



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

**MATHEUS HENRIQUE FACCIOLI RAGGHIANI**

**INFLUÊNCIA DA OZONIOTERAPIA E DA FIBRINA RICA EM  
PLAQUETAS E LEUCÓCITOS (L-PRF) NA PREVENÇÃO E  
TRATAMENTO DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES DE  
RATAS SENIS MEDICADAS COM ZOLEDRONATO**

Araçatuba- SP

2024

**MATHEUS HENRIQUE FACCIOLI RAGGHIANI**

**INFLUÊNCIA DA OZONIOTERAPIA E DA FIBRINA RICA EM  
PLAQUETAS E LEUCÓCITOS (L-PRF) NA PREVENÇÃO E  
TRATAMENTO DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES DE  
RATAS SENIS MEDICADAS COM ZOLEDRONATO**

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

Orientador: Prof. Associado Leonardo  
Perez Faverani

Araçatuba-SP

2024

Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso à minha avó, **Jarcira Gallis Faccioli**  
(*in memoriam*), cuja simplicidade e dedicação me ensinaram as mais valiosas  
e preciosas lições da vida.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que fez com que meus objetivos fossem alcançados e por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação ao longo desta trajetória.

À minha avó, **Jarcira Gallis Faccioli** (*in memoriam*), que mesmo sem ter tido a oportunidade de frequentar escolas formais é a pessoa mais sábia com que tive a oportunidade de conviver, incentivando os meus estudos e auxiliando no alcance de todos os meus objetivos pessoais. Dentre seus tantos ensinamentos, me ensinou na prática que o tempo é de fato inexorável e a vida extremamente efêmera, mas principalmente que o amor verdadeiro é capaz de estrapolar a barreira espaço-tempo dentre os diferentes planos, tornando-se imortal.

À minha mãe, **Sandra Helena Faccioli**, pela vida e por me conduzir durante toda esta jornada. A Sra. foi minha maior incentivadora durante estes anos e em todas as vezes que pensei em desistir, era de você que eu me lembrava e de como você se empenhou para que eu pudesse continuar trilhando os caminhos da educação. Comumente, ouvimos que mães solos desempenham papel de mãe e pai durante o crescimento dos seus filhos, eu particularmente penso que esse substantivo comum “mãe” é tão complexo e carregado de sentimentos próprios que vinculá-lo a qualquer outro papel social é completamente dispensável. A Sra. desempenha de forma admirável o nobre papel de ser mãe, me ensinou cedo a dar os meus primeiros passos e segue me ensinando a caminhar na jornada da vida, me abrigou no ventre por nove meses e o meu coração será sua eterna morada. Muito obrigado, eu te amo muito!

Ao meu tio, **Sérgio Íris Faccioli**, que me auxiliou e incentivou durante todo este processo e que se fez presente nos momentos em que mais precisei, assumindo, sem nenhuma obrigação, um complexo e profundo papel paternal. Sérgio, sua caminhada, seu caráter e generosidade são inspiradores, eu te admiro profundamente e serei eternamente grato por todo suporte, mas em especial por todo carinho a mim confiado.

À **Renata de Moura Oliveira**, que assumiu diferentes papéis em minha vida e foi brilhante em todos estes. Obrigado por tanto, por principalmente cuidar da minha mãe e ser sua companheira em absolutamente tudo. Eu te amo e te admiro profundamente.

Ao meu irmão, **Cléber Rafael Faccioli Ragghianti**, que sempre me admira e torce pelo meu sucesso. Senti muita falta da nossa convivência diária e conversas durante esses anos longe. Obrigado por me apresentar com lindos sobrinhos que deixam minha vida mais alegre.

Ao meu amor, **Lucas Ferreira Gomes**, com quem eu tenho honra de compartilhar a vida há 11 anos. Lu, você sabe, às vezes, os anseios e preocupações “me levantam e me derrubam, cem vezes por dia” e fazem com que eu me questione “será que eu construí este navio para naufragar?” e então você vem e “deixamos o espectro entrar, você diz o meu nome e todas as cores se iluminam” porque “você tem o amor que eu preciso para me manter firme”. Fiz esse compilado com algumas das suas canções favoritas para traduzir o quanto você e seu amor são partes muito especiais na minha jornada muito antes daqui. Eu te amo muito e tenho muito orgulho do homem que você se tornou.

