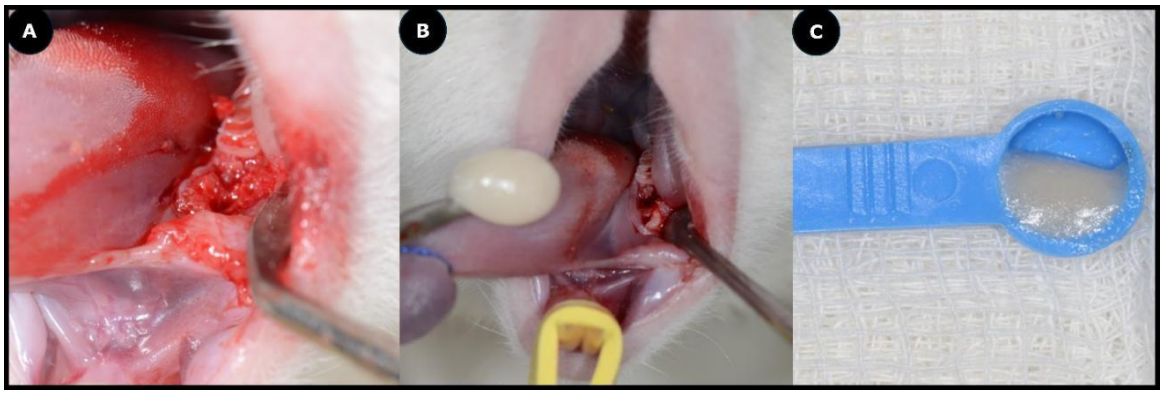


Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

3.8.2 Aplicação da Pasta de Metronidazol

Após a exodontia, os animais pertencentes aos grupos **ZOL+MTZ**, e **ZOL+OZ+MTZ** foram submetidos a aplicação tópica da pasta de metronidazol com auxílio de uma seringa de 5 ml e agulha de 27g, no momento da extração, no segundo e quarto dias pós-operatório, ficando mantida na região por dois minutos, por fim os animais mantidos na terapia com Zol até o momento da eutanásia (Figura 6).

Figura 6 - Exodontia e aplicação da pasta de metronidazol. (A) Alvéolo pós-cirúrgico imediato. (B) Pasta de metronidazol sendo aplicado na região do alveólo imediato e foi repetido ao 2 e 4 dias pós-exodontia. (C) Pasta de metronidazol

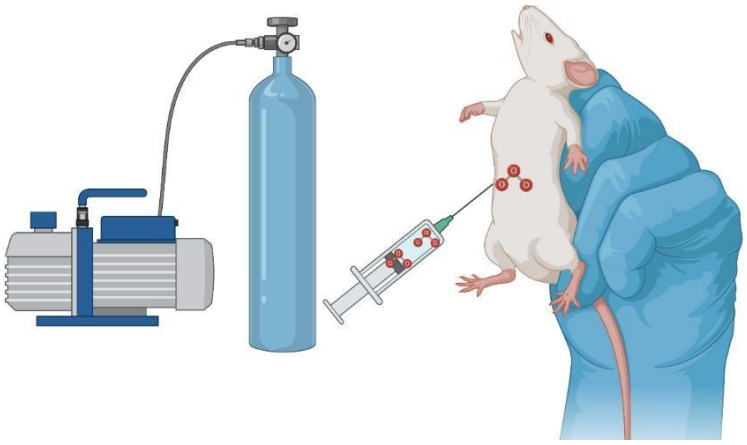


Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

3.8.3 Ozonioterapia

As ratas correspondentes aos grupos **ZOL+OZ, ZOL+OZ+MTZ, ZOL+OZ+CLX,** receberam a aplicação do ozônio, através do aparelho fornecido pela empresa OZONE&LIFE INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SISTEMASLTDA (São José dos Campos – SP), aplicado via intraperitoneal em concentração de 0,7mL/kg em seringa descartável de 30ml com agulha de calibre 25mm x 0,07mm, valor esse já estabelecido em outros estudos e publicações (25). Além disso, receberam a aplicação da pasta MTZ e do gel clorexidina 2%. (Figura 7)

Figura 7 - Esquema representando a aplicação de ozônio intraperitoneal



Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

3.8.4 Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada através de dose excessiva do anestésico. Os grupos **SAL, ZOL, ZOL+OZ, ZOL+CLX, ZOL+MTZ, ZOL+OZ+MTZ,** e **ZOL+OZ+CLX,** foram submetidos a eutanásia após 28 dias do procedimento de extração dos dentes dos grupos (totalizando 7 semanas). Posteriormente, as hemimandíbulas foram cuidadosamente dissecadas e pós-fixadas por 24 horas em paraformaldeído 4%.

3.8.5 Análise da condição geral de saúde dos animais e exame extra e intrabucal

Todos os espécimes coletados foram avaliados clinicamente, junto de registros fotográficos para identificar características como aspecto da mucosa, presença ou ausência de tecido reparacional, coloração dos tecidos moles, exposição ou não de tecido ósseo, presença de sequestro ósseo, supuração ou quaisquer outros aspectos acerca do reparo. Além disso, os animais foram pesados semanalmente para monitoramento da saúde geral.

3.8.6 Análise e Processamento dos tecidos descalcificados

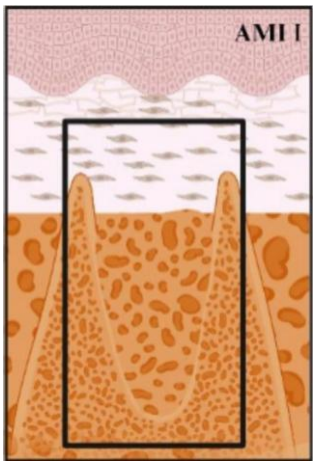
Após escaneamento as peças foram novamente submetidas a um banho de água, e após isso foram e partiram para a descalcificação em ácido etilenodiamino tetra-acético 10% (EDTA) por 8 semanas. Após a descalcificação, a região correspondente ao alvéolo e estruturas adjacentes da extração foram separadas. Assim, as peças seguiram para a desidratação numa sequência de álcoois (70 a 100%). Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 4 µm de espessura e a confecção das lâminas. Foram coletadas, de lingual para vestibular, as secções histológicas da porção do alvéolo dental e tecidos adjacentes a serem analisados. As lâminas pares após a microtomia foram destinadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE).

3.8.7 Análise microscópica e área microscópica de interesse (AMI)

As análises microscópicas foram realizadas por um histologista certificado, cego aos tratamentos. Para a análise histométrica foram avaliados três cortes histológicos localizados na porção vestibular, média e lingual do local da extração dentária. A área de interesse foi: AMI (I) que foi determinada de acordo com a análise microscópica realizada. A AMI (I) consistiu em uma área de 4 mm x 4 mm que inclui a porção do local da extração dentária anteriormente ocupada pelas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior esquerdo e tecidos adjacentes. Seu limite distal foi composto de uma linha situada paralelamente à dentina coronária e à superfície radicular do segundo molar inferior esquerdo, estendendo-se 4mm mesialmente. Seu limite coronário foi composto de uma linha paralela ao limite da margem cemento-gengival do segundo molar inferior esquerdo, estendendo-se 4mm apicalmente (22). O limite da área foi determinado por uma linha localizada no centro do tecido conjuntivo, perpendicular ao longo eixo dos dentes e que divide esse tecido em sua direção coronoapical. Duas outras linhas foram utilizadas, uma paralela à porção central do local de extração dentária anteriormente ocupada pela raiz mesial e outra paralela à porção central do local de extração dentária

anteriormente ocupada pela raiz distal do primeiro molar. A intersecção dessas linhas determinou o centro da área que foi analisada.

