



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba

NATÁLIA SAORI IZUMI

**Terapias alternativas para o tratamento de osteonecrose dos
maxilares induzida por medicamentos após exodontia em ratas
senis ovariectomizadas**

Araçatuba

2024

NATÁLIA SAORI IZUMI

**Terapias alternativas para o tratamento de osteonecrose dos
maxilares induzida por medicamentos após exodontia em ratas
senis ovariectomizadas**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista (UNESP), como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Professora Assistente
Doutora Ana Paula Farnezi Bassi.

Araçatuba

2024

Dedico o presente trabalho aos meus amados pais, que nunca mediram esforços para tornar meus sonhos reais. Nada seria minimamente possível sem o amor, encorajamento e acolhimento deles.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. **Alberto Carlos Botazzo Delbem** e do vice-diretor Prof. **Luciano Tavares Cintra**.

Aos meus pais, **Lucy Mami Morita Izumi** e **Claudio Toshiyuki Izumi**, obrigada por todos os incontáveis esforços feitos para que eu pudesse chegar até aqui. Por serem exemplo de pessoas de luz e de bom coração, moldando-me a ser quem sou hoje. Acima de tudo, obrigada por fazerem do mundo uma incrível jornada para vivermos, desbravarmos e evoluirmos juntos, dia a dia. Eu amo vocês com todo meu ser.

À minha irmã caçula, **Beatriz Kiwa Izumi**, por despertar em mim a vontade de ser uma pessoa melhor, mais cuidadosa, gentil, carinhosa e forte, para que assim, eu possa ser um melhor exemplo para ela. Eu te amo e tenho muito orgulho de ser sua irmã.

À minha prima e irmã mais velha, **Danielle Izumi Hisatugo**, pelo privilégio de crescermos juntas e dividirmos cada momento até aqui. Sem dúvidas não poderia ter uma companheira melhor durante todos estes anos e todos os demais que estão por vir. Eu te amo e sou grata pela sua vida todos os dias.

Aos meus avós maternos **Kimie Morita** (*in memorian*) e **Kazuaki Morita** e avós paternos **Maria Izumi** e **Kiyomitsu** (*in memorian*) por serem exemplos de força, perseverança e deixarem um legado amor em nossa família. Sou grata e espero orgulhá-los e honrá-los sempre.

Aos tios e tias **Nancy Mika Morita Bauemeister de Araújo**, **Antônio César Bauemeister de Araújo**, **Marcio Kazushi Morita**,

Claudia Joboji Morita, Marcos Satoru Morita, Silvia Shizue Izumi Hisatugo, Ana Paula Kuwabara, Roberto Takao Izumi, Simone de Goes Kakimoto, Carlos Kakimoto, Lina Yamamoto e Silvia Sumie Onishi, e aos primos **Letícia Izumi Hisatugo, Lucas Keniti Izumi, Tiago Kenzo Izumi, Tiago Kazuo Morita Bauemeister de Araújo e Felipe Daigo Morita**, por serem pilar essencial da nossa família e da minha vida. Obrigada por todos os ensinamentos, por serem os melhores e plantarem o melhor em mim. Amo vocês e carrego um pouco de cada um dentro do meu coração.

À **Ana Paula Farnezi Bassi**, minha querida orientadora, por ser exemplo e inspiração de pessoa, profissional, pesquisadora e por me conceder a grande oportunidade de, com ela, aprender tanto sobre pesquisa e ciência quanto sobre a vida, permitindo assim que eu evoluísse como graduanda e ser humano.

Aos Doutorandos **Vinicius Ferreira Bizelli e Ana Maira Pereira Baggio**, por toda ajuda, gentil orientação e paciência. Este trabalho não teria se concretizado sem a ajuda de vocês.

À mestranda **Izabela Fornazari Delamura**, minha eterna gratidão e admiração pela profissional e pessoa que é. Obrigada por ter, pacientemente, me ensinado tudo que sei sobre pesquisa e a iniciação científica. Amo e torço por você com todo meu coração.

Ao grupo de pesquisa, **Arthur Henrique Alécio Viotto, Bruna Stefani da Costa e Silva, Douglas Sadrac de Biagi, Murilo Souza de Carvalho**, muito obrigada pela amizade, paciência, aprendizados e por dividirem os pesos do dia-a-dia da iniciação científica, tornado meu caminho mais leve e alegre.

Aos melhores amigos, **Guilherme Assumpção Silva e Mileni Buzo Souza**, pela irmandade, cuidado, inúmeras horas de conversas,

por toda compreensão, milhões de risadas e todo o apoio que me deram durante a graduação. Por serem minha família e meu lar em Araçatuba e aonde quer que a gente esteja. Tenho certeza que estaremos sempre juntos e torcendo um pelo outro. Amo vocês para sempre.

Às amigas, **Bárbara Penatti, Gabriela Carrara Simionato, Giovanna Lima Fortunato, Janaína Gabrielli Sobral, Júlia Maria Batista da Silva, Maria Helena Rocha Barbosa**, por tantos momentos incríveis partilhados e por serem tão especiais para mim. Amo muito vocês e torço com todo coração por cada uma.

Às amigas de infância e irmãs de coração, **Amanda Luri Shirasu, Camila Yukari Yorozyua e Eduarda de Goes Kakimoto**, pelos anos de amizade, inúmeras memórias felizes juntas e por apesar da distância e desencontros durante a graduação, estarem sempre presentes, torcendo e me enviando boas energias. Eu amo muito vocês.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pelo carinho e atenção sempre oferecidos.

A agência de **Fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), Processo nº 2022/13276-3.

Ao Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia (MUBIO) e FINEP (Convênio FINEP 01.12.0530.00 – FINEP/PROINFRA 01/2011) da FOA-UNESP, onde foram realizadas as análises de microtomografia computadorizada, em especial aos seus responsáveis.

Aos **animais**, *in memoriam*, que tiveram suas vidas sacrificadas em prol da ciência.

“Todo caminho da gente é resvaloso. Mas também, cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta. O ocorrer da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

João Guimarães Rosa.

RESUMO

IZUMI, NS. Avaliação de terapias alternativas para o tratamento da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos em ratas senis ovariectomizadas. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

A osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (MRONJ) é uma condição patológica que ainda não apresenta consenso na literatura sobre o seu tratamento. Terapias secundárias podem desempenhar papel importante no controle e resposta tecidual, podendo as pastas tópicas à base de Metronidazol e Lidocaína e à base de Clorexidina ser promissoras. O objetivo deste trabalho é avaliar o desempenho tópico da pasta a base de Metronidazol e Lidocaína e outra à base de Clorexidina no tratamento da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos após exodontia em ratas senis ovariectomizadas. Para isso, 20 animais (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) fêmeas foram submetidas aos procedimentos operatórios: ovariectomia bilateral, inserção de fio de algodão ao redor do 1º molar inferior esquerdo, exodontia e aplicação tópica das pastas no alvéolo no dia da extração, 2 e 4 dias após. A eutanásia ocorreu ao final de 7 semanas, por dose excessiva de anestésico. As mandíbulas foram ressecadas, reduzidas e preparadas para as análises. Os resultados da análise histomorfométrica mostram superioridade do grupo POI em relação aos demais grupos e semelhança com o grupo CLX. Na análise histométrica, avaliando área de osso neoformado, grupo POI obteve maior neoformação óssea, sendo diferente estatisticamente do grupo ZOL ($p=0,062$), do grupo CLX ($p=0,020$) e do grupo Sal ($p=0,001$). Na análise de percentual de osso neoformado, o grupo POI apresentou a maior área de osso neoformado (100%) e os demais grupos 64% (grupo CLX), 45% (grupo SAL) e 8,9% (grupo ZOL). A diferença de percentual foi ocupada por tecido conjuntivo e um percentual de osso não vital (PONV). Na análise microtomográfica, para avaliação quantitativa do tecido ósseo, não há diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$). Na avaliação da qualitativa, apenas em TbSp foi observado diferença estatística significativa entre os grupos SAL e POI ($p=0,01$). Conclui-se que terapias adjuvantes como a utilização de agentes tópicos podem ser promissoras, entretanto mais estudos são necessários a fim de comprovar a efetividade desses métodos.

Palavras-chaves: Osteonecrose, Zoledronato, Tópico.

ABSTRACT

IZUMI, NS. Alternative therapies for the treatment of drug-induced osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in ovariectomized senile rats (CBT). 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

Drug-induced osteonecrosis of the jaw (MRONJ) is a pathological condition that still lacks consensus in the literature regarding its treatment. Secondary therapies can play an important role in tissue control and response, and topical pastes based on Metronidazole and Lidocaine and based on Chlorhexidine may be promising. The objective of this work is to evaluate the topical performance of a paste based on Metronidazole and Lidocaine and another based on Chlorhexidine in the treatment of drug-induced osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in senile ovariectomized rats. For this, 20 female animals (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) underwent operative procedures: bilateral ovariectomy, insertion of cotton thread around the 1st lower left molar, extraction and topical application of pastes in the socket on the day of extraction, 2 and 4 days later. Euthanasia occurred after 7 weeks, using an excessive dose of anesthetic. The mandibles were resected, reduced and prepared for analysis. The results of the histomorphometric analysis show superiority of the POI group in relation to the other groups and similarity with the CLX group. In the histometric analysis, evaluating the area of newly formed bone, the POI group obtained greater bone formation, being statistically different from the ZOL group ($p=0.062$), the CLX group ($p=0.020$) and the Sal group ($p=0.001$). In the analysis of the percentage of newly formed bone, the POI group presented the largest area of newly formed bone (100%) and the other groups 64% (CLX group), 45% (SAL group) and 8.9% (ZOL group). The percentage difference was occupied by connective tissue and a percentage of non-vital bone (PONV). In the microtomographic analysis, for quantitative assessment of bone tissue, there is no statistical difference between the groups ($p<0.05$). In the qualitative assessment, only in TbSp was a statistically significant difference observed between the SAL and POI groups ($p=0.01$). It is concluded that adjuvant therapies such as the use of topical agents may be promising, however more studies are needed to prove the effectiveness of these methods.