À minha grande amiga, **Renata de Oliveira Alves**, cuja repentina amizade no início do curso e vivência diária ao longo destes anos me fez uma pessoa melhor. Rê, com você aprendi tantas coisas que não caberia em um único parágrafo. Agradeço imensamente por me mostrar o valor da amizade verdadeira e por segurar a minha mão nos momentos mais difíceis, eu jamais me esquecerei disso. Pensar nessa jornada sem você do meu lado, é imaginar João Grilo sem Chicó, Wood sem Buzz, Bob Esponja sem Patrick, impossível. Ouvimos, certa vez, que na vida há pessoas nas quais esbarramos e outras que encontramos, te encontrar foi um dos mais belos presentes deste processo porque, afinal, como você modestamente (contém ironia) e acertivamente (não contém ironia) se autorrefere, quem te tem, tem tudo! Te amo irmã!

À minha querida amiga **Paloma Casimiro Lopes de Queiroz**, que trabalhou comigo de forma incansável durante as fases laboratoriais desta pesquisa e que se tornou uma grande amiga pessoal. É impossível pensar em você sem me lembrar do significado de lealdade, obrigado por me permitir encontrar refúgio nos períodos de agonia, mas principalmente por compartilhar comigo diversos momentos de alegria. Não tenho dúvidas de que você será uma grande profissional pelo seu comprometimento e dedicação ímpares. Te amo muito!

Não poderia deixar de mencionar os colegas do Faverani's Team, especialmente, **Francieli, Rafaela, Letycia e Mileni** com quem compartilhei etapas fundamentais da pesquisa e aprendi durante a iniciação científica. O ambiente colaborativo e o espírito de equipe que vocês

proporcionaram fizeram com que os desafios da pesquisa se tornassem oportunidades de aprendizado e crescimento.

À **Stefany Barbosa**, expresso minha gratidão pelo apoio constante durante a jornada no grupo de pesquisa, desde os primeiros projetos até os dias de hoje. Sua determinação, foco, disposição e brilhantismo acadêmico são verdadeiramente inspiradores para todos.

Ao Professor **Luciano Tavares Angelo Cintra** e à Doutoranda **Juliana Goto** do programa de pós-graduação em Ciências pela prestatividade e assistência. Vossa contribuição foi essencial para alcançarmos os nossos objetivos.

Ao **Laboratório Multiusuário da Faculdade de Odontologia de Araçatuba -UNESP** (01.12.0530.00-FINEP/PROINFRA 01/2011 e MUBIO) utilizado para análise de microtomografia computadorizada.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba-FOA/UNESP** que se destaca como uma instituição de excelência, amplamente estruturada e com um corpo docente altamente competente. Tenho confiança de que, por meio dessa instituição, adquiri os conhecimentos teóricos e práticos necessários para minha futura atuação profissional. Reconheço, também, a valiosa contribuição de todos os funcionários e técnicos que colaboram para o funcionamento eficaz da faculdade.

À **UNESP**, pela concessão dos auxílios de permanência estudantil que viabilizaram minha estadia na cidade de Araçatuba, em São Paulo. A permanência estudantil desempenhou um papel crucial em minha formação, me auxiliando nos momentos de maior vulnerabilidade, permitindo a concretização dos meus estudos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 2023/01082-2 para a execução deste estudo.

Agradeço a banca examinadora, Profº **Leonardo Perez Faverani**, Profª **Ana Paula Farnezi Bassi**, e à Profª **Bárbara Ribeiro Rios**, por aceitarem compor a banca avaliadora, contribuindo assim para a melhora deste estudo, e por fazer parte de um momento tão importante em minha vida.