Figura 8 – Representação da área microscópica de interesse (AMI)



Fonte: elaborada pela Autora, 2026

3.8.8 Análise e Processamento de tecidos calcificados

3.8.8.1 Análise histológica e histométrica

3.8.8.2 Análise Histológica

A análise histológica com as características gerais dos tecidos e histométrica da área de tecido ósseo neoformado (AONF) foram realizadas através de fotomicrografias da área do alvéolo do dente extraído e tecidos adjacentes, que foram capturadas com o auxílio de um software de análise de imagem (Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant,State UNiversity of New York, USA). A área ocupada pela PONF foi estabelecida e expressa em μm2 como média ± desvio padrão em cada grupo experimental. Na região de Interesse AMI (I), as imagens foram capturadas utilizando um software de análise de imagem (Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant,State UNiversity of New York, USA) e conectada a um notebook (IdeaPad 1 AMD, Ryzen 5 7520U, 8GB, 512GB, SSD, Windows 11, Home “15,6" HD, Brazil) (Figura 8).

A quantificação da área de tecido ósseo neoformado e a porcentagem de tecido ósseo não vital foram calculados utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). A

AONV representa uma região onde mais de dez lacunas de osteócitos vizinhos apresentaram-se vazias ou contendo restos de osteócitos necróticos.

3.8.8.3 Avaliação do perfil inflamatório

Para a contagem de toda linhagem de células inflamatórias com ênfase em linfócitos e macrófagos, uma lâmina de cada animal por tempo experimental foi escolhido e dois cortes fotografados em um microscópio de luz (DM 4000B, Leica), um processador de imagens coloridas (software Leica Qwin V3, Leica) uma câmera colorida (DFC 500, Leica) e um computador (Intel Core I5, intel Corp, Santa Clara, CA; Windows 10, Microsoft Corp, Redmond, WA), sendo a primeira imagem feita no centro do defeito, seguida de uma à direita e outra à esquerda. Em uma magnificação de 100x, no programa ImageJ, uma grade (ferramenta “grid”) com 130 pontos, contando células inflamatórias.

3.8.8.4 Calibração do examinador

Ocorrido anteriormente as mensurações propostas, o avaliador foi submetido a um teste prévio do nível de compatibilidade entre mensurações onde foram realizadas as mensurações propostas no estudo de 12 animais randomizados, em duplicata com um intervalo de 1 semana entre elas, sendo aplicado o teste estatístico Kappa para análise intra examinador para verificação concordância entre os momentos de avaliação, considerando K>0,8 o mínimo para continuar as análises histométrica.

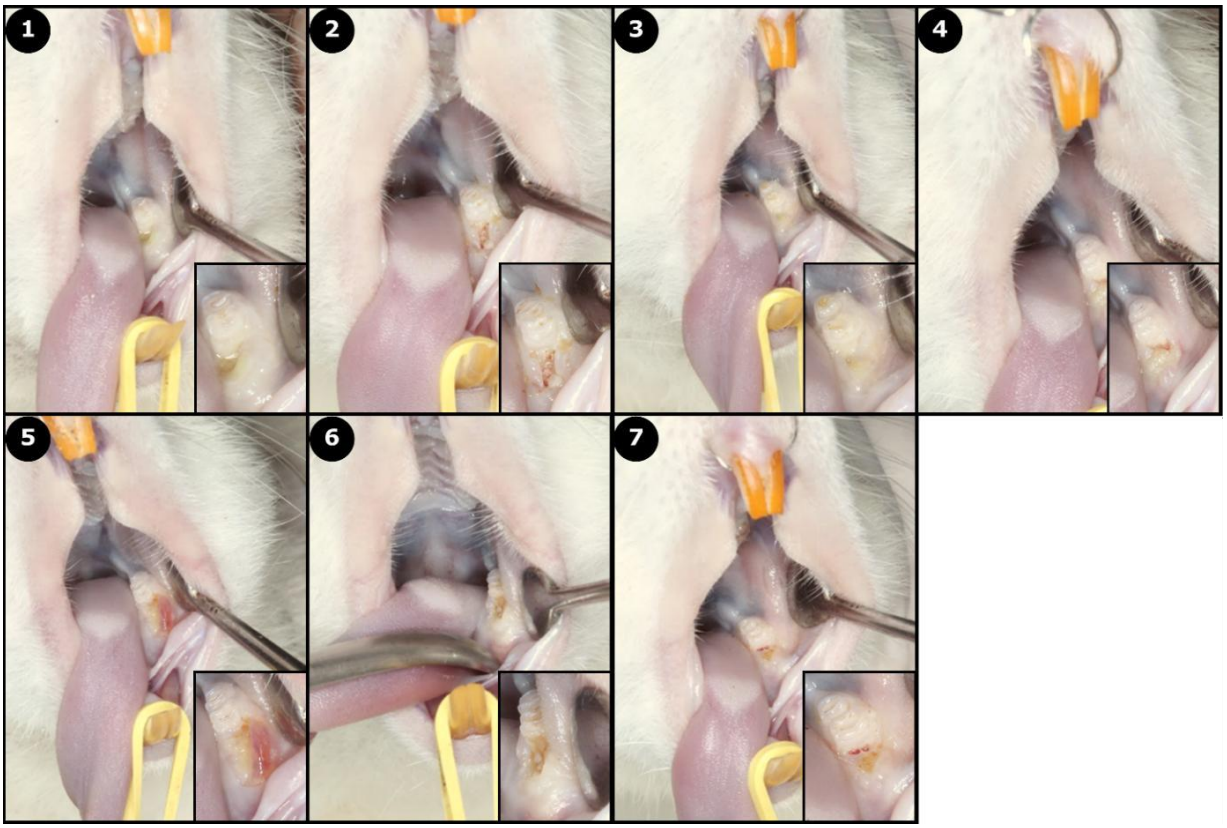
3.8.8.5 Análise dos dados

Todos os dados foram submetidos à curva de normalidade – teste de ShapiroWilk com nível de significância de 0,05 para todos os testes. Portanto, diante da homogeneidade ou heterogeneidade dos dados, um teste paramétrico ou não paramétrico foi aplicado. O programa estatístico utilizado foi o software GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADO

4.1 Análise da condição geral de saúde dos animais e exame extra e intrabucal

Figura 9 - Fotos clínicas dos animais, envolvendo exame extra e intraoral pré-eutanásia. (1) Grupo Sal; (2) Grupo Zol; (3) Grupo Ozônio; (4) Grupo MTZ; (5) Grupo MTZ + Ozônio; (6) Grupo CLX; (7) Grupo CLX + Ozônio. * Antes da coleta das amostras, a imagem clínica da região operada foi analisada por meio de fotografias com câmera Nikon utilizando flash macro de 105 mm, sempre pelo mesmo operador



Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

As condições gerais de saúde dos animais permaneceram constantes durante todo o período experimental. Esses animais toleraram o procedimento cirúrgico de extração do primeiro molar realizado em todos os grupos

experimentais, bem como as três sessões de terapias realizadas nos grupos **ZOL+OZ, ZOL+MTZ, ZOL+CLX, ZOL+MTZ+OZ e ZOL+CLX+OZ**.