Keywords: Osteonecrosis, Zoledronate, Topic.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Sequência do procedimento de instalação da ligadura. Animal anestesiado e estabilizado pronto para a realização do procedimento (A). Instalação da ligadura de algodão no 1º molar esquerdo com utilização de instrumentos adaptados para os animais 7 (B). Ligadura em posição período anterior ao corte dos excessos do fio de algodão (C). Aspecto da periodontite induzida após 3 semanas da instalação da ligadura (D). 21
- Figura 2** - Aplicação de zolendronato via intraperitoneal. 22
- Figura 3** - Procedimento de extração do 1º molar esquerdo. Animal estabilizado e anestesiado pronto para a execução da exodontia (A). Aspecto da área de interesse antes da exodontia (B). Procedimento de extração dentária (C). Alvéolo após a extração do 1º molar 23
- Figura 4** - Animal estabilizado e anestesiado pronto para a aplicação da Pasta POI no alvéolo correspondente ao 1º molar esquerdo (A). Aspecto da área de interesse após Animal estabilizado e anestesiado pronto para a aplicação da Pasta POI no alvéolo correspondente ao 1º molar esquerdo (A). Aspecto da área de interesse após aplicação da Pasta POI (B). Aplicação da Pasta à base de Clorexidina (C). Alvéolo após a aplicação da Pasta à base de Clorexidina (D). 24
- Figura 5** - Tabela Distribuição dos animais de acordo com os grupos experimentais (SAL; ZOL; POI; CLX (n=20) e de caracterização óssea (MCT0; MCT1; MCT2) (n=15). 26
- Figura 6** - Exemplificação do Software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6. 6.0) onde os esaneamentos são reconstruídos determinando a área de interesse. 28
- Figura 7** - Exemplificação do software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) onde é possível observar as reconstruções nos planos transversal, longitudinal e sagital e realizar a definição do VOI (volume of interest). 28
- Figura 8** - Exemplificação do software CTAnalyser (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) (utilizado para definir a área radiográfica de interesse, analisar e medir as imagens de acordo com as escalas de cinza). 29
- Figura 9** - Lâmina histológica representativa em que a área pontilhada representa a região de interesse (porção apical do septo)..... 32
- Figura 10** - Imagens representativas dos grupos SAL, ZOL, POI E CLX. 33

Figura 11 - Lâminas do grupo SAL em aumento de 40x. (A) e (B) mostram presença de tecido conjuntivo (TC) fechando a área de exodontia e em (C) a presença de tecido ósseo neoformado (TON) demonstrando o processo de reparo do alvéolo após exodontia.	33
Figura 12 - Lâminas do grupo ZOL em aumento de 40x. Em (A) observa-se presença de tecido conjuntivo frouxo (TC) entremeado ao tecido ósseo não vital e presença de tecido ósseo neoformado (TONV) demonstrando a área de sequestro ósseo. Já em (B), presença de hifas de bactérias (HB) demonstrando contaminação da aérea e em (C), área de tecido ósseo não vital, demonstrado pela presença de lacunas ósseas vazias.	34
Figura 13 - Lâminas do grupo POI. Em (A), aumento de 10x, foi possível verificar que mesmo tendo pequenas áreas de osso não vital, o epitélio se encontrava fechado. Em (B), aumento de 40x, observa-se o processo alveolar preenchido por osso neoformado com tecido conjuntivo fibroso, em sua maioria. Em (C), aumento de 40x, verifica-se área de tecido ósseo não vital, demonstrado pela presença de lacunas ósseas vazias.	34
Figura 14 - Lâminas do grupo CLX. Em (A), aumento de 10x, nota-se um tecido epitelial que fecha o alvéolo e a presença de tecido ósseo neoformado na região de alvéolo. Em (B), aumento de 40x, observa-se a presença de tecido ósseo neoformado entremeado por tecido conjuntivo fibroso. Em (C), aumento de 40x, presença de fragmentos de osso não vital, onde observa-se lacunas de osteócitos vazias...	35
Figura 15 - gráfico representando área de osso de formado dos grupos SAL, ZOL, POI e CLX, as letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas.	36
Figura 16 - gráfico representando o percentual de osso neoformado dos grupos SAL, ZOL, POI e CLX.	36
Figura 17 - Gráficos demonstrando as comparações intragrupos para a análise de volume ósseo (BV) e de volume ósseo em relação ao tecido (BV/TV) dos grupos de caracterização óssea (MCT0, MCT1 e MCT2) ($p < 0,05$).	37
Figura 18 - Gráficos demonstrando as comparações intragrupos para a análise dos parâmetros Tb.Sp, Tb.N, Tb.Th e, Po(tot) dos grupos de caracterização óssea (MCT0, MCT1 e MCT2)($p < 0,05$).	38
Figura 19 - Gráficos demonstrando as comparações intragrupos para a análise dos parâmetros BV, BV/TV, Tb.N, Tb.Sp, Tb.Th e, Po(tot) dos grupos experimentais ZOL, SAL, POI e CLX ($p < 0,05$).	39

LISTA DE SIGLAS

%	porcento
µm	microlitro
µm	micrômetro
AON	área do osso neoformado
BFs	Bifosfonatos
BV	volume ósseo
BV/TV	porcentagem de volume ósseo
CG	coágulo
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
h	horas
hAMSC	célula tronco mesenquimal
HE	hematoxicilina e eosina
kg	quilograma
ml	mililitro
ml/kg	mililitro por quilograma
mm	milímetro
mm ³	milímetro cúbico
MRONJ	Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Medicamentos
°C	graus Celsius
PONF	Percentual de Osso Neoformado
PONV	Percentual de Osso Não Vital

Po.tot	porcentagem da porosidade óssea total
ROI	região de interesse
Tb.N	número de trabéculas ósseas
Tb.S	separação do trabeculado
Tb.th	espessura do trabeculado ósseo
UI	unidade internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Delineamento Experimental	19
3.2 Cirurgia Experimental.....	19
3.3 Grupos experimentais	24
3.4 Eutanásia.....	26
3.5 Calibração do examinador.....	27
3.6 Análise dos resultados	27
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Análise Histomorfométrica.....	32
4.2 Análise Histométrica.....	36
4.3 Percentual de Osso Neoformado (PONF)	36
4.4 Microtomografia Computadorizada (MicroCT)	37
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO	51

1 INTRODUÇÃO

Constituído por matriz óssea e células, o tecido ósseo é um importante componente do corpo humano pois é o elemento principal do esqueleto, o qual desempenha inúmeras funções como sustentação, apoio, proteção, movimento e armazenamento de íons essenciais para o organismo¹. Esse tecido, periodicamente, realiza um processo de troca celular conhecido como remodelação óssea, que ocorre a partir de estímulos como esforços físicos para os quais o osso não esteja preparado, sendo o osteócito a célula responsável por detectá-los e iniciar a indução de células mesenquimais a formarem osteoblastos.

Posteriormente, o fator RANK-L, molécula responsável pela ativação osteoclástica, será secretado e, subseqüentemente, parte do tecido ósseo será reabsorvida pela ação dos osteoclastos. Como resultado, brechas (Lacunas de Howship) serão formadas e preenchidas por uma matriz proteica, sobre a qual cristais de hidroxapatita serão futuramente depositados². A remodelação óssea pode ter seu mecanismo alterado a partir da deficiência de hormônios sistêmicos como o estrogênio, cuja modificação no tecido ósseo é de grande relevância. A deficiência deste hormônio causará aumento da excreção renal de cálcio e redução da sua absorção no intestino, bem como um aumento dos níveis de Paratormônio (PTH - hormônio que estimula a retirada de íons cálcio do armazenamento ósseo) e produzirá citocinas e mediadores inflamatórios, dentre elas, a Prostaglandina E-2, que está envolvida na patogênese da osteoporose². Além das alterações em âmbito sistêmico já citadas, a menopausa atua diretamente no metabolismo ósseo pois favorece o aumento de secreção de RANKL, resultando na aceleração da reabsorção óssea e acarretando a perda de massa óssea³.

A osteoporose é a patologia de maior incidência dentre as mais comuns que acometem os ossos, cuja prevalência aumenta com o avançar da idade, passando de 0,1% na faixa etária de 18 a 24 anos para 27,7% na de 80 anos ou mais. Ao analisarmos a incidência quanto ao sexo, observa-se que a população feminina é a mais acometida. Aos 80 anos, por exemplo, a prevalência de osteoporose é de 38% para as mulheres e 10% para os homens⁴. É evidenciado,

portanto, os fatores que culminam no aumento exponencial da incidência de osteoporose após a menopausa em mulheres.

Como método de tratamento da osteoporose, os bifosfonatos (BFs) incluem-se entre os fármacos mais utilizados. Estes fármacos possuem como mecanismo de ação a alteração do funcionamento do tecido ósseo em vários níveis, inibindo a reabsorção e diminuindo o turnover ósseo. Em nível celular, eles atuam sobre o recrutamento de osteoclastos e na sua viabilidade, inibindo, desta forma, a atividade osteoclástica^{5, 6}. Todavia, quando o uso de bifosfonatos é prolongado e seu acúmulo ósseo é capaz de diminuir o seu metabolismo tecidual, a reparação após um trauma não ocorre adequadamente, levando à exposição de área de osso necrótico ao meio bucal. Este é o seu principal efeito adverso, condição conhecida como Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Medicamentos (MRONJ), sendo a osteonecrose uma consequência da incapacidade tecidual em reparar-se e remodelar-se frente a quadros inflamatórios causados por estresses ou traumas mecânicos - exodontias, irritações por próteses ou infecções de origem dental ou periodontal^{7,8}. Clinicamente a MRONJ se apresenta por exposições ósseas na região dos ossos maxilares que persistem por mais de oito semanas, com história médica de uso de BFs e sem histórico de radioterapia nos maxilares^{7,9,10} e, segundo a AAOMS (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons), a patologia divide-se em 3 estágios: 1. Osso necrótico exposto sem sinais de sintomatologia dolorosa (assintomático); 2. Osso necrótico exposto com sinais de infecção e dor (sintomático); e 3. Osso exposto, com sinais de infecção, sintomatologia dolorosa e associada a presença de fístulas e ou fraturas patológicas¹¹.

Dor profunda no osso e mobilidade dental sem relação com doenças periodontais, traumas dentais ou outras lesões, estão descritos como os primeiros sinais e sintomas da MRONJ, sendo o tempo levado para o aparecimento da osteonecrose em pacientes em tratamento com o ácido zolendrônico de, em média, 18 meses¹². A extração dentária tem se mostrado um agente traumático indutor para a MRONJ e novos estudos indicam que a periodontite e/ou periapicopatias já instalada nesses dentes, seguido da sua extração, tendem a resultar em maior taxa de risco para a indução da doença¹³.

Visto que a patologia em questão causa sintomatologia dolorosa e, com isso, comprometimento das funções do sistema estomatognático¹⁴, vários tratamentos têm sido propostos, como terapias cirúrgicas, conservadoras e

cirúrgico-conservadoras. Atualmente, o tratamento indicado varia de acordo com o estágio da MRONJ, sendo as abordagens mais agressivas indicadas para os estágios mais avançados. Entretanto, nenhuma delas mostrou total eficácia^{15,16}. Portanto, torna-se evidente a necessidade de pesquisas de terapias alternativas que visem reduzir o processo infeccioso, impedir o aparecimento de novas áreas de necrose e promover uma maior qualidade de vida dos pacientes acometidos pela MRONJ. Dito isto, este trabalho objetivou avaliar a utilização de duas pastas para uso tópico: a pasta à base de Metronidazol a 10% e Lidocaína a 2% (pasta POI) e a pasta à base de Clorexidina a 2%.

A pasta à base de Metronidazol a 10% e Lidocaína a 2% (pasta POI) revelase uma alternativa promissora já que é eficaz na redução da sintomatologia álgica e na promoção de neoformação de tecido ósseo^{17,18}, e a pasta a base de Clorexidina a 2% presume-se favorável por possuir, em baixas concentrações, efeito bacteriostático e, em altas concentrações, efeito bactericida¹⁹. Além disso, por possuir características como seu amplo espectro antimicrobiano e ação por interação eletrostática em relação a parede celular das bactérias, gerando um aumento da permeabilidade de sua parede e resultando na morte do microrganismo²⁰. Sobretudo, as pastas são favorecidas pela sua via de aplicação tópica pois comporta doses mais altas, permitindo atingir concentrações terapêuticas locais maiores e descartando efeitos sistêmicos adversos¹⁸.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 13% a 18% das mulheres acima de 50 anos sofrem de osteoporose devido à redução de estrogênio²¹, sendo iniciado o tratamento com os bifosfonatos²². Tendo em vista o que foi mencionado e acrescentando que, em 2022, o censo populacional do IBGE constatou o aumento da população de 65 anos (ou mais) juntamente com a diminuição da população de até 14 anos, que passou de 24,1% para 19,8%, tornase evidente o envelhecimento da população brasileira²³, exigindo um maior conhecimento dos profissionais de saúde acerca das patologias relacionadas a essa população, bem como formas alternativas de tratamentos das mesmas²⁴.