Ao Professor **Leonardo Perez Faverani**, ao qual eu orgulhosamente posso chamar de orientador. Tenho profunda admiração e respeito pelo seu trabalho, através do seu exemplo,

aprendi a verdadeira importância da dedicação e do compromisso com a pesquisa. Profº Léo, gostaria de reiterar algo que talvez tenha escapado à sua memória: Em certa ocasião, compartilhei que o considero um grande educador, isso porque compreendo que ser professor é uma nobre posição profissional, mas ser um educador transcende o notável domínio teórico-prático, ser educador envolve um talento natural e uma vocação que são inerentes apenas a alguns indivíduos que verdadeiramente acreditam e amam a educação. Muito obrigado por tudo!

À Professora **Bárbara Ribeiro Rios**, com quem tive o privilégio de trabalhar diretamente durante a minha pesquisa, sempre demonstrando grande paciência e atenção. Sua contribuição foi essencial e seus ensinamentos foram valiosos para o meu desenvolvimento. Além disso, sua habilidade clínica é notável e admirável. Agradeço imensamente por todo o apoio prestado durante este processo. Agradeço também de forma pessoal pela paciência em me ouvir e por ter me orientado em um período de incerteza, suas perspectivas foram fundamentais para eu pudesse encontrar clareza e decidir sobre meus próximos objetivos acadêmicos e profissionais. Muito obrigado!

À Professora **Ana Paula Farnezi Bassi**, cuja paixão pelo ensino, domínio de conhecimento e sensibilidade torna-se uma inspiração para os seus alunos. Profª Ana, seus preciosos ensinamentos se estendem para além da sala de aula ou da própria prática clínica, guardarei um especial para a minha vida: “Quando estiver fazendo algo que não faça mais seus olhos brilharem, pare! A vida é muito curta para não se fazer o que ama”. Agradeço também sinceramente pela generosidade de compartilhar seu tempo e por contribuir de forma significativa para o sucesso deste trabalho.

*“Conheça todas as teorias,  
domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma  
humana, seja apenas outra alma humana”.*

**Carl Jung**



## RESUMO

**RAGGHIANTI, M. H. F. Influência da ozonioterapia e da Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF) na prevenção e tratamento da osteonecrose dos maxilares de ratas senis medicadas com zoledronato. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.**

A osteonecrose dos maxilares associada ao uso de medicamentos (MRONJ) ainda precisa de esclarecimentos sobre sua causa e tratamento, representando um desafio para profissionais da saúde. Terapias locais têm mostrado efeitos promissores na prevenção e tratamento da MRONJ. Este estudo objetivou comparar o efeito de fibrina rica em plaquetas e óleo ozonizado na reparação óssea em ratas idosas com MRONJ induzida experimentalmente. Foram usadas 30 ratas senis (18 meses), sendo que 2 doaram sangue para a confecção da L-PRF, enquanto as demais foram divididas em 4 grupos experimentais (n=7). O grupo SAL recebeu solução de cloreto de sódio 0,9%, e o grupo ZOL, zoledronato 100µg/kg, ambos a cada 3 dias durante 7 semanas. Os grupos ZOL+L-PRF e ZOL+OZN600 também receberam zoledronato, além de L-PRF e óleo de girassol ozonizado, respectivamente. O grupo ZOL+L-PRF foi tratado no pós-operatório imediato, enquanto o grupo ZOL+OZN600 recebeu ozonioterapia nos dias 0, 2 e 4 após a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. A eutanásia ocorreu 28 dias após a exodontia. As mandíbulas foram analisadas por micro-CT, histologia/histometria, Picrosírius Red (PSR) e registros fotográficos. A micro-CT mostrou maior separação trabecular no grupo ZOL+L-PRF. A histometria revelou maior porcentagem de osso não vital no grupo ZOL em comparação aos grupos de terapia ( $p<0,05$ ) e maior tecido ósseo vital no grupo ZOL+OZN. A histologia mostrou osteócitos na matriz extracelular do osso em reparação. A análise de PSR indicou mais fibras colágenas tipo III no grupo ZOL ( $p<0,05$ ) e mais fibras colágenas tipo I no grupo SAL ( $p<0,05$ ). Clinicamente, as terapias mostraram alvéolos sem exposição de osso necrótico e sem sinais de infecção. Conclui-se que o uso de L-PRF e ozonioterapia em suspensão de óleo pode ser eficaz na prevenção e tratamento da MRONJ.