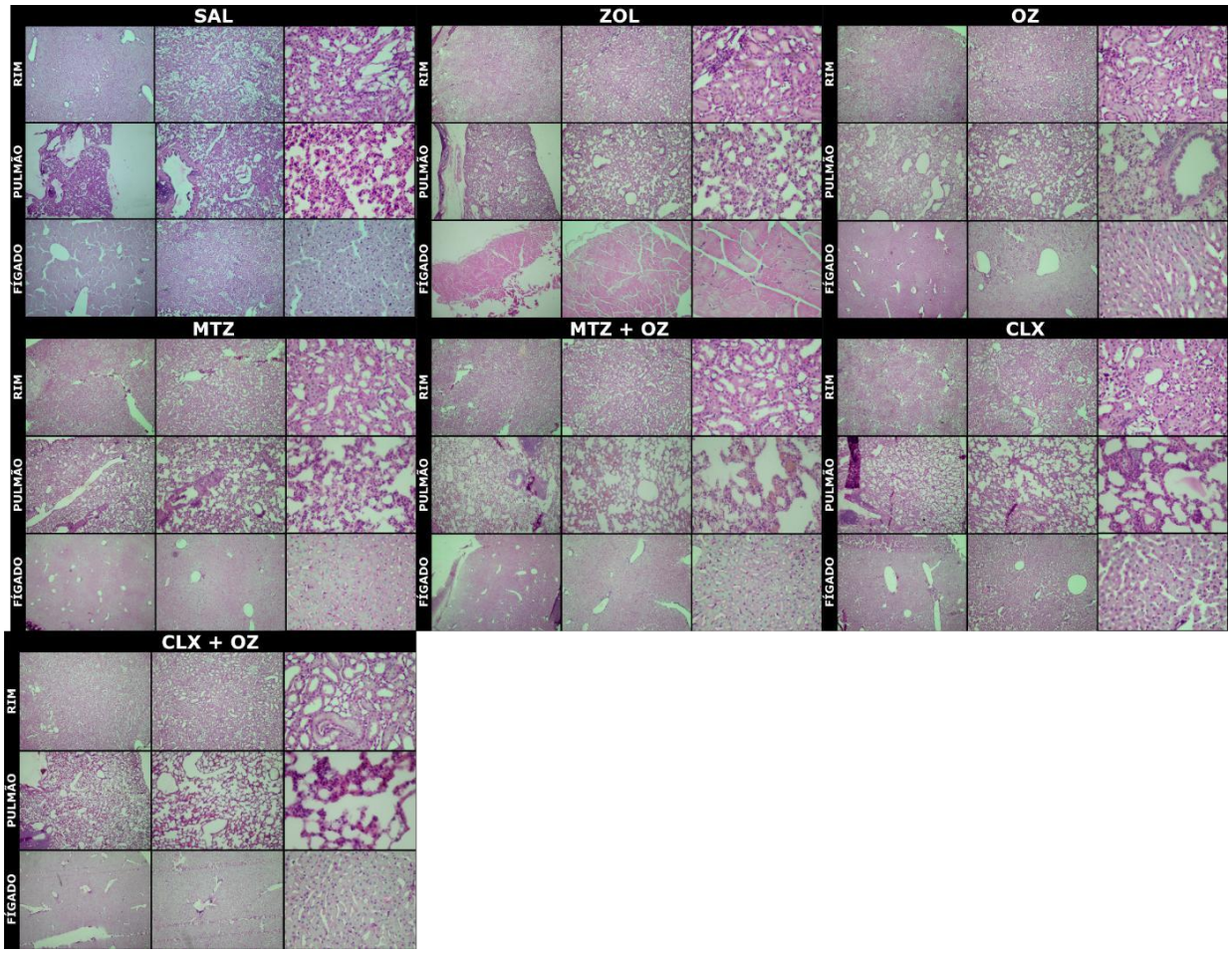
Ao final do período experimental, não houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal médio entre os grupos SAL (364 ± 7g), ZOL (350 ± 7g), ZOL+OZ (350 ± 5 g), ZOL+MTZ (346 ± 7 g), ZOL+CLX (342 ± 7 g) e ZOL+MTZ+OZ (350 ± 7 g) e ZOL+CLX+OZ (347 ± 7 g). Não houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal intragrupo durante todo o período experimental.

O exame clínico intraoral demonstrou boa cicatrização para os grupos SAL e OZ, visto que ambos não apresentaram exposição óssea e demonstram um perfil gengival mais sadio. O grupo ZOL foi marcado por uma área de osso exposto e tecido gengival de aspecto mais friável. Os demais grupos, apesar de apresentarem certa exposição óssea, demonstraram um aspecto gengival menos inflamado e mais aderido (Figura 9).

4.2 Análise dos órgãos coletados dos animais na eutanásia

Os órgãos metabolizadores (rim, fígado e pulmões) não apresentaram alterações estruturais para todos os grupos experimentais. À microscopia óptica , o fígado apresentou hepatócitos com características normais, organizados estruturalmente em lobos hepáticos, com todos os seus elementos constituintes presentes (vasos sanguíneos e ductos biliares). O rim apresentou corpúsculos renais bem-organizados e delimitados, intercalados com o sistema de túbulos e ductos específicos deste tecido. Em relação ao tecido muscular , o músculo estriado esquelético exibiu seus aspectos histológicos convencionais, com células alongadas; estrias transversais multinucleadas perifericamente; escassez de matriz extracelular entre elas; e organização em fascículos recobertos por tecido conjuntivo de aspecto normal (Figura 10).

Figura 10 - Prancha dos órgãos (rim, pulmão e fígado), nos respectivos aumentos 5x, 10x e 40x



Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

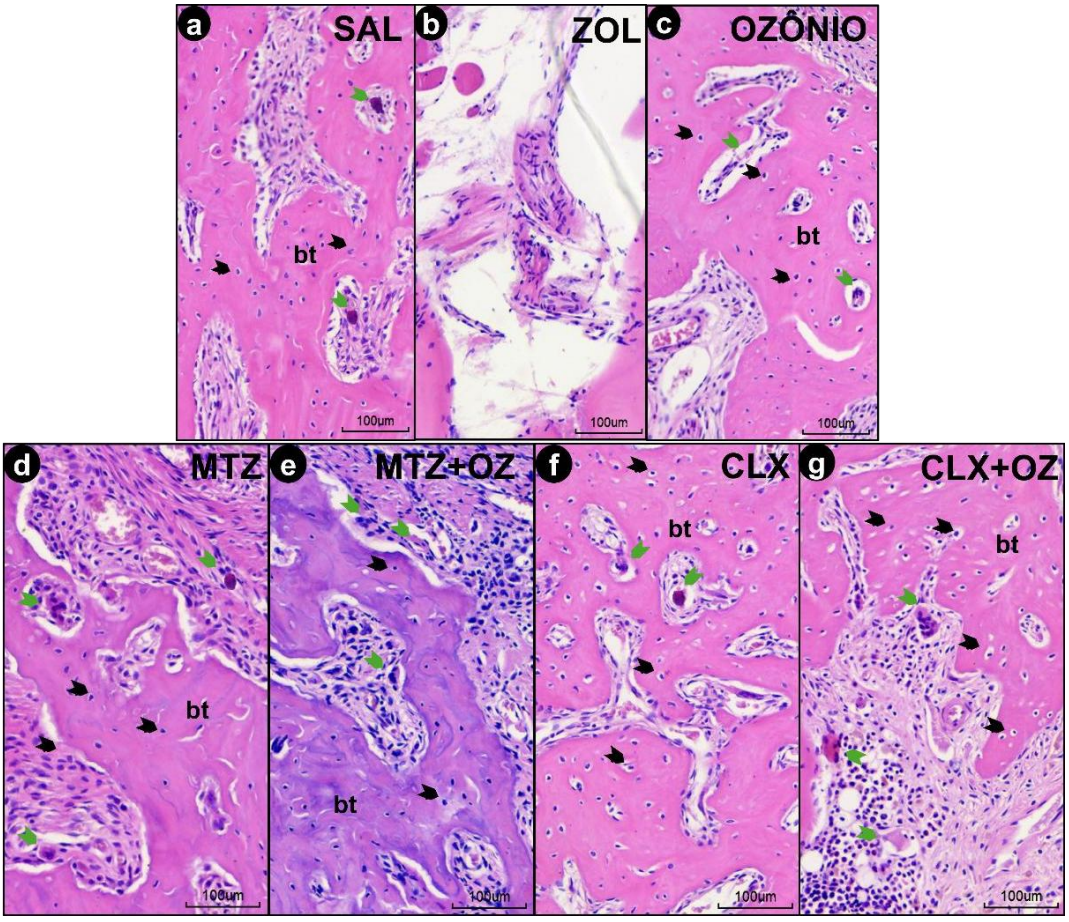
4.3 Análise histológica e histométrica

4.3.1 Análise Histológica

A análise histológica evidenciou tecido necrótico, como esperado, no grupo ZOL em regiões adjacentes, o interior do alvéolo se apresentava vazio. Já os grupos em que foram realizadas as terapias (OZ, MTZ, MTZ+OZ, CLX e CLX+OZ), tanto isoladamente quanto associados, demonstraram a presença de regiões significativas de tecido ósseo vital e poucas áreas necróticas. Pode-se observar no sítio de extração dentária e nas regiões adjacentes áreas de tecido ósseo vital lacunas de osteócitos ocupadas e trabéculas ósseas neoformadas densas e tecido

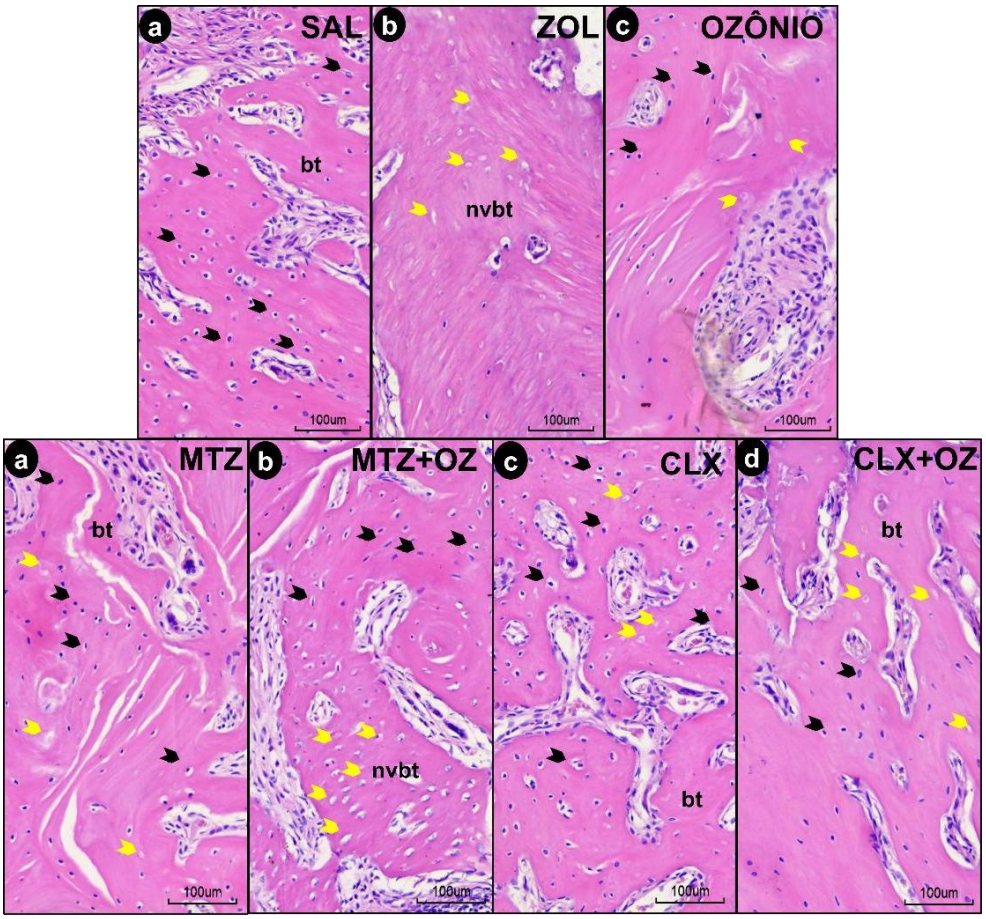
conjuntivo (Figuras 11 e 12). Na análise qualitativa intergrupos, os grupos, OZ, MTZ+OZ e CLX+OZ apresentaram-se com maior área de osso vital (Figura 12).

Figura 11 - Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios (TONF). (a – g) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL (a), ZOL (b), OZ (c), MTZ (d), MTZ+OZ (e), CLX (f), CLX+OZ (g). Abreviações e símbolos: setas verdes, osteoclastos; setas pretas, osteoblastos; bt, tecido ósseo; Aumento original: 60x. Barras de escala: 100 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E)



Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

Figura 12 - Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios (TONV). (a – g) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL(a), ZOL (b), OZ (c), MTZ (d), MTZ+OZ (e), CLX (f), CLX+OZ(g). Abreviações e símbolos: setas amarelas, lacunas vazias; setas pretas, osteoblastos; bt tecido ósseo; nvbt, tecido ósseo não vital. Aumento original: 60x. Barras de escala: 100 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E)

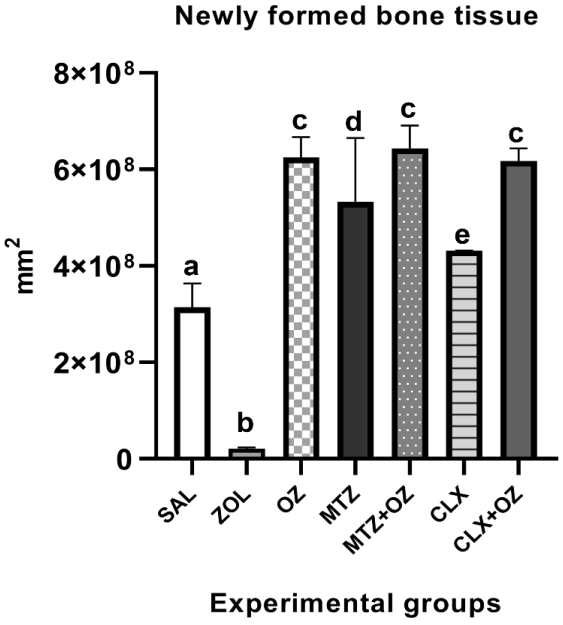


Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

4.3.2 Histometria

Analisando o gráfico de área de osso neoformado (AONF), o grupo ZOL apresenta a menor área de osso neoformado quando comparado aos demais grupos ($p<0.001$). O grupo SAL apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos grupos ZOL, OZ, MTZ, MTZ+OZ e CLX +OZ na neoformação óssea ($p<0.001$), entretanto, o grupo SAL não apresentou diferença estatística significante com o grupo CLX ($p=0.2185$). O grupo OZ não apresentou diferença estatística para os grupos MTZ ($p=0.393$), MTZ+OZ ($p=0.999$), CLX+OZ ($P=0.999$), sendo estatisticamente diferente apenas do grupo CLX ($p<0.001$). O grupo MTZ não apresentou diferença estatísticas entre os grupos MTZ+OZ ($p=0.207$), CLX ($p=0.3611$) e CLX+OZ ($p=0.566$). O grupo CLX, apresenta diferença estatística com o grupo CLX+OZ ($p=0.021$), com o grupo OZ e ZOL, ($p<0.001$). Por fim, os grupos MTZ+OZ e CLX+OZ não apresentaram diferenças estatísticas diferente entre si ($p=0.997$) (Figura 13).