Diante do que foi exposto, o estudo da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos ainda carece de novas terapias e suas comprovações por meios científicos, procurando estabelecer um possível protocolo terapêutico para futuros testes clínicos em humanos.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito das pastas POI - pasta à base de Metronidazol a 10% e Lidocaína a 2% - e Clorexidina a 2% no tratamento de osteonecrose dos maxilares em ratas ovariectomizadas tratadas com zoledronato, em função do reparo ósseo alveolar pós-exodontia do primeiro molar inferior.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Previamente à aquisição e acomodação dos animais, bem como antes da execução de qualquer intervenção, o presente projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Protocolo nº 0268/2022). Os 35 animais (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) fêmeas, com aproximadamente 12 meses e peso corporal variando de 300 a 350 gramas, foram recebidos e ambientados no biotério da disciplina de Cirurgia e Diagnóstico FOA/UNESP. Foram mantidos sob as seguintes condições durante todo o período experimental: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de $22 \pm 25^\circ\text{C}$, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, acondicionamento em gaiolas plásticas (5 animais por gaiola), onde tiveram ração ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água ad libitum. Os animais se apresentaram saudáveis e em condições de sofrerem os procedimentos operatórios.

3.2 Cirurgia Experimental

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,7ml/Kg e 0,3ml/Kg, respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

3.2.1 Ovariectomia bilateral

Para a ovariectomia bilateral, as ratas foram sedadas por via intramuscular com administração de Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,7ml/Kg e 0,3ml/Kg, respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Depois da sedação dos animais, foi realizada a tricotomia manual na região de ambos os flancos e antissepsia da área com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis. As ratas então foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral, onde foi realizada uma incisão de 1,5 cm em ambos os flancos com 5 lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha), seguida por 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 sutura reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil). Por fim os tecidos moles dos animais foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos, empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo. Sob os tecidos incisados e acima da sutura mais superficial, foi aplicado solução de PVPI. No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina Gbenzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante o período pósoperatório com ração e água ad libitum.

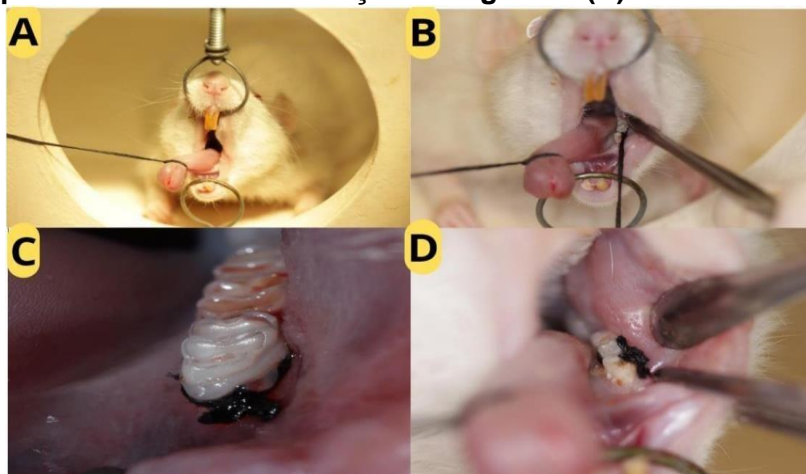
3.2.2 Ciclo Estral

Após 7 dias da cirurgia de ovariectomia bilateral, foi iniciado a checagem do ciclo estral dos animais. Com isso, durante 8 dias, sua regularidade foi avaliada. As ratas foram submetidas ao esfregaço vaginal de acordo com a técnica descrita em estudos prévios^{28,29}, onde foram analisadas em microscópio óptico as células epiteliais obtidas através do esfregaço e dispostas em lâminas histológicas. Os animais que não foram regulares entre as fases estrais - proestro, estro, metaestro e diestro - foram desconsiderados do estudo.

3.2.3 Inserção do fio de algodão

Cronologicamente, a intervenção iniciou com a instalação da ligadura de fio de algodão (Algodão trançado #24, Corrente Coats®, SP, Brasil) ao redor do 1º molar inferior esquerdo dos animais, com o objetivo facilitar a extração desse elemento dental pois resulta em doença periodontal e, além desta ser fator predisponente para a indução da osteonecrose, sua progressão tem como consequência a diminuição do osso intra e inter radicular do dente em questão, o que facilita a extração do dente, evita fratura apical das raízes radiculares e técnicas invasivas para a remoção dessas mesmas.

Figura 1 - Sequência do procedimento de instalação da ligadura. Animal anestesiado e estabilizado pronto para a realização do procedimento (A). Instalação da ligadura de algodão no 1º molar esquerdo com utilização de instrumentos adaptados para os animais 7 (B). Ligadura em posição período anterior ao corte dos excessos do fio de algodão (C). Aspecto da periodontite induzida após 3 semanas da instalação da ligadura (D).



Fonte: Autor, 2024.

3.2.4 Indução da Osteonecrose

As ratas foram expostas ao medicamento correspondem aos grupo ZOL (aplicação apenas de zoledronato), ZOL+POI (aplicação de zoledronato e posterior aplicação de pasta a base de Metronidazol e Lidocaína) e ZOL+CLX (aplicação de zoledronato e posterior aplicação de pasta a base de Clorexidina), receberam o fármaco na dose de 100µg/kg diluídos em 0,45 ml de solução salina, por via intraperitoneal, em SERINGA BD SLIP INSULINA de 1ml, descartável, com agulha de calibre 13mm x 0,38mm, a cada 03 dias por 7 semanas, até a eutanásia. Os animais que não foram expostos ao medicamento, correspondem ao grupo SAL (aplicação apenas de solução salina) e receberam 0,45 ml de solução salina, também intraperitoneal, durante o mesmo período e com o mesmo modelo de seringa e agulha, para mimetizar o estresse do manejo dos animais.

Figura 2 - Aplicação de zoledronato via intraperitoneal.



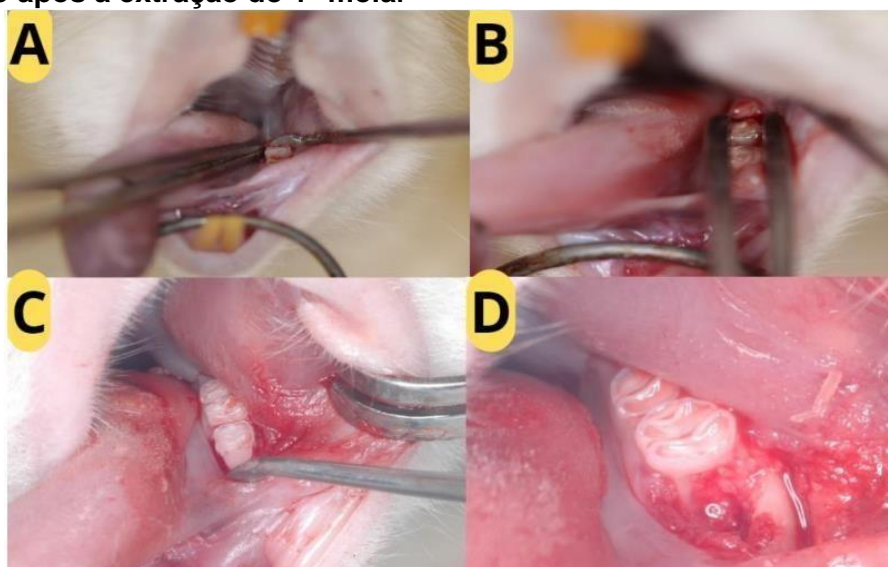
Fonte: Autor, 2024.

3.2.5 Extração do 1º molar inferior esquerdo

Sob sedação (Quetamina associada a Xilazina, como descrito anteriormente), após 3 semanas do início da medicação, as ratas foram posicionadas na mesa de operação; foi removida a ligadura de algodão e,

após a antisepsia 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 8 esquerdo, utilizando materiais cirúrgicos odontológicos adaptados aos animais. Todas as ratas, de todos os grupos experimentais, foram submetidas a esse procedimento^{30,31}. No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

Figura 3 - Procedimento de extração do 1º molar esquerdo. Animal estabilizado e anestesiado pronto para a execução da exodontia (A). Aspecto da área de interesse antes da exodontia (B). Procedimento de extração dentária (C). Alvéolo após a extração do 1º molar

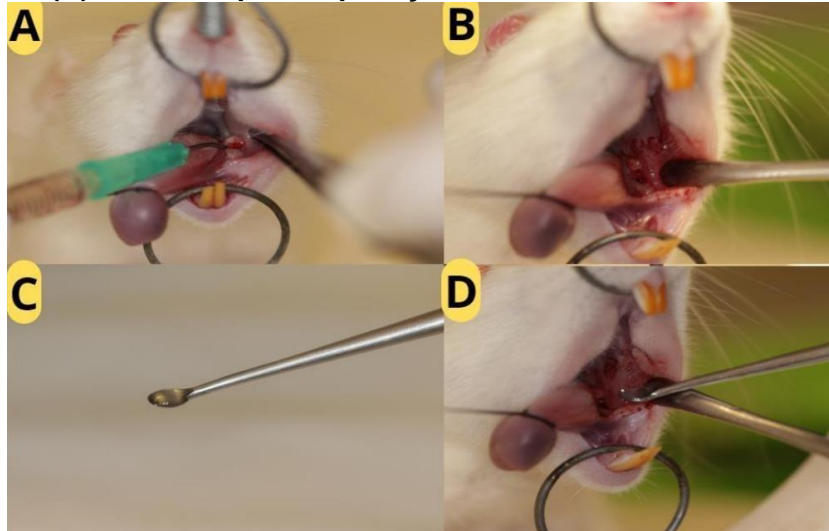


Fonte: Autor, 2024.

3.2.6 Aplicação tópica da pasta POI e da pasta Clorexidina

Após a exodontia, os animais pertencentes aos grupos ZOL+POI e ZOL+CLX foram submetidos a aplicação tópica das pastas à base de Metronidazol 10% e Lidocaína 2% (Pasta Poi) e à base de Clorexidina com auxílio de uma seringa de 5 ml e agulha de 27g, nos momentos: após a extração, no segundo e no quarto dia pós operatório, sendo os animais mantidos na terapia com zoledronato até o momento da eutanásia.

Figura 4 - Animal estabilizado e anestesiado pronto para a aplicação da Pasta POI no alvéolo correspondente ao 1° molar esquerdo (A). Aspecto da área de interesse após Animal estabilizado e anestesiado pronto para a aplicação da Pasta POI no alvéolo correspondente ao 1° molar esquerdo (A). Aspecto da área de interesse após aplicação da Pasta POI (B). Aplicação da Pasta à base de Clorexidina (C). Alvéolo após a aplicação da Pasta à base de Clorexidina (D).



Fonte: Autor, 2024.