**Palavras chaves:** Osteonecrose; Bifosfonatos; Fibrina Rica em Leucócitos e Plaquetas; Ozônio

## **ABSTRACT**

**RAGGHIANTI, M. H. F. Influence of Ozone Therapy and Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) on the Prevention and Treatment of Jaw Osteonecrosis in Elderly Rats Treated with Zoledronate. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.**

Medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) still requires clarification regarding its cause and treatment, representing a challenge for healthcare professionals. Local therapies have shown promising results in the prevention and treatment of MRONJ. This study aimed to compare the effect of platelet-rich fibrin and ozonated oil on bone repair in elderly rats with experimentally induced MRONJ. Thirty senile rats (18 months) were used, with 2 donating blood for the preparation of L-PRF, while the remaining rats were divided into 4 experimental groups (n=7). The SAL group received 0.9% sodium chloride solution, and the ZOL group received 100 µg/kg zoledronate, both every 3 days for 7 weeks. The ZOL+L-PRF and ZOL+OZN600 groups also received zoledronate, in addition to L-PRF and ozonated sunflower oil, respectively. The ZOL+L-PRF group was treated immediately postoperatively, while the ZOL+OZN600 group received ozone therapy on days 0, 2, and 4 after the extraction of the first left mandibular molar. Euthanasia occurred 28 days after the extraction. The mandibles were analyzed by micro-CT, histology/histometry, Picrosirius Red (PSR), and photographic records. Micro-CT showed greater trabecular separation in the ZOL+L-PRF group. Histometry revealed a higher percentage of non-vital bone in the ZOL group compared to the therapy groups ( $P<0.05$ ) and more vital bone tissue in the ZOL+OZN group. Histology showed osteocytes in the extracellular matrix of the repairing bone. PSR analysis indicated more type III collagen fibers in the ZOL group ( $p<0.05$ ) and more type I collagen fibers in the SAL group ( $p<0.05$ ). Clinically, the therapies showed alveoli without exposure of necrotic bone tissue and no signs of infection. It is concluded that the use of L-PRF and ozonated oil therapy can be effective in preventing MRONJ.

**Keywords:** Osteonecrosis; Bisphosphonates; Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin; Ozone

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Distribuição dos animais a partir de fluxograma representativo. Grupos experimentais SAL, ZOL, ZOL + L-PRF, ZOL + OZN 600 (N=28) e animais doadores (N=2). Os dias referem-se ao período de eutanásia dos respectivos grupos.                                       | 21 |
| <b>Figura 2.</b> Representação do aspecto clínico imediatamente após a instalação da ligadura de algodão no primeiro molar inferior esquerdo.                                                                                                                                        | 22 |
| <b>Figura 3.</b> Representação da aplicação do protocolo de zoledronato via intraperitoneal                                                                                                                                                                                          | 23 |
| <b>Figura 4.</b> A - Representação do aspecto clínico após realização da sindesmotomia ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. B - Condição clínica imediata do alvéolo após a realização da exodontia.                                                                        | 24 |
| <b>Figura 5.</b> A- Conformação física da L-PRF após centrifugação e separação da porção de interesse. B- Aspecto clínico imediato após a inserção da L-PRF no alvéolo. C – Aspecto clínico do pós-operatório imediato.                                                              | 25 |
| <b>Figura 6.</b> (A e B) Aplicação do óleo de girassol ozonizado em cureta de Molt no alvéolo após exodontia.                                                                                                                                                                        | 26 |
| <b>Figura 7.</b> Representação da ordem cronológica dos principais eventos do experimento em animais                                                                                                                                                                                 | 26 |
| <b>Figura 8.</b> Aspecto clínico de grupo SAL após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. (A) Processo alveolar de animal evidenciando região de edema em processo alveolar. (B) Processo alveolar com presença de sinais flogísticos, porém sem exposição óssea. | 32 |
| <b>Figura 9.</b> Aspecto clínico de grupo ZOL após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. (A) Processo alveolar com presença de sinais flogísticos e exposição óssea. (B) Processo alveolar de animal evidenciando região de exposição óssea.                     | 33 |
| <b>Figura 10.</b> Aspecto clínico de grupo ZOL+LPRF após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. (A) Processo                                                                                                                                                      | 33 |