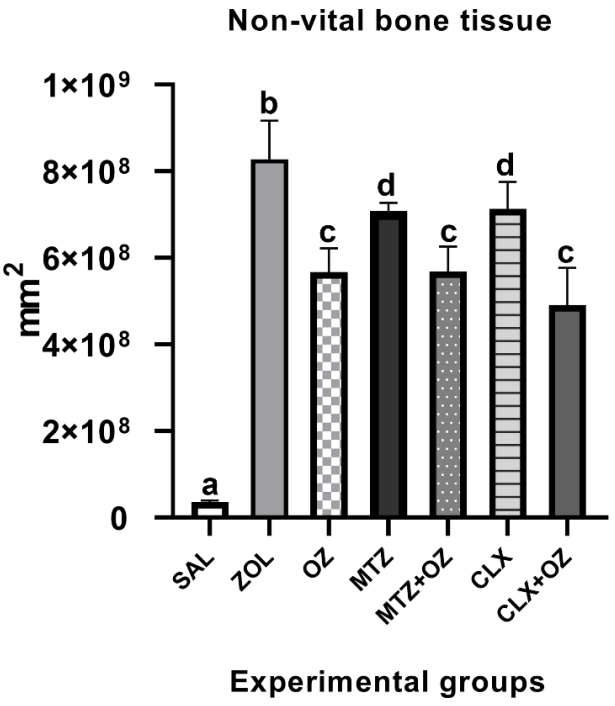
Figura 13- Tecido ósseo neoformado (TONF) no sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas entre os grupos



Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

Analisando a área de tecido ósseo não vital (AONV) o grupo ZOL ($p<0,05$) apresentou um resultado maior quando comparado as demais terapias, seguido pelo grupo MTZ ($p=0.125$) e CLX ($p=0.152$). O grupo OZ não apresentou diferenças estatísticas significantes quando comparado aos grupos de tratamento MTZ, MTZ+OZ, CLX e CLX+OZ ($p<0.001$). Os grupos que não receberam a ozonioterapia MTZ e CLX não obtiveram diferenças estatísticas entre si ($p<0.001$) (Figura 14).

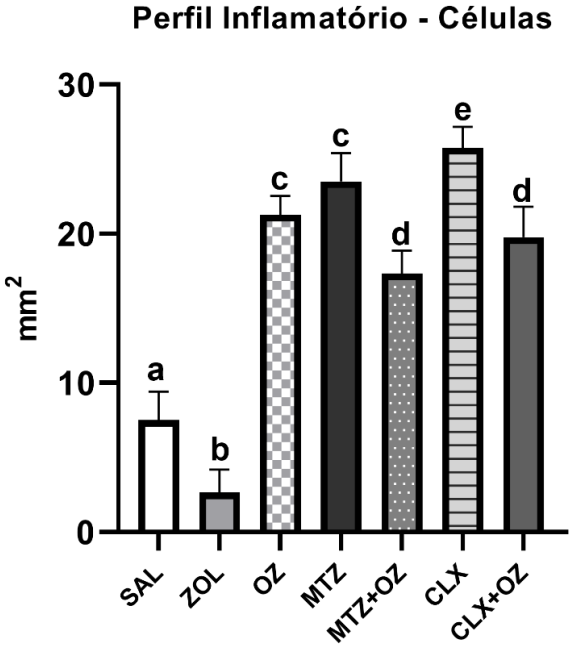
Figura 14 - Tecido osso não vital (TONV) no sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas entre os grupos



Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

4.4 Análise do Perfil Inflamatório

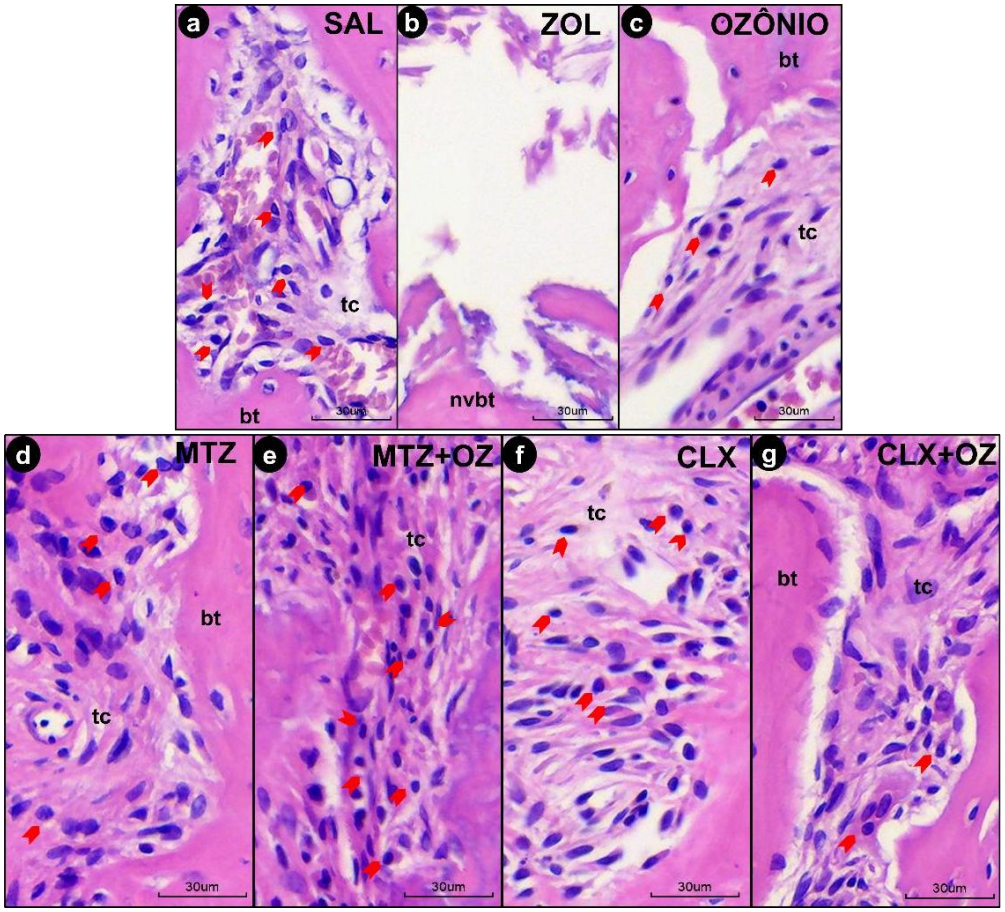
Figura 15 – Perfil inflamatório do sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas entre os grupos.



Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

No perfil inflamatório, o grupo SAL, mostra-se diferente estatisticamente dos demais grupos ($p<0.001$). O grupo ZOL ($p<0.001$), apresenta-se com o menor número de células inflamatórias, entretanto, quando analisado em conjunto a análise histológica notamos que os alvéolos estão vazios, não contendo nenhum tipo de célula (Figura 13). O grupo OZ, não apresenta diferença estatísticas com o grupo MTZ ($p=0.509$). O grupo CLX apresenta-se diferente estatisticamente de todos os grupos testes ($p<0.001$). Os grupos MTZ+OZ e CLX+OZ são iguais estatisticamente ($p=0.428$) (Figura 15). Observando o histológico, notamos tecido conjuntivo denso nos grupos testes, entretanto ao analisar o grupo SAL, percebe-se um tecido conjuntivo mais desorganizado com maior quantidade de vasos sanguíneos (Figura 16).

Figura 16 – Perfil inflamatório do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. (a – g) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL(a), ZOL (b), OZ (c), MTZ (d), MTZ+OZ (e), CLX (f), CLX+OZ(g). Abreviações e símbolos: vermelhas, linfócitos; bt, tecido ósseo; tc, tecido conjuntivo; nvbt, tecido ósseo não vital. Aumento original: 400x. Barras de escala: 100 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E)



Fonte: Elaborado pela Autora, 2026

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a administração de zoledronato compromete significativamente o reparo alveolar após exodontias, refletindo-se em alterações da arquitetura óssea, redução da neoformação, persistência de tecido ósseo não vital e modificações na organização dos tecidos moles. Em conjunto, esses achados reforçam que a supressão do metabolismo ósseo induzida pelos bifosfonatos exerce papel determinante na instalação e manutenção da osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos (MRONJ), corroborando observações previamente descritas na literatura (22,29).

A fisiopatologia da MRONJ é reconhecidamente multifatorial. Embora a inibição da atividade osteoclástica represente o principal mecanismo envolvido, evidências atuais demonstram que alterações vasculares, imunológicas e microbiológicas também participam da evolução da doença (30). Os bifosfonatos nitrogenados, especialmente o ácido zoledrônico, apresentam elevada afinidade pela hidroxiapatita e permanecem incorporados ao tecido ósseo por longos períodos. Durante o processo de remodelação, essas moléculas são internalizadas pelos osteoclastos, promovendo a inibição da via do mevalonato, culminando em apoptose celular e redução expressiva da reabsorção óssea. Como consequência, ocorre diminuição da renovação do tecido mineralizado, favorecendo o acúmulo de microdanos estruturais e retardando a reparação após procedimentos cirúrgicos, como as exodontias (31).

Além da supressão da remodelação óssea, os efeitos antiangiogênicos dos bifosfonatos contribuem para a redução do potencial regenerativo dos tecidos. A inibição da proliferação, adesão e migração de células endoteliais compromete a formação de novos vasos sanguíneos, reduzindo o aporte de oxigênio e nutrientes às áreas lesionadas (32). Paralelamente, alterações da resposta imunológica favorecem a colonização bacteriana e perpetuam o processo inflamatório local, estabelecendo um microambiente desfavorável ao reparo (33). Esses mecanismos explicam, em parte, a elevada frequência de exposição óssea persistente e de atraso cicatricial observada em pacientes submetidos ao uso prolongado dessas medicações.

Considerando essa complexidade fisiopatológica, terapias capazes de modular simultaneamente a inflamação, a resposta oxidativa e a regeneração tecidual têm despertado crescente interesse. Nesse contexto, a ozonioterapia vem sendo investigada como estratégia adjuvante em diferentes áreas da Odontologia devido às suas propriedades antimicrobianas, imunomoduladoras e bioestimuladoras (12,34). Embora sua utilização sistêmica ainda seja baseada predominantemente em evidências experimentais, os resultados obtidos neste estudo demonstram que essa modalidade terapêutica promoveu melhora consistente dos parâmetros histológicos e histométricos, refletindo-se em maior neoformação óssea e melhor organização dos tecidos quando comparada aos tratamentos tópicos empregados isoladamente.

Os efeitos biológicos do ozônio parecem estar relacionados à geração controlada de espécies reativas de oxigênio e de produtos da oxidação lipídica, capazes de ativar mecanismos antioxidantes endógenos e modular a produção de citocinas inflamatórias. Esse fenômeno favorece o equilíbrio entre estresse oxidativo e resposta inflamatória, criando condições mais favoráveis para a proliferação celular, deposição de matriz extracelular e reparação óssea. Além disso, estudos experimentais têm demonstrado que a terapia com ozônio pode estimular a atividade de fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais, favorecendo a angiogênese e a regeneração tecidual (25,35,36). Os resultados observados no presente estudo corroboram esses mecanismos, uma vez que os animais submetidos à terapia sistêmica apresentaram maior porcentagem de neoformação óssea e melhor organização histológica quando comparados aos grupos tratados exclusivamente com terapias locais.

Outro aspecto relevante refere-se à segurança da administração sistêmica do ozônio. A avaliação histológica dos rins, fígado e pulmões não evidenciou alterações morfológicas compatíveis com toxicidade, indicando que o protocolo utilizado não promoveu efeitos deletérios nesses órgãos. Esses achados estão em concordância com investigações experimentais anteriores que também não identificaram comprometimento funcional ou estrutural após protocolos semelhantes de ozonioterapia sistêmica (27,37). Dessa forma, além dos benefícios

observados no reparo alveolar, os resultados sugerem que o tratamento apresentou adequada biocompatibilidade dentro das condições experimentais adotadas.

As terapias tópicas também desempenharam papel importante no controle local da doença. Tanto a pasta de metronidazol quanto o gel de clorexidina promoveram melhora dos parâmetros histológicos quando comparados ao grupo tratado apenas com zoledronato, evidenciando sua contribuição para a estabilização do processo infeccioso e para a evolução favorável do reparo. A administração local desses agentes apresenta vantagens em relação ao tratamento antimicrobiano sistêmico, uma vez que proporciona elevadas concentrações do princípio ativo diretamente na área lesionada, reduzindo a exposição sistêmica, os riscos de resistência bacteriana e a ocorrência de efeitos adversos (38).

O metronidazol apresenta elevada eficácia contra microrganismos anaeróbios frequentemente associados às infecções odontogênicas e, além de sua atividade antimicrobiana, estudos sugerem que pode favorecer a proliferação de fibroblastos e osteoblastos, contribuindo para a reorganização dos tecidos durante o processo cicatricial (18,38–40). Da mesma forma, o gel de clorexidina a 2% apresenta elevada substantividade, característica que prolonga sua permanência na superfície tecidual e modula sua ação antimicrobiana quando comparada às formulações convencionais em solução (41,42). No presente estudo, ambas as terapias apresentaram desempenho semelhante quanto aos parâmetros histológicos e histométricos, indicando que ambas constituem alternativas viáveis para o manejo local das lesões experimentais de MRONJ.

Entretanto, os resultados mais expressivos foram observados quando as terapias tópicas foram associadas à ozonioterapia sistêmica. Essa combinação promoveu melhor organização epitelial, maior percentual de neoformação óssea e características histológicas mais próximas às observadas no grupo controle. Esses achados sugerem que a atuação simultânea sobre diferentes mecanismos fisiopatológicos controle microbiano local, modulação inflamatória sistêmica e estímulo à regeneração pode produzir efeito superior ao obtido por cada terapia isoladamente.