3.3 Grupos experimentais

Para o desenvolvimento desse projeto, foram utilizados 35 animais (n=5) (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), fêmeas, com aproximadamente 12 meses, com peso corporal variando entre 300 a 350 gramas, de uma linhagem mantida no Biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA – UNESP, que foram fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição. O número de animais por grupo experimental foi baseado nos trabalhos de Delfrate et al. (2021) que apresentam a metodologia no qual esse projeto se baseou. Além disso, também pudemos nos basear nas pesquisas anteriores do nosso grupo de pesquisa que utilizam este número de animais, ficando assim o valor de n= 5 por grupo experimental.

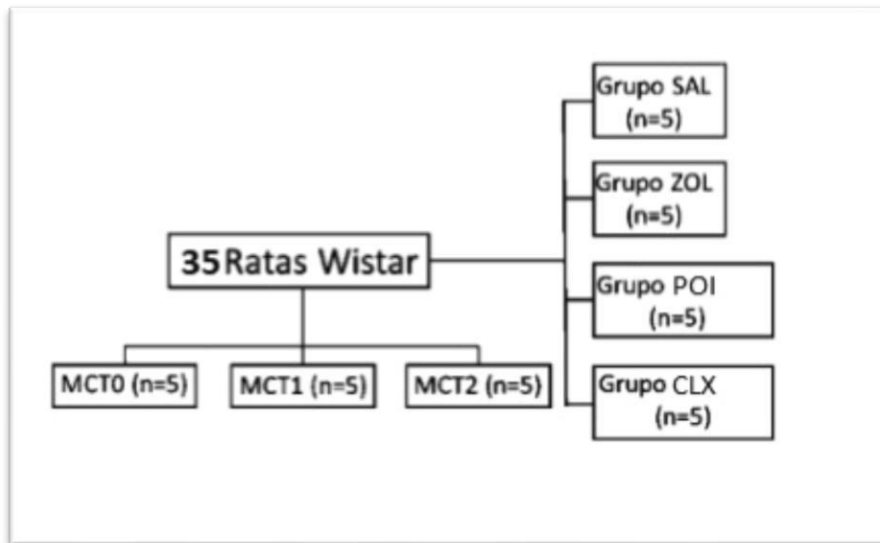
Para a análise da microtomografia computadorizada (**MicroCT**), 5 ratas foram escolhidas aleatoriamente para serem eutanasiadas após ambientalização no biotério (dia 0) para caracterização do osso mandibular

na região posterior (1º molar inferior esquerdo) (**MCT0**). Da mesma forma, 5 ratas foram induzidas a osteonecrose com aplicação de Zoledronato por 3 semanas (**MCT1**) e 5 demais ratas receberam durante esse mesmo tempo, aplicação de solução salina, sendo essas ratas submetidas a eutanásia no final da 3ª semana (**MCT2**) para a avaliação da arquitetura óssea após o início da terapia medicamentosa, totalizando 15 ratas. Um total de 20 animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais, sendo:

- **grupo SAL**, com 5 ratas que 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 negativo).
- **grupo ZOL** com 5 ratas que receberam aplicação do zoledronato 100ug/kg a cada 3 dias por 7 semanas (controle positivo).
- **grupo POI** no qual 5 ratas receberam ZOL no mesmo protocolo do grupo controle positivo e pós a exodontia do 1º molar inferior, ao final da terceira semana, recebeu a aplicação tópica da Pasta POI (0,1 ml) no alvéolo no dia da exodontia, 2 e 4 dias após.
- **grupo CLX** que recebeu o mesmo protocolo do grupo controle positivo e após a extração do 1º molar inferior no final da terceira semana recebeu a aplicação tópica da pasta à base de Clorexidina (0,1 ml) no alvéolo no dia da exodontia, 2 e 4 dias após.

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas contendo cada 5 animais com ração e água *ad libitum*.

Figura 5- Tabela Distribuição dos animais de acordo com os grupos experimentais (SAL; ZOL; POI; CLX (n=20) e de caracterização óssea (MCT0; MCT1; MCT2) (n=15).



Fonte: Autor, 2024.

3.4 Eutanásia

A eutanásia iniciou-se com o grupo MCT0 no dia 0, após a ambientação dos animais. Posteriormente, os grupos MCT1 e MCT2, ao final de 3 semanas, foram eutanasiados para a avaliação da arquitetura óssea através da MicroCT. Os demais animais (grupos ZOL, SAL, ZOL+POI e ZOL+CLX) foram submetidos à eutanásia ao final do tempo experimental de 7 semanas por meio de dose excessiva do anestésico. Em seguida, as hemimandíbulas foram cuidadosamente dissecadas e pós-fixadas por 24 horas em paraformaldeído 4%. Depois, foram removidas do fixador e lavadas por 12 horas em água corrente a fim de remover qualquer resíduo do mesmo. Sequencialmente, foram armazenadas em álcool 70% para transporte até o local de análise da MicroCT e, após finalização, as peças retornaram para o fixador a fim de completarem 72 horas de fixação. Passado este período, foram submetidas novamente a um banho de água corrente por 12 horas e partiram para a descalcificação em ácido etilendiamino tetra-acético 10% (EDTA), onde permaneceram durante 6 a 8 semanas.

3.5 Calibração do examinador

Ocorreu anteriormente as mensurações propostas para a MicroCT. 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.

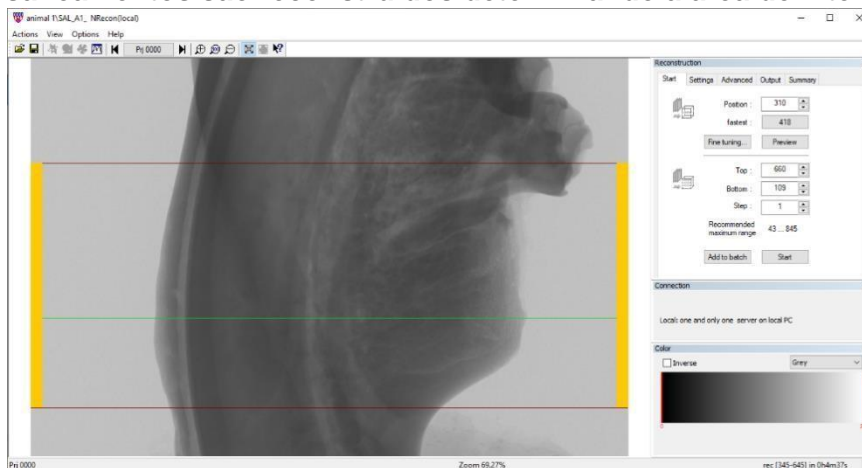
3.6 Análise dos resultados

3.6.1 Análise e processamento de tecidos calcificados

3.6.1.1. Microtomografia computadorizada (MicroCT)

Para a análise tridimensional da estrutura do tecido ósseo, os animais pertencentes aos grupos MCT0, MCT1, MCT2 e, posteriormente SAL, ZOL, ZOL+POI e ZOL+CLX tiveram as mandíbulas removidas do fixador e lavadas por 12 horas em água corrente a fim de remover qualquer resíduo do fixador. Sequencialmente, foram armazenadas em álcool 70% para transporte até o local de análise. Primariamente, foram submetidas a análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 8 μm de espessura (90Kv e 111 μA), com filtro de cobre e passo de rotação de 0,05 mm. As áreas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstruídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6. 6.0).

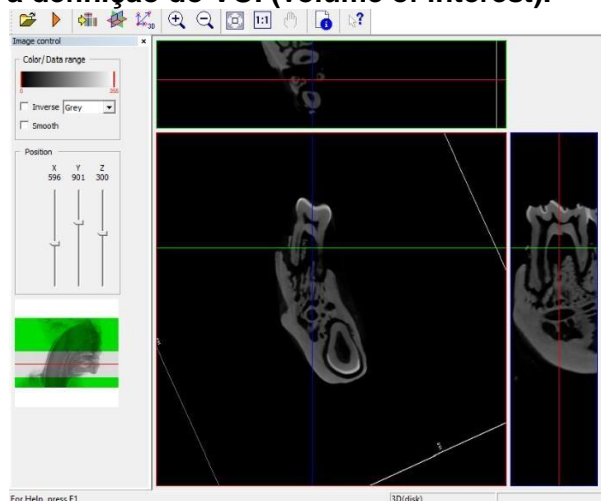
Figura 6 - Exemplificação do Software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6. 6.0) onde os esaneamentos são reconstruídos determinando a área de interesse.



Fonte: Autor, 2024.

No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital).

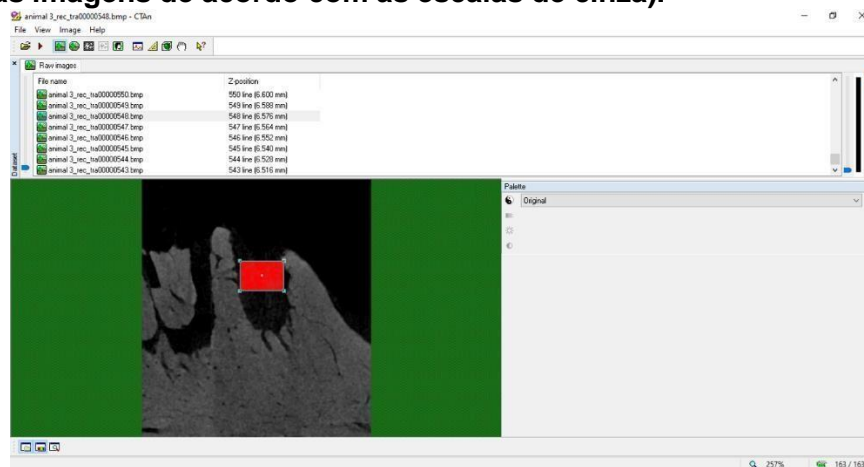
Figura 7 - Exemplificação do software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) onde é possível observar as reconstruções nos planos transversal, longitudinal e sagital e realizar a definição do VOI (volume of interest).



Fonte: Autor, 2024.

Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (200311SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida a área radiográfica de interesse (ROI) que inclui a área do alvéolo pós reparacional e tecidos adjacentes. O software CTAn analisou e mediu a imagem de acordo com as escalas de cinza. Após o ajuste e remoção dos tons de cinza da área correspondente do alvéolo, o threshold utilizado na análise foi de 97-62 tons de cinza, o que possibilitou a obtenção do volume de osso presente/formado no interior dos alvéolos. Os parâmetros analisados foram referentes à quantidade do tecido ósseo (BV = volume ósseo, BV/TV= volume ósseo em relação ao volume do tecido) e qualidade do tecido ósseo (Tb.Th= espessura do trabeculado ósseo, Tb.Sp= separação das trabéculas ósseas, Tb.N= número das trabéculas e Po.(tot) = porcentagem de porosidade total).

Figura 8 - Exemplificação do software CTAnalyser (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) (utilizado para definir a área radiográfica de interesse, analisar e medir as imagens de acordo com as escalas de cinza).



Fonte: Autor, 2024.

3.6.2 Análise dos tecidos descalcificados

Logo após a MicroCT, as peças retornaram para o fixador a fim de completarem 72 horas de fixação, após isso, foram submetidas novamente ao banho de água corrente por 12 horas e partiram para a descalcificação em ácido etilendiamino 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 em 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).