alveolar de animal evidenciando região de edema em processo alveolar. (B) Processo alveolar sem exposição do osso alveolar

**Figura 11.** Aspecto clínico de grupo ZOL+OZN600 após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. (A e B) Processo alveolar em reparo tardio, porém sem sinais flogísticos e de exposição óssea. 33

**Figura 12.** Imagens gráficas representativas da análise de microtomografia computadorizada referentes à (A) porcentagem do volume ósseo (BV.TV); (B) Espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th) (C) Separação das trabéculas ósseas (Tb.SP) (D) Número das trabéculas (Tb.N) e (E) Porcentagem de porosidade total (Tot) 34

**Figura 13.** Figuras representativas da análise histométrica de área óssea neoformada (AON). (A) Representações gráficas dos valores de AON. (B) Fotomicrografias das regiões de neoformação óssea de acordo com os tratamentos. Letras minúsculas representam a diferença estatística entre os grupos (a; b). 35

**Figura 14.** Figuras representativas da análise histométrica de área de tecido ósseo não vital (TONV). (A) Valores gráficos em porcentagem da TONV B) Fotomicrografias das regiões de área óssea não vital de acordo com os tratamentos. Letras minúsculas representam a diferença estatística entre os grupos (a; b;c). 36

**Figura 15.** Figuras representativas da análise histológica de células inflamatórias. (A) Valores de células inflamatórias. (B) Fotomicrografias das células inflamatórias de acordo com os tratamentos. 36

**Figura 16.** Figuras representativas da análise histológica de vasos sanguíneos. (A) Representação gráfica do número de vasos sanguíneos. (B) Fotomicrografias dos vasos sanguíneo presentes de acordo com os tratamentos. 37

**Figura 17.** Imagens representativas da análise das fibras colágenas I e III em PSR. (A) Representação gráfica das fibras colágenas tipo III. (B) Representação gráfica das fibras colágenas tipo I (C) Fotomicrografias das fibras colágenas presentes de acordo com os tratamentos. 38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|             |                                                        |
|-------------|--------------------------------------------------------|
| AMI         | Área Microscópica de Interesse                         |
| AON         | Área óssea não vital                                   |
| APDT        | Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana                    |
| ARI         | Área Radiográfica de Interesse                         |
| BFGF        | Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos            |
| BMP-2       | Proteína morfogenética óssea – 2                       |
| Bv.Tv       | Porcentagem de tecido ósseo                            |
| CEUA        | Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais        |
| CONCEA      | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal |
| CTAN        | Software Ct Analyser                                   |
| EDTA        | Ácido Etilenodiamino Tetra-acético                     |
| EGF         | Fator de Crescimento Epidérmico                        |
| FOA         | Faculdade de Odontologia de Araçatuba                  |
| FPP-sintase | Enzima Farnesil Pirofosfato Sintase                    |
| HE          | Hematoxilina e Eosina                                  |
| LPRF        | Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos                 |
| MC3T3-E1    | Linha Celular Precursora de Osteoblastos               |
| MICRO-CT    | Microtomografia Computadorizada                        |
| MRONJ       | Osteonecrose dos Maxilares Associada a Medicamentos    |
| OZN         | Grupo Óleo Ozônizado                                   |
| PDGF        | Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas             |
| PRF         | Fibrina Rica em Plaquetas                              |
| PSR         | Picrosirius Red                                        |
| PVPI        | Polivinil Pirrolidona Iodo                             |
| RUNX2       | Fator de Diferenciação dos Osteoblastos                |
| SAL         | Grupo Cloreto de Sódio                                 |
| Tb.n        | Número das Trabéculas Ósseas                           |
| Tb.sp       | Separação das Trabéculas Ósseas                        |
| Tb.th       | Espessura do Trabeculado Ósseo                         |
| TGFβ        | Fator de Transformação do Crescimento Beta             |
| TONV        | Tecido Ósseo Não Vital                                 |