Embora áreas de tecido ósseo não vital ainda tenham sido identificadas em alguns espécimes tratados, observou-se manutenção da integridade clínica dos tecidos e ausência de progressão das lesões experimentais, indicando estabilização do quadro. Esse aspecto possui relevância clínica, uma vez que, na MRONJ, a interrupção da progressão da doença representa um dos principais objetivos terapêuticos, especialmente nos estágios iniciais, nos quais abordagens conservadoras podem preservar a qualidade de vida dos pacientes e evitar procedimentos cirúrgicos mais extensos (43).

Como limitações deste estudo, destaca-se a utilização de um modelo experimental em animais, que, embora reproduza diversos aspectos da fisiopatologia da MRONJ, não contempla integralmente a complexidade das condições clínicas observadas em humanos. Além disso, fatores como tempo de exposição aos medicamentos, presença de comorbidades e variabilidade individual não podem ser completamente reproduzidos em modelos experimentais. Dessa forma, estudos clínicos prospectivos e ensaios controlados são necessários para confirmar os efeitos observados e estabelecer protocolos terapêuticos seguros e reprodutíveis para aplicação clínica.

Em conjunto, os resultados desta investigação demonstram que a ozonioterapia sistêmica, especialmente quando associada ao uso local de metronidazol ou clorexidina, favorece o reparo dos tecidos ósseos em um modelo experimental de MRONJ. A modulação simultânea da inflamação, do controle microbiano e da regeneração tecidual sugere que essa abordagem representa uma estratégia adjuvante promissora para o manejo da doença, justificando a realização de estudos translacionais que possam confirmar sua eficácia e segurança em pacientes humanos(27,44).

6.CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa permitem concluir que a ozonioterapia sistêmica tem um efeito benéfico no tratamento da MRONJ e o uso de terapias locais como pasta de metronidazol 10% e gel de clorexidina 2% colaboraram para melhorar quadros de prevenção da osteonecrose. Quando essas terapias locais foram associadas ao ozônio sistêmico os resultados dessa pesquisa permitiram observar a modulação da MRONJ.

7. REFERÊNCIAS

1. Kim J-E. Special Issue “Cells and Molecules in Bone Remodeling and Repair.” Int J Mol Sci. 2025;26(24):11796. DOI: 10.3390/ijms262411796

2. Hu W, Chen S, Zou X, Chen Y, Luo J, Zhong P, et al. Oral microbiome, periodontal disease and systemic bone-related diseases in the era of homeostatic medicine. J Adv Res. 2025;73:443–58. DOI: 10.1016/j.jare.2024.08.019

3. Camargos MCS, Bomfim WC. Osteoporose e Expectativa de Vida Saudável: estimativas para o Brasil em 2008. Cad Saude Colet. 2017;25(1):106–12. DOI: 10.1590/1414-462x201700010150

4. Zhang X, Liang Y, Zhang F, Liu X. Osteoporosis: molecular pathogenesis and therapeutic interventions. Molecular Biomedicine. 2025;6(1):98. DOI: 10.1186/s43556-025-00349-5

5. Fu H, Wu Y, Lv H, Qiu L, Hu W, Wu H, et al. Unravelling Osteoporosis: Key Genes and Potential Therapies. J Cell Mol Med. 2025;29(15). DOI: 10.1111/jcmm.70759

6. Luo J, Li L, Shi W, Xu K, Shen Y, Dai B. Oxidative stress and inflammation: roles in osteoporosis. Front Immunol. 2025;16. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1611932

7. Morin SN, Leslie WD, Schousboe JT. Osteoporosis. JAMA. 2025;334(10):894. DOI: 10.1001/jama.2025.6003

8. He L, Sun X, Liu Z, Qiu Y, Niu Y. Pathogenesis and multidisciplinary management of medication-related osteonecrosis of the jaw. Int J Oral Sci. 2020;12(1):30. DOI: 10.1038/s41368-020-00093-2

9. De Jesus AP, Sousa Filho FS, Cardoso JA, Câncio AV, Simões CC, De Farias JG. Tratamento cirúrgico para osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos: relatos de casos. Revista da Faculdade de Odontologia - UPF. 2019;24(1):22–30. DOI: 10.5335/rfo.v24i1.8790

10. Dos Santos WB, Pereira R da S, De Branco Gonçalves VC, Do Nascimento SV, De Moura Silva AH, Guerra Costa AM, et al. Osteonecrose dos Maxilares

associada ao uso crônico de bisfosfonatos: relato de caso. Revista Eletrônica Acervo Saúde. 2020;12(2):e2398. DOI: 10.25248/reas.e2398.2020

11. Martins LHI, Ferreira DC, Silva MT, Motta RHL, Franquez RT, Bergamaschi C de C. Frequency of osteonecrosis in bisphosphonate users submitted to dental procedures: A systematic review. Oral Dis. 2023;29(1):75–99. DOI: 10.1111/odi.14003

12. Ruiz Rincón M, Cortés-Bretón Brinkmann J, Granić M, Sáez-Alcaide LM, Sánchez-Labrador L, López-Carriches C, et al. Ozone therapy for medication-related osteonecrosis of the jaw: a scoping review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2026;141(6):751–61. DOI: 10.1016/j.oooo.2025.11.005

13. Xiao W, Tang H, Wu M, Liao Y, Li K, Li L, et al. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Biosci Rep. 2017;37(6). DOI: 10.1042/BSR20170658

14. Carneiro MC, da Silva JF, dos Santos TC, Cardoso CL, da Silva Santos PS. Ozone therapy as an adjunctive strategy for MRONJ in oncology patients: A systematic review and meta-analysis. Supportive Care in Cancer. 2026;34(1):25. DOI: 10.1007/s00520-025-10246-w

15. Monteiro CGJ, Vieira EM, Emerick C, Azevedo RS, Pascoal VAB, Homsi N, et al. Ozonated oil effect for prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in rats undergoing zoledronic acid therapy. Clin Oral Investig. 2021;25(12):6653–9. DOI: 10.1007/s00784-021-03951-3

16. Cabras M, Gambino A, Broccoletti R, Sciascia S, Arduino PG. Lack of evidence in reducing risk of MRONJ after teeth extractions with systemic antibiotics. J Oral Sci. 2021;63(3):217–26. DOI: 10.2334/josnusd.21-0016

17. Suvarna V, Murahari M, Pawar S. Metronidazole—An Old Drug for Structure Optimization and Repurposing. Chem Biodivers. 2025; DOI: 10.1002/cbdv.202403389

18. Wilson Roberto Poi, Paulo Sérgio Perri de Carvalho, Tetuo Okamoto, Eduardo Dias de Andrade, sônia Regina Panzarini. Influência da pasta à base de

metronidazol a 10% e lidocaína a 2% sobre o processo de reparo em alvéolo dental infectado: análise histológica e histometrica em ratos. Odontol UNESP [Internet]. 1998 [cited 2026 Jul 23];27:53–72. Available from: https://hdl.handle.net/20.500.14330/PER01000231970

19. Fiorillo L. Chlorhexidine Gel Use in the Oral District: A Systematic Review. Gels. 2019;5(2):31. DOI: 10.3390/gels5020031