3.6.3 Análise microscópica e área microscópica de interesse (AMI)

Para a análise histológica/histométrica, foram avaliados três cortes histológicos localizados na porção vestibular, média e lingual do local da extração dentária. A área de interesse foi dividida em duas: AMI (I) e a AMI (II) que foram determinadas de acordo com a análise microscópica realizada. A AMI (I) consiste em uma área de 4 mm x 4 mm que inclui a porção do local da extração dentária anteriormente ocupada pelas raízes distal do primeiro molar inferior esquerdo e mesial e os tecidos adjacentes. Seu limite distal é composto de uma linha situada paralela à dentina coronária e à superfície radicular do segundo molar inferior esquerdo, estendendo-se 4mm mesialmente. Seu limite coronário é composto de uma linha paralela ao limite da margem cementogengival do segundo molar inferior esquerdo, estendendo-se 4mm apicalmente. O AMI (II) consistiu em duas áreas de 250 × 250 µm, situadas no tecido conjuntivo que recobre o local da extração dentária. O limite das áreas 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 42 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 determina o centro das duas áreas analisada.

3.6.4 Análise Histológica e Histométrica

A análise histológica com as características gerais dos tecidos e histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PONF) 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 (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). A área ocupada pela PONF foi estabelecida e expressa em μm^2 como média \pm desvio padrão em cada grupo experimental. Na região de Interesse AMI (I), as imagens foram capturadas utilizando uma câmera digital (AxioCam® Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada a um microscópio de luz (AxioLab®) e conectada a um microcomputador. A quantificação da porcentagem de tecido ósseo neoformado e a porcentagem de tecido ósseo não vital foram calculados utilizando o software de análise de imagens (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss). A PONV representa uma região onde mais de dez lacunas de osteócitos vizinhos apresentaram-se vazias ou contendo restos de osteócitos necróticos.

3.6.5 Análise dos dados

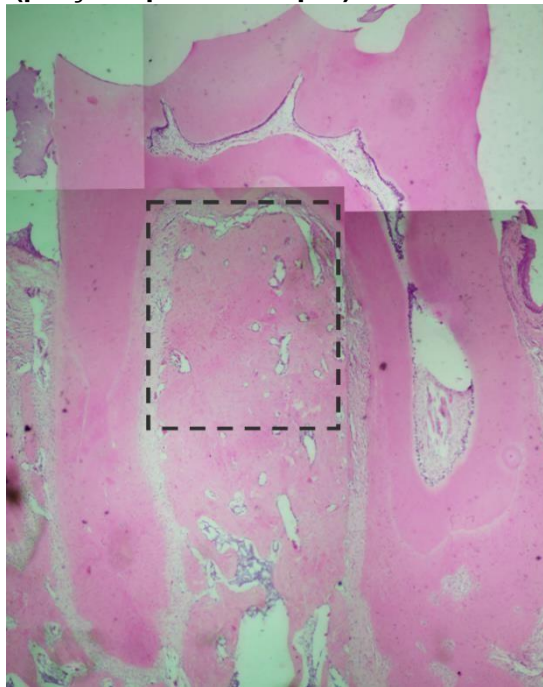
Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos e qualitativos que foram obtidos pela microtomografia (BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N, Po(tot)), foi abordada a diferença entre os grupos experimentais (SAL; ZOL; ZOL+POI; ZOL+CLX (MCT0; MCT1 e MCT2)). Todos os dados foram submetidos à curva de normalidade – teste de Shapiro-Wilk com nível de significância de 0,05 para todos os testes e constatados distribuição normal das amostras. Portanto, diante da homogeneidade dos dados, o teste ANOVA 1 Fator foi aplicado e o pós teste Holm-Sidak para a comparação das médias obtidas. O programa estatístico utilizado foi o SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Análise Histomorfométrica

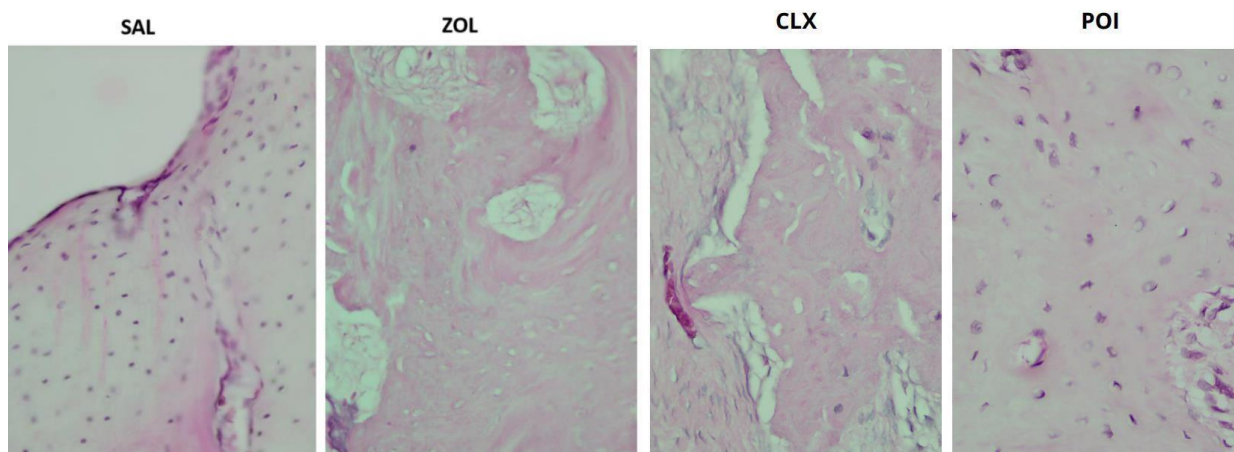
Após a obtenção das lâminas, estas foram avaliadas histologicamente quanto a capacidade de neoformação óssea, presença de infiltrado inflamatório, formação de tecido conjuntivo, absorção e/ou manutenção dos materiais estudados. As amostras foram codificadas de maneira que somente a orientadora sabia a quais grupos pertenciam. Um único examinador realizou as análises. Para análise histológica, foi delimitado a região de interesse na parte mais apical do septo, devido a essa região ser a crítica em relação a proximidade com a superfície externa e com o tecido gengival.

Figura 9 - Lâmina histológica representativa em que a área pontilhada representa a região de interesse (porção apical do septo).



Fonte: Autor, 2024.

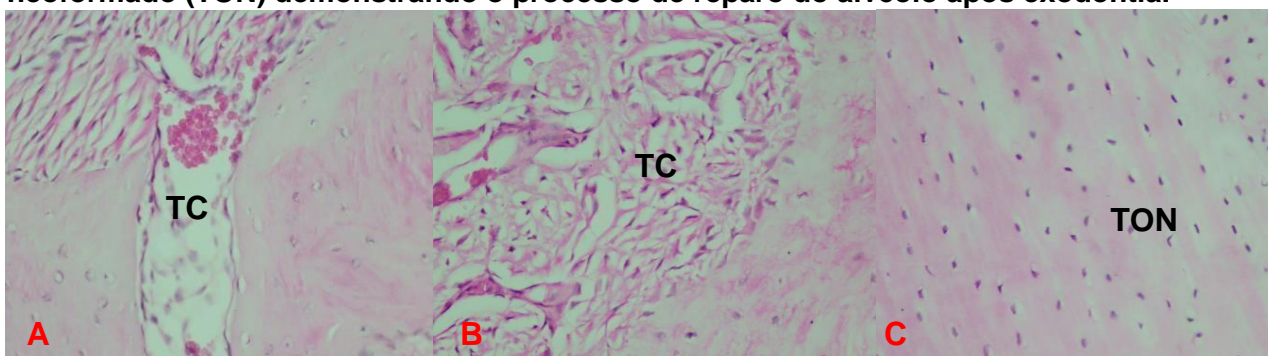
Figura 10 - Imagens representativas dos grupos SAL, ZOL, POI E CLX.



Fonte: Autor, 2024.

GRUPO SAL

Figura 11 - Lâminas do grupo SAL em aumento de 40x. (A) e (B) mostram presença de tecido conjuntivo (TC) fechando a área de exodontia e em (C) a presença de tecido ósseo neoformado (TON) demonstrando o processo de reparo do alvéolo após exodontia.

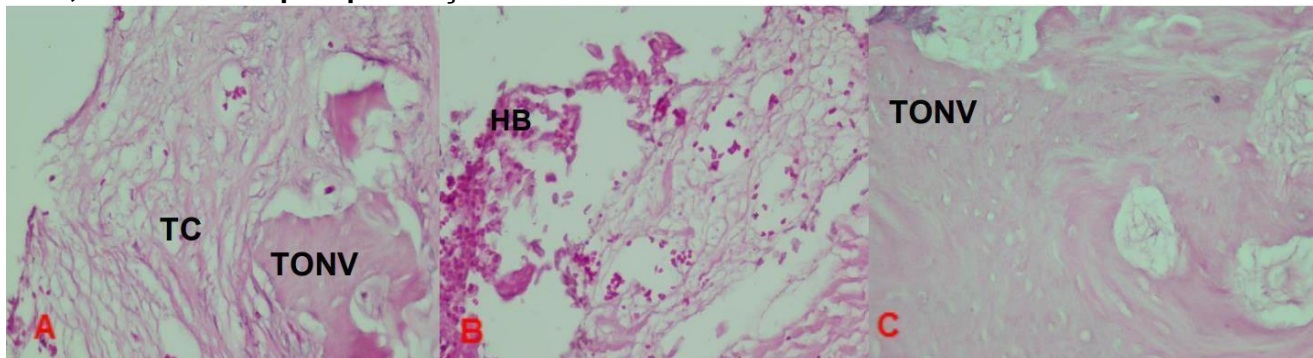


Fonte: Autor, 2024.

Grupo SAL: Foi observado a invaginação do tecido conjuntivo organizado na crista do septo interradicular, presença do tecido ósseo remanescente com osteócitos vivos, compatível com o processo de reparado esperado para o grupo.

GRUPO ZOL

Figura 12 - Lâminas do grupo ZOL em aumento de 40x. Em (A) observa-se presença de tecido conjuntivo frouxo (TC) entremeadado ao tecido ósseo não vital e presença de tecido ósseo neoformado (TONV) demonstrando a área de sequestro ósseo. Já em (B), presença de hifas de bactérias (HB) demonstrando contaminação da aérea e em (C), área de tecido ósseo não vital, demonstrado pela presença de lacunas ósseas vazias.

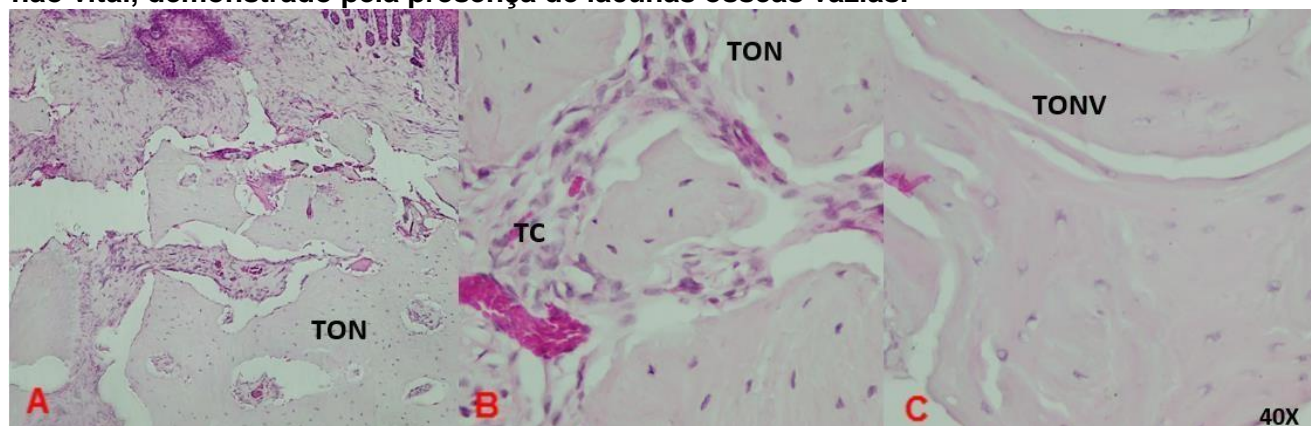


Fonte: Autor, 2024.