|       |                                          |
|-------|------------------------------------------|
| Tot   | Porcentagem de Porosidade Total          |
| UNESP | Universidade Estadual Paulista           |
| VEGF  | Fator de Crescimento Endotelial Vascular |
| ZOL   | Grupo Zoledronato                        |

## SUMÁRIO

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO                                                  | 15 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS                                         | 20 |
| 2.1 Desenho Experimental                                       | 20 |
| 2.1.1 Delineamento do Procedimento Cirúrgico                   | 22 |
| 2.1.2 Pré-operatório                                           | 22 |
| 2.1.3 Período de Indução da Osteonecrose                       | 23 |
| 2.1.4 Exodontia                                                | 24 |
| 2.2 Terapias Locais                                            | 24 |
| 2.2.1 Coleta e Terapia Local com L-PRF                         | 24 |
| 2.2.2 Ozonioterapia Local                                      | 25 |
| 2.2.3 Eutanásia                                                | 26 |
| 2.3 Análises                                                   | 27 |
| 2.3.1. Análise Clínica                                         | 27 |
| 2.3.2 Análise e Processamento de Tecidos Calcificados –MicroCT | 27 |
| 2.3.3 Análise e Processamento de Tecidos Descalcificados       | 28 |
| 2.3.3.1 Análise Histológica                                    | 29 |
| 2.3.3.2. Histometria do Tecido Ósseo: AON e TONV               | 29 |
| 2.3.3.3 Análise por Picrosirius Red                            | 30 |
| 2.4 Análise dos dados                                          | 30 |
| 3.RESULTADOS                                                   | 31 |
| 3.1 Análise Clínica                                            | 31 |
| 3.2 Análise de Tecidos Calcificados                            | 33 |
| 3.2.1 Microtomografia Computadorizada (MicroCT)                | 33 |
| 3.3 Análise dos Tecidos Descalcificados                        | 34 |
| 3.3.1 Análise Histométrica                                     | 34 |
| 3.3.2 Análise Histológica                                      | 36 |
| 3.3.3 Análise por Picrosirius Red (PSR)                        | 38 |
| 4. DISCUSSÃO                                                   | 39 |
| 5. CONCLUSÕES                                                  | 44 |
| REFERÊNCIAS                                                    | 45 |

## 1 INTRODUÇÃO

O continente Sul-Americano passa por mudanças demográficas aceleradas. No Brasil a expectativa de vida tem aumentado significativamente nos últimos anos, sobretudo entre o sexo feminino. As mulheres possuem melhores índices em relação a longevidade, mas comumente convivem mais tempo com multimorbidades (1). O sistema esquelético frequentemente é um dos acometidos por alterações relacionadas ao processo de senescência devido a depleção hormonal intrínseca ao processo de menopausa (2,3,5). A osteoporose é uma das comorbidades osteolíticas que se relaciona ao processo de envelhecimento, visto que a deficiência de estrógeno provinda da menopausa aumenta a atividade de reabsorção osteoclástica, sem um correspondente aumento da atividade osteoblástica. A condição causa baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura tecidual, levando a maiores riscos de fraturas (1-5).

Os bisfosfonatos são drogas antirreabsortivas altamente eficazes usadas para tratar condições que resultam no aumento da atividade osteoclástica. Eles também são usados para impedir a progressão da metástase de tumores malignos osteotrópicos. (2, 3, 4). Os bisfosfonatos possuem estrutura química similar ao pirofosfato endógeno, com dois grupos fosfato ligados a um átomo de carbono, o que leva à alta afinidade pela hidroxiapatita, além de duas cadeias laterais, R1 e R2, responsáveis pelas suas propriedades farmacológicas. A estrutura química dos bisfosfonatos é semelhante à do pirofosfato endógeno, consistindo de dois grupos fosfato ligados a um átomo de carbono. Isso confere alta afinidade pela hidroxiapatita (3,4).