20. Kaur J, Raval R, Bansal A, Kumawat V. Repercussions of intraalveolar placement of combination of 0.2% chlorhexidine and 10 Mg metronidazole gel on the occurrence of dry sockets- A randomized control trial. J Clin Exp Dent. 2017;0–0. DOI: 10.4317/jced.53262

21. Rakhshan V. Common risk factors of dry socket (alveolitis osteitis) following dental extraction: A brief narrative review. J Stomatol Oral Maxillofac Surg. 2018;119(5):407–11. DOI: 10.1016/j.jormas.2018.04.011

22. Ervolino E, Olivo MB, Toro LF, Freire J de OA, Ganzaroli VF, Guiati IZ, et al. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy mediated by butyl toluidine blue in preventing medication-related osteonecrosis of the jaws in rats. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2022;40:103172. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2022.103172

23. Ebetino FH, Sun S, Cherian P, Roshandel S, Neighbors JD, Hu E, et al. Bisphosphonates: The role of chemistry in understanding their biological actions and structure-activity relationships, and new directions for their therapeutic use. Bone. 2022;156:116289. DOI: 10.1016/j.bone.2021.116289

24. Silva PG de B, Praxedes Neto RA de LP, Lima LA, Lemos JVM, Rodrigues MIDQ, Alves APNN, et al. Photodynamic therapy and photobiomodulation therapy in zoledronic acid-induced osteonecrosis in rats. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2022;38:102889. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2022.102889

25. Baggio AMP, Bizelli VF, Delamura IF, Viotto AHA, Veras ASC, Teixeira GR, et al. Systemic ozone therapy as an adjunctive treatment in guided bone regeneration: a histomorphometrical and immunohistochemical study in rats. Clin Oral Investig. 2024;28(10):556. DOI: 10.1007/s00784-024-05961-3

26. Toro LF, de Mello-Neto JM, Santos FFV dos, Ferreira LC, Statkievicz C, Cintra LTÂ, et al. Application of Autologous Platelet-Rich Plasma on Tooth Extraction Site Prevents Occurence of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws in Rats. Sci Rep. 2019;9(1):22. DOI: 10.1038/s41598-018-37063-y

27. Silva MC, Delamura IF, de Sá Simon ME, Barbosa S, Ting DT, Bechara K, et al. Is There an Ideal Concentration of Ozonized Oil for the Prevention and Modulation of Zoledronate-Induced Mandibular Osteonecrosis? A Study on Senescent Rats. J Funct Biomater. 2024;15(12):353. DOI: 10.3390/jfb15120353

28. Ervolino E, Statkievicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. Bone. 2019;120:101–13. DOI: 10.1016/j.bone.2018.10.014

29. Fleisher KE, Janal MN, Albstein N, Young J, Bikhazi V, Schwalb S, et al. Comorbid conditions are a risk for osteonecrosis of the jaw unrelated to antiresorptive therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2019;127(2):140–50. DOI: 10.1016/j.oooo.2018.09.012

30. McGowan K, McGowan T, Ivanovski S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: A systematic review. Oral Dis. 2018;24(4):527–36. DOI: 10.1111/odi.12708

31. Jelin-Uhlig S, Weigel M, Ott B, Imirzalioglu C, Howaldt H-P, Böttger S, et al. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw and Oral Microbiome: Clinical Risk Factors, Pathophysiology and Treatment Options. Int J Mol Sci. 2024;25(15):8053. DOI: 10.3390/ijms25158053

32. Vincenzi B, Santini D, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, La Cesa A, et al. Zoledronic Acid-Related Angiogenesis Modifications and Survival in Advanced Breast Cancer Patients. Journal of Interferon & Cytokine Research. 2005;25(3):144–51. DOI: 10.1089/jir.2005.25.144

33. Roato I, Mauceri R, Notaro V, Genova T, Fusco V, Mussano F. Immune Dysfunction in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. Int J Mol Sci. 2023;24(9):7948. DOI: 10.3390/ijms24097948

34. Goker F, Donati G, Gallo F, Sparaco A, Rania V, Busa A, et al. Ozone infiltration as an adjunctive treatment to piezoelectric surgery in the management of medication-related osteonecrosis of the jaws: case series of 29 patients. Oral Maxillofac Surg. 2024;28(3):1197–207. DOI: 10.1007/s10006-024-01246-x

35. Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review. Mediators Inflamm. 2010;2010:1–9. DOI: 10.1155/2010/610418

36. Carvalho TO, de Almeida WP, Palma FR, Pilati PVF, Zanardo V, Chaves AJL, et al. Effect of ozone and low power laser as therapeutic alternatives on the alveolar repair process after tooth extraction in rats wistar exposed to nicotine. Oral Maxillofac Surg. 2025;29(1):54. DOI: 10.1007/s10006-025-01339-1

37. Özalp Ö, Göksu O, Toru HS, Altay MA, Sindel A. Comparing the effects of low-level laser therapy and gaseous ozone as a preventive measure on medication-related osteonecrosis of the jaws following tooth extraction: a rat model. Eur J Med Res. 2024;29(1):359. DOI: 10.1186/s40001-024-01907-3

38. Mariano RC, Oliveira MR, Silva LC, Ferreira S, Garcia Júnior IR, de Carvalho Silva A. Effect of topical application of chlorhexidine and metronidazole on the tissue repair of palatal wounds of rats: a clinical and histomorphometric study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2015;119(5):505–13. DOI: 10.1016/j.oooo.2014.12.023

39. Reekie D, Downes P, Devlin C V, Nixon GM, Devlin H. The prevention of “dry socket” with topical metronidazole in general dental practice. Br Dent J. 2006;200(4):210–3. DOI: 10.1038/sj.bdj.4813253

40. Wilson Roberto Poi, Paulo Sérgio Perri de Carvalho, Sônia Regina, Eduardo Dezan Júnior, Cláudio Luiz Trevisan, Geraldo Souza. Estudo da pasta de metronidazol, lidocaína e ascorbosilane C sobre o processo de reparo de alvéolos dentais infectados em ratos. 2000:22–8.

41. Ruggiero SL, Dodson TB, Aghaloo T, Carlson ER, Ward BB, Kademani D. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws—2022 Update. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2022;80(5):920–43. DOI: 10.1016/j.joms.2022.02.008

42. Cabral CT, Fernandes MH. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone–iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. Clin Oral Investig. 2007;11(2):155–64. DOI: 10.1007/s00784-006-0094-8

43. Seluki R, Seluki M, Vaitkeviciene I, Jagelaviciene E. Comparison of the Effectiveness of Conservative and Surgical Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: a Systematic Review. J Oral Maxillofac Res. 2023;14(4). DOI: 10.5037/jomr.2023.14401

44. Zhou J, Hu B, Liu Y, Yang Z, Song J. The efficacy of intra-alveolar 0.2% chlorhexidine gel on alveolar osteitis: a meta-analysis. Oral Dis. 2017;23(5):598–608. DOI: 10.1111/odi.12553

ANEXOS

ANEXO A- Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FOA/UNESP)

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Terapias auxiliares para o tratamento de osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos após exodontia em ratas ovarectomizadas"**, Processo FOA nº 0268-2022, sob responsabilidade de Ana Paula Farnezi Bassi apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Maio de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Maio de 2024.
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Junho de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Auxiliary therapies for the treatment of drug-induced osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in ovarectomized female rats"**, Protocol FOA nº 0268-2022, under the supervision of Ana Paula Farnezi Bassi presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 30, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 30, 2024.
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 30, 2024.

Prof. Dr. João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br