Grupo ZOL: É possível observar uma invaginação maior do tecido conjuntivo, caracterizando um infiltrado inflamatório devido a necrose do tecido ósseo e a uma diminuição expressiva ou até ausência do processo de reparo. Apesar da presença de osteócitos viáveis, é possível observar necrose tecidual em alguns pontos

GRUPO POI

Figura 13 - Lâminas do grupo POI. Em (A), aumento de 10x, foi possível verificar que mesmo tendo pequenas áreas de osso não vital, o epitélio se encontrava fechado. Em (B), aumento de 40x, observa-se o processo alveolar preenchido por osso neoformado com tecido conjuntivo fibroso, em sua maioria. Em (C), aumento de 40x, verifica-se área de tecido ósseo não vital, demonstrado pela presença de lacunas ósseas vazias.

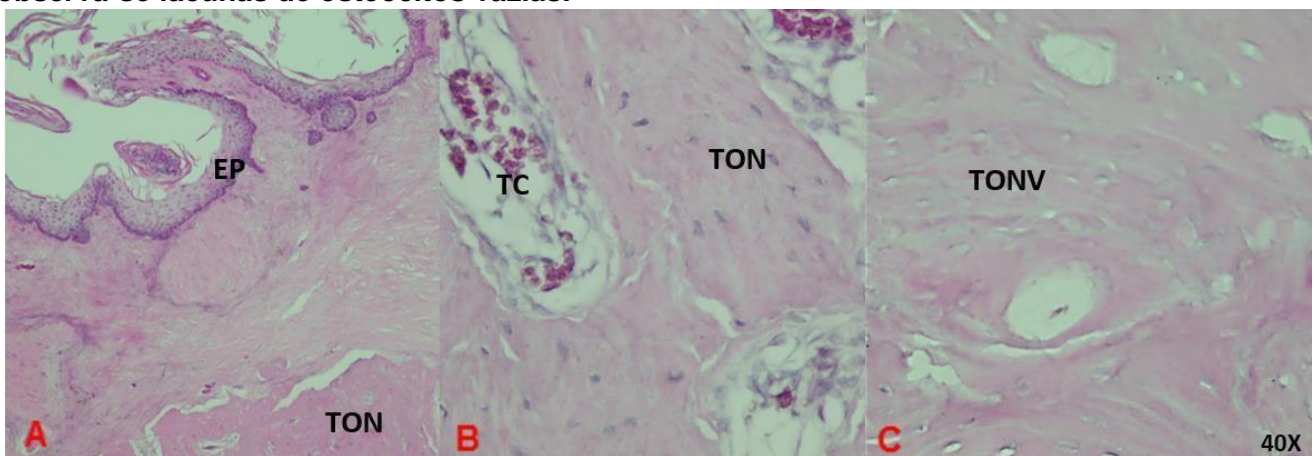


Fonte: Autor, 2024.

Grupo POI: Observou-se tecido conjuntivo frouxo bem organizado e vascularizado na região de interesse, cobrindo o septo interradicular. O tecido ósseo apresentou-se maduro e altamente vascularizado com a presença de vasos sanguíneos bem distribuídos e osteócitos viáveis.

GRUPO CLOREXIDINA

Figura 14 - Lâminas do grupo CLX. Em (A), aumento de 10x, nota-se um tecido epitelial que fecha o alvéolo e a presença de tecido ósseo neoformado na região de alvéolo. Em (B), aumento de 40x, observa-se a presença de tecido ósseo neoformado entremeado por tecido conjuntivo fibroso. Em (C), aumento de 40x, presença de fragmentos de osso não vital, onde observa-se lacunas de osteócitos vazias.

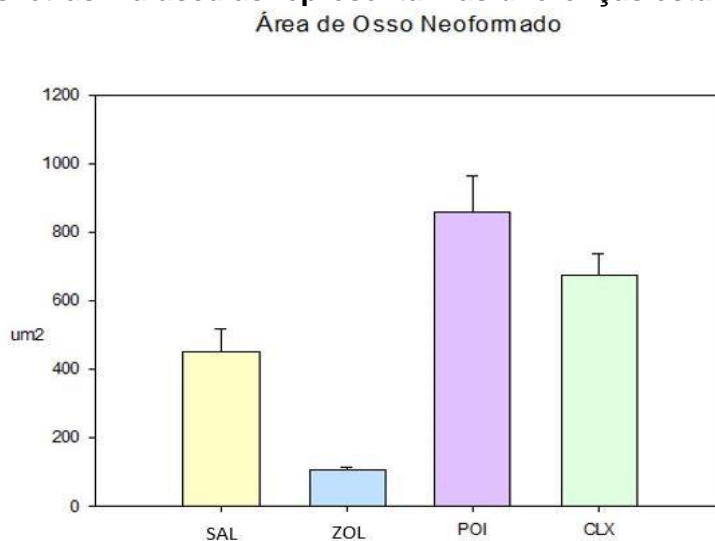


Fonte: Autor, 2024.

Grupo CLX: Foi observado tecido o fechamento do alvéolo com tecido conjuntivo espesso revestido do tecido epitelial. Tecido ósseo maduro, vascularizado e celularizado caracterizando ausência de processo inflamatório.

4.2 Análise Histométrica

Figura 15 - gráfico representando área de osso de formado dos grupos SAL, ZOL, POI e CLX, as letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas.

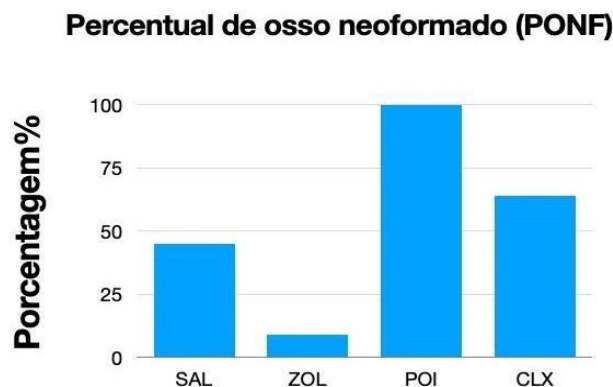


Fonte: Autor, 2024.

Na análise histométrica, avaliando área de osso neoformado o grupo POI apresentou-se com maior neoformação óssea, sendo diferente estatisticamente do grupo ZOL ($p=0,062$), do grupo CLX ($p=0,020$) e do grupo Sal ($p=0,001$). O grupo CLX, acompanhando o grupo POI, também apresentou diferença estatística para o grupo ZOL ($p=0,048$) e grupo Sal ($p=0,001$). O Grupo SAL também apresentou diferença estatística para o grupo ZOL ($p=0,042$).

4.3 Percentual de Osso Neoformado (PONF)

Figura 16 - gráfico representando o percentual de osso neoformado dos grupos SAL, ZOL, POI e CLX.



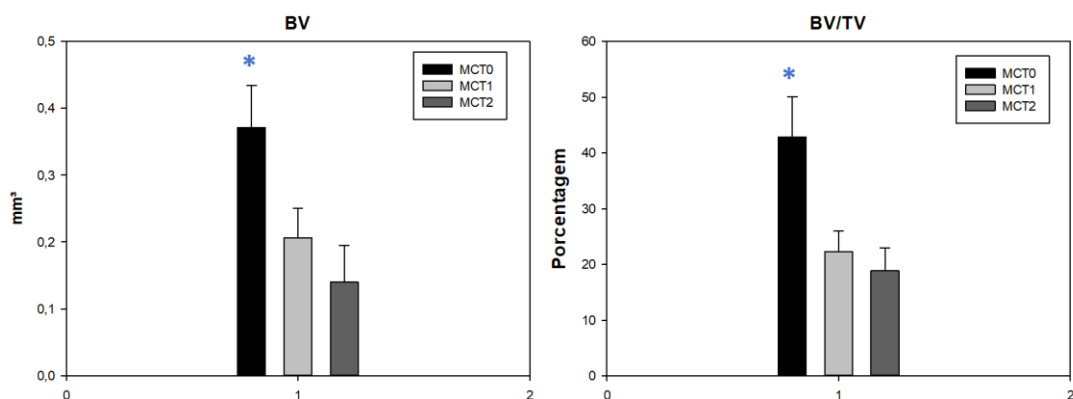
Fonte: Autor, 2024.

Em uma comparação direta entre os grupos, tem-se que o grupo POI apresentou a maior área de osso neoformado, sendo que essa área foi considerada como 100%. Portanto, o percentual de osso neoformado (PONF) dos outros grupos experimentais, em relação ao grupo POI, foram respectivamente, 64% para o grupo CLX, 45% para o grupo SAL e 8,9% para o grupo ZOL. A diferença de percentual foi ocupada por tecido conjuntivo e um percentual de osso não vital (PONV).

4.4 Microtomografia Computadorizada (MicroCT)

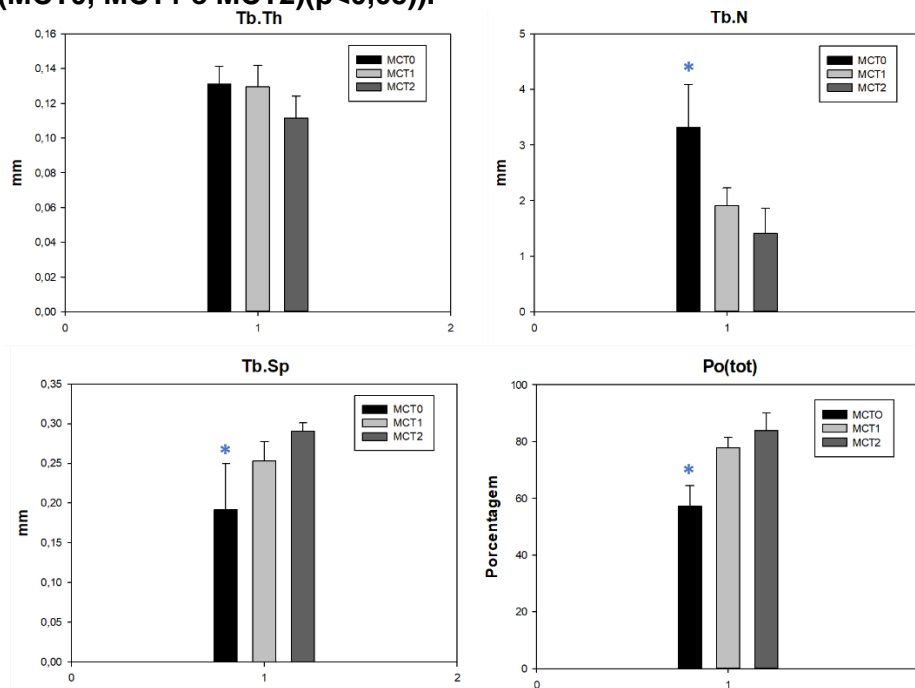
4.4.1 Análise do Grupo Caracterização Óssea

Figura 17 - Gráficos demonstrando as comparações intragrupos para a análise de volume ósseo (BV) e de volume ósseo em relação ao tecido (BV/TV) dos grupos de caracterização óssea (MCT0, MCT1 e MCT2) ($p < 0,05$).



Fonte: Autor, 2024.

Figura 18 - Gráficos demonstrando as comparações intragrupos para a análise dos parâmetros Tb.Sp, Tb.N, Tb.Th e Po(tot) dos grupos de caracterização óssea (MCT0, MCT1 e MCT2)($p < 0,05$).



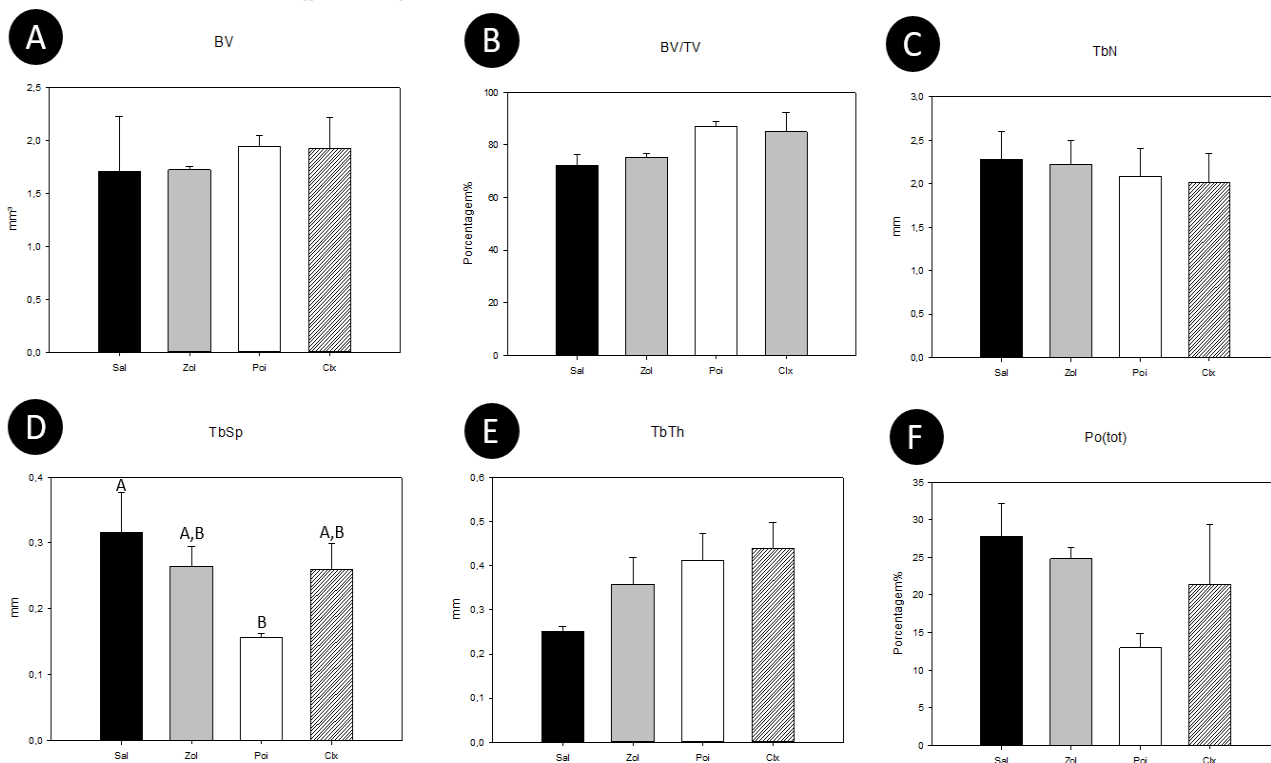
Fonte: Autor, 2024.

Para caracterização do modelo experimental, foi realizada a microtomografia computadorizada (MicroCT) das peças dos grupos MCT0, MCTC1 e MCT2, sendo que o grupo MCT0 foi eutanasiado 60 dias após a ovariectomia e não recebeu nenhum tipo de tratamento. Os grupos MCT1 (ZOL) e MCT2 (SAL) permaneceram por mais 3 semanas com fio de algodão, recebendo seus respectivos tratamentos, até serem eutanasiados no 21º dia. Os resultados encontrados em relação a quantidade de volume ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo para tecido mole (BV/TV), e em relação a qualidade do tecido que avalia espessura (Tb.Th), número (Tb.N) e separação de trabéculas (Tb.Sp) não apresentaram diferença estatística do grupo MCT0 para o grupo MCT1 e MCT2 ($p > 0,05$) apenas no parâmetro Tb.Th e, nos outros parâmetros, apesar do grupo MCT2 (SAL) mostrar um melhor desempenho, não foi observado diferença estatística para o grupo MCT1 (ZOL).

Na avaliação da porosidade total do tecido ósseo (Po(tot)), todos os grupos apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$), sendo o grupo MCT2 (SAL) o que demonstrou maior porosidade.

4.4.2 Análise dos Grupos Experimentais (SAL, ZOL, ZOL+POI e ZOL+CLX)

Figura 19 - Gráficos demonstrando as comparações intragrupos para a análise dos parâmetros BV, BV/TV, Tb.N, Tb.Sp, Tb.Th e, Po(tot) dos grupos experimentais ZOL, SAL, POI e CLX ($p < 0,05$).



Fonte: Autor, 2024.

As análises microtomográficas para avaliação da quantidade de volume ósseo (BV) e percentual de volume ósseo em relação ao volume tecidual (BV/TV), não demonstraram diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). E dentre as análises para avaliação da qualidade do tecido ósseo como número de trabéculas (TbN), separação das trabéculas (TbSp), espessura das trabéculas (TbTh) e porosidade total (PoTot), apenas no quesito da separação trabecular foi observado diferença estatística significativa entre os grupos SAL e POI ($p = 0,01$). No entanto, ao analisarmos os gráficos, é possível observar que os grupos POI e CLX apresentaram o maior volume de tecido ósseo (BV) neoformado em relação aos grupos SAL e ZOL. Os grupos testes POI e CLX também demonstraram melhores resultados em relação a espessura (TbTh) e porosidade trabecular (Po(tot)), caracterizando um tecido ósseo mais denso.

5 DISCUSSÃO

O aumento da expectativa de vida da população tem levado a um aumento na utilização de medicamentos para o tratamento e controle de doenças associadas ao envelhecimento³⁵. Algumas desordens metabólicas como a osteoporose e neoplasias malignas osteotrópicas são exemplares de alterações que acometem pacientes com idade avançada. Estas requerem um melhor controle durante a sua evolução e um tratamento eficiente através da administração de fármacos específicos, como os bifosfonatos, por exemplo³⁶. Dentre os bifosfonatos mais potentes, podemos citar o zoledronato, que atua ao nível do tecido ósseo, impedindo o processo de reabsorção óssea pela inibição da via do mevalonato nos osteoclastos, a qual é de extrema importância para que tais células concluam seu processo de diferenciação, desempenhem efetivamente a sua função reabsortiva e não entrem em apoptose prematuramente^{30,37}. Todavia, essa droga com finalidades terapêuticas, pode ocasionar efeitos adversos: a ocorrência da MRONJ, com etiopatogenia pouco compreendida e de difícil prevenção e tratamento³⁸.

Desta forma, a busca de melhores tratamentos para pacientes acometidos pela MRONJ tem sido pesquisada, uma vez que, ainda não existe um protocolo de tratamento definitivo para ser seguido. A literatura tem evidenciado que a associação de terapias coadjuvantes melhora a qualidade dos tecidos (dependendo do estágio clínico da doença), com intuito de melhorar a qualidade de vida e trazer mais conforto a esses pacientes^{32,33,34}.

No modelo experimental usado neste trabalho, fica claro que a forma de indução da osteonecrose é eficiente quando observamos os resultados hitomorfométricos obtidos. Resultados semelhantes foram obtidos por Ervolino et al, onde o mesmo demonstra que o zoledronato preveniu a reparação total do tecido conjuntivo, uma vez que permaneceu uma inflamação persistente, além de promover um efeito estimulador da apoptose em células do tecido conjuntivo e ter a síntese da matriz extracelular prejudicada. Outro ponto que se destaca é que a resposta óssea alveolar pós-extração foi gravemente comprometida, inibindo o processo de regeneração óssea, presumivelmente por ação negativa do zoledronato sobre os osteoblastos.

O uso da pasta de forma tópica colaborou na melhora do quadro de osteonecrose, evidenciado pelo fechamento de mucosa e processo de neoformação óssea. Na comparação intragrupos entre grupos testes, e o grupo que recebeu a terapia, a pasta POI (Metronidazol 10% e Lidocaína 2%), apresentou diferença estatísticas para o grupo ZOL e SAL, além de demonstrar maior área de osso neoformado entre todos os grupos, efeito esse que pode ter sido facilitado pelo crescimento de fibroblastos e osteoblastos após o uso da pasta. A pasta a base de Metronidazol a 10% e Lidocaína a 2% vem sendo utilizada desde 1998 de maneira eficiente no reparo de alvéolos infectados após exodontia. O Metronidazol, que compõe a pasta POI, pertence à classe dos nitroimidazólicos e atua em bactérias anaeróbias e Gram negativas através da inibição da síntese do ácido nucleico, causando a morte celular. Além disso, é capaz de facilitar o crescimento de fibroblastos e osteoblastos, sendo possível proporcionar efeitos anti-inflamatórios e antibacterianos. A alveolite ainda tem sua patogênese desconhecida, assim como a MRONJ, mas sabe-se que a presença de bactérias anaeróbicas é encontrada em ambas as patologias, assim o uso desse antibiótico ser interessante nos tratamentos de MORNJ. Nessa linha de pensamento, temos outra similaridade entre alveolite e a MRONJ: a presença de dor pulsátil intensa entre o primeiro e quarto dia após o procedimento cirúrgico nos casos de alveolite e o grande desconforto nos pacientes com MRONJ, sendo maior quando há exposição do tecido ósseo.

Nesta pasta temos associada ao antibiótico a Lidocaína, que possui propriedades anestésicas, cuja função é controlar a dor e traz conforto a esses pacientes. Essas características positivas da pasta POI foram evidenciadas no trabalho de Poi et al.(2013), onde avaliaram a ação desta pasta no processo de reparo alveolar em ratos com alveolite e concluíram que a mesma é eficiente e segura para os tratamentos da patologia citada assim como é capaz de reduzir a sintomatologia dolorosa e diminuir o processo infeccioso. O uso desta pasta nos processos da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos nesta pesquisa demonstrou ter um comportamento biológico favorável ao processo de reparo assim como o obtido por Poi et al, uma vez que além de favorecer a neoformação óssea também auxiliou no fechamento

epitelial das regiões onde havia osteonecrose e impediu a proliferação de hifas de bactérias.

O uso do gel de clorexidina está pautado na característica bactericidas do produto e por possuir um espectro de ação amplo^{19,20}. Por meio de levantamento bibliográfico a respeito das possibilidades terapêuticas acerca dos pacientes que são acometidos pela MRONJ, independente do estágio de evolução - embora não haja consenso -, em todas as situações vemos a citação do uso tópico de colutórios e em especial, da clorexidina, que permite um controle da contaminação local devido seu efeito bactericida^{44, 45, 46, 47}.

O uso do gel de clorexidina à 2% vêm também sendo explorados em situações com osteíte⁴⁸, demonstrando ser um bom produto no que tange ao controle bacteriano das áreas contaminadas. Desta forma, utilizá-lo na situação da MRONJ pareceu ser adequado, uma vez que muitos autores já utilizam esse medicamento, mesmo que empiricamente para auxiliar no tratamento dessas patologias^{49, 50}.

Neste trabalho foi possível observar que o uso da clorexidina em gel também auxiliou na melhora do quadro de osteonecrose, permitindo a neoformação óssea, redução de hifas de bactérias e fechamento do tecido mole. A área de neoformação óssea foi estatisticamente superior ao grupo controle e o grupo ZOL. Algumas publicações como a de Pardo-Zamora G et al. 2021, relatam o uso de clorexidina como parte do tratamento de pacientes com osteonecrose, demonstrando ser essa uma das opções no atendimento de pacientes com MRONJ, justamente por permitir reduzir a contaminação dessas áreas, assim como Magalhães IA et al. 2020, realizaram tratamento de fotobiomodulação associado ao uso de clorexidina, obtendo resultados satisfatórios no tratamento dos pacientes.

Embora ainda possamos observar áreas da matriz extra-celular com osteoblastos vazios sugerindo áreas osteonecrose nos dois grupos tratados, os resultados pareceram bem importantes, uma vez que a busca pelo tratamento da MRONJ ainda não está determinada. Outro ponto a ser destacado relaciona-se ao tecido mole e o seu comprometimento nas situações de osteonecrose, pois sabe-se que ele também é afetado. Nas análises

histomorfométricas onde terapias adjuvantes foram aplicadas, pode-se observar o fechamento das feridas com a proliferação de mucosa sobre o alvéolo. Transportando esse resultado para um paciente acometido pela MRONJ, conseguir o fechamento mesmo que ele ainda tenha a presença de um osso desvitalizado abaixo desta, a área óssea afetada não teria uma contaminação proveniente da cavidade oral e o paciente estaria com o processo controlado. Outro ponto seria em relação a prevenção da MRONJ, quando pacientes na categoria de risco a desenvolver essa patologia necessitam realizar procedimentos cirúrgicos, o uso desses protocolos no pósoperatório, deve ser considerado.

Desta forma acredita-se ser promissor a realização destes tratamentos em pacientes que sofrem de MRONJ, tanto pelo baixo custo do tratamento como pelos resultados obtidos neste trabalho, mesmo ciente de que novos trabalhos sejam necessários para validar os resultados obtidos neste estudo.

6 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o zoledronato prejudica significativamente o processo de reparo pós-extração, diminuindo a capacidade de reparo tanto dos tecidos moles quanto dos duros, o que estaria entre os fatores etiopatogênicos da MRONJ. Desta forma, terapias adjuvantes como a utilização de agentes tópicos podem ser promissoras, entretanto mais estudos são necessários a fim de comprovar a efetividade desses métodos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 13rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.
2. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão. Revista Brasileira de Reumatologia. 2011; 51(4):372-82.
3. Tera TM. The RANK/ RANKL/ OPG interaction in the repair of autogenous bone grafts in female rats with estrogen deficiency. Brazilian Oral Research. 2014.
4. Camargos MCS, Bomfim WC. Osteoporose e Expectativa de Vida Saudável: estimativas para o Brasil em 2008. Cadernos Saúde Coletiva. 2017.
5. Brozski MA. Osteonecrose maxilar associada ao uso de bisfosfonatos. Revista Brasileira de Reumatologia. 2012.
6. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. J Oral Maxillofac Surg. 2004.
7. Azevedo HN. Avaliação do uso de bisfosfonatos em idosos estabelecendo um protocolo de prevenção odontológico à osteonecrose [monografia]. Bragança Paulista: Universidade São Francisco; 2012.
8. Gegler, A. Bifosfonatos e osteonecrose maxilar: revisão da literatura e relato de dois casos. Revista Brasileira de Cancerologia. 2006.
9. Costa MDS. O uso de bifosfonatos e sua relação com a odontogeriatria. In: Anais do Congresso Nacional de Envelhecimento Humano, Campina Grande, 2016.
10. Martins MAT. Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bifosfonatos: importante complicação do tratamento oncológico, Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009.

11. AAOMS Position Paper. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007.
12. Durie BG, Katz M, Crowley J. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med.* 2005.
13. Otto S. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery.* 2012.
14. Barros CEC, De Oliveira HDC, Godói MFCDL, Artuzi FE. Osteonecrose mandibular induzida por bisfosfonatos: relato de caso em pacientes com mieloma múltiplo. *Revista Odontológica do Hospital de Aeronáutica de Canoas.* 2019.
15. Ruggiero SL. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-- 2014 update. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 2014.
16. Momesso GAC, de Souza Batista FR, de Sousa CA, de Lima VN, Polo TOB, Hassumi JS, Garcia Júnior IR, Faverani LP. Successful Use of Lower-Level Laser Therapy in the Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. *J Lasers Med Sci.* 2017.
17. Poi WR. The influence of the ointment compounded by 10% of metronidazole and 2% of lidocaine over delayed healing of wound extraction. A histological and histometric analysis in rats. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo).* 1998.
18. Silva, JL. Avaliação clínica da pasta de metronidazol a 10% e lidocaína a 2% no tratamento da alveolite. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2002.
19. Bashetty K, Hegde J. Comparison of 2% chlorhexidine and 5.25% sodium hypochlorite irrigating solutions on postoperative pain: a randomized clinical trial. *Indian J. Dent. Res.* 2010.

20. Ferraz RFCP, Rocha VC. Ação antimicrobiana da clorexidina em gel e líquida e do hipoclorito de sódio. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, 2013.
21. American Association Of Oral And Maxillofacial Surgeons (AAOMS). Position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2007.
22. Poubel VLN, Cruz DSM, Gil LF, Normeu Lima-Júnior N, Claus JDP, Gil JN. Osteonecrose maxilo-mandibular induzida por bisfosfonato: revisão bibliográfica. Rev. Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial (Pernambuco). 2012.
23. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Demográfico 2022 : população por idade e sexo : pessoas de 60 anos ou mais de idade : resultados do universo : Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. 2022.
24. Costa MDS. O uso de bifosfonatos e sua relação com a odontogeriatría. Anais - Congresso Nacional de Envelhecimento Humano, Campina Grande, Realize Editora, 2016.
25. Russell AD, Day MJ. Antibacterial activity of chlorhexidine. J Hospital Infection. 1993.
26. Simões MLLDSC. A dinâmica do tecido ósseo: desenvolvimento, estrutura e função. Tese de doutorado. Universidade de Coimbra, 2010.
27. McGowan K, McGowan T, Ivanovski S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. Oral Diseases. 2018.
28. Evans HM, Long J. Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1922.

29. Pantier, LK, Li, J., & Christian, CA (2019). Monitoramento do ciclo estral em camundongos com visualização e análise rápida de dados. *Bio-protocol*. 2019.
30. Toro LF, de Mello-Neto JM, Dos Santos FFV, Ferreira LC, Statkiewicz C, Cintra LTÂ, et al. Application of Autologous PlateletRich Plasma on Tooth Extraction Site Prevents Occurrence of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws in Rats. *Scientific reports*. 2019.
31. Delfrate G. Efeito da administração de pentoxifilina e atocoferol na osteonecrose de mandíbula induzida por bifosfonato: antes e depois da exodontia. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2021.
32. Viola VP. Uso de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (LPRF) como tratamento adjuvante da osteonecrose dos maxilares associada a medicamentos (Omam): série de casos. *Revista Sul Brasileira de Odontologia (RSBO)*. 2023.
33. Sacco R. The Use of Human Amniotic Membrane (hAM) as a Treatment Strategy of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ): A Systematic Review and MetaAnalysis of the Literature. *Medicina*. 2023.
34. Zheng Y. Low-level laser therapy prevents medicationrelated osteonecrosis of the jaw-like lesions via IL-1RA-mediated primary gingival wound healing. *BMC Oral Health*. 2023.
35. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*. 2008.
36. Clarke BM, Boyette J, Vural E, Suen JY, Anaissie EJ, Stack BC. Bisphosphonates and jaw osteonecrosis: The UAMS experience. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 2007.
37. Ebetino FH, Hogan AM, Sun S, Tsoumpra MK, Duan X, Triffitt JT, Kwaasi AA, Dunford JE, Barnett BL, Oppermann U, Lundy MW,

- Boyde A, Kashemirov BA, McKenna CE, Russell RG. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone*. 2011.
38. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011.
39. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, Dornelles RCM, AlmeidaJM , Nagata MJH, Okamoto R, Casatti CA, Garcia VG, Theodoro LH. 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. 2019.
40. Statkiewicz C. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2018.
41. Biguetti CC. Medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senescent female mice treated with zoledronic acid: Microtomographic, histological and immunohistochemical characterization. *PLoS One*. 2019.
42. Custódio IC. Effect of 5-lipoxygenase on alveolar bone repair post tooth extraction in elderly female mice treated with zoledronate. *Brazilian Journal of Oral Sciences*. 2020.
43. Poi, W. R., Sonoda, C. K., Martins, C. M., Melo, M. E., Pellizzer, E. P., de Mendonça, M. R., & Panzarini, S. R. Storage media for avulsed teeth: a literature review. *Brazilian Dental Journal*. (2013).
44. Montefusco V, Gay F, Spina F. Antibiotic prophylaxis before dental procedures may reduce the incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma treated with bisphosphonates. *Leuk Lymphoma*. 2008.

45. Kunchur R, Goss AN. The oral health status of patients on oral bisphosphonates for osteoporosis. *Australian Dental Journal*. 2008.
46. Lodi G, Sardella A, Salis A, Demarosi F, Tarozzi M, Carrassi A. Tooth extraction in patients taking intravenous bisphosphonates: a preventive protocol and case series. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010.
47. Ruggiero SL. Reply: AAOMS Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022 Update. Diagnostic Milestones, Doubts, and Perspectives on MRONJ. *J Oral Maxillofac Surg*. 2022.
48. Saghiri MA, Asatourian A, Sheibani N. Angiogenesis and the prevention of alveolar osteitis: a review study. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2018.
49. Pardo-Zamora G, Martínez Y, Moreno JA, Ortiz-Ruíz AJ. Treatment of Stage 2 Medication-Induced Osteonecrosis of the Jaw: A Case Series. *Int J Environ Res Public Health*. 2021.
50. Magalhães IA, Forte CPF, Viana TSA, Teófilo CR, Lima Verde RMB, Magalhães DP, Praxedes Neto RAL, Lima RA, Dantas TS. Photobiomodulation and antimicrobial photodynamic therapy as adjunct in the treatment and prevention of osteoradionecrosis of the jaws: A case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020.

ANEXO A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.



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 ovariectomizadas"**, 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 ovariectomized 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