O zoledronato é o fármaco mais poderoso do grupo dos bisfosfonatos contendo nitrogênio, desempenhando sua ação de forma específica no metabolismo ósseo. Sua intervenção incisiva bloqueia a via do mevalonato, consequentemente, impossibilita a dinâmica citoesquelética dos osteoclastos (3). Esse composto aumenta a densidade óssea, mitigando a probabilidade de fraturas oriundas de doenças osteolíticas como a osteoporose (5). No entanto, a supressão severa da remodelação óssea atribuída ao uso prolongado de bisfosfonatos, principalmente aqueles em altas dosagens e que possuem nitrogênio em sua composição, pode se caracterizar como um risco latente ao desenvolvimento da osteonecrose (4,5,7).



A osteonecrose pode ser compreendida como um desequilíbrio do processo fisiológico do metabolismo ósseo, resultando em um osso não vital, tendo em vista que o fármaco supramencionado prejudica a expressão de proteínas ósseas e aumenta a presença de citocinas, diminuindo a fixação de novos minerais à matriz óssea, levando a um osso microfraturável, além de promover efeitos antiangiogênicos e susceptibilidade à infecção devido a disfunção imune induzida por tais drogas (3,7,9). Em consequência aos traumas contínuos provenientes da dinâmica mastigatória, os ossos maxilares se apresentam comumente impactados pela osteonecrose, dentre estes a mandíbula é o mais acometido, tendo como início na maioria dos casos o osso alveolar, devido à sua maior taxa de renovação óssea, relacionada à oclusão e às forças de tensão, além de grande potencial ao desenvolvimento de infecções (3, 5, 9).

A osteonecrose dos maxilares associada ao uso de medicamentos (MRONJ) pode ser considerada uma reação adversa relacionada ao emprego de drogas como bisfosfonatos, o anticorpo monoclonal Anti-RANKL, o denosumabe e os antiangiogênicos (3,6). Contudo, o completo esclarecimento sobre os fatores etiopatológicos da osteonecrose ainda apresenta limitações (3, 9). Estudos epidemiológicos demonstram que a doença afeta de forma mais frequente o sexo feminino, em idade avançada e que fazem ou fizeram uso crônico de bisfosfonatos, sobretudo, os administrados via intravenosa, especificamente o zoledronato (2, 3, 4). Os casos de MRONJ distinguem-se de outras formas de osteonecrose a partir de critérios clínicos para o seu diagnóstico, como o tratamento, quer seja atual ou pregresso, com drogas antirreabsortivas ou antiangiogênicas, a presença de tecido ósseo exposto ou passível de sondagem por via oral ou extraoral que persista por mais de oito semanas e sem história de radioterapia ou doença metastática nos ossos gnáticos. (7, 9, 11).

Os fatores locais que contribuem para o estabelecimento dessa entidade patológica, em pacientes com risco ao seu desenvolvimento, são as cirurgias dentoalveolares como instalação de implantes, intervenções periodontais e, principalmente, as extrações dentárias. Ademais, fatores anatômicos, como o uso de próteses mal adaptadas ou ainda condições concomitantes como doença periodontal preexistente e lesões periapicais podem também serem considerados fatores de risco.

Além disso, há o risco caracterizado como “espontâneo”, ou seja, sem qualquer relação com os fatores anteriormente mencionados (3,6,10,19).

Quando estabelecida, a MRONJ acarreta ônus no que tange ao bem-estar global do indivíduo, devido aos sinais e sintomas que a doença pode ocasionar, como quadro álgico associado, infecção dos tecidos moles, presença de ulcerações ou supurações, formação de tratos sinusais, fístulas, parestesia de um nervo relacionado, sinusite maxilar crônica e fraturas patológicas. Além disso, inicialmente a patologia pode não produzir sintomas específicos em relação à algesia, ainda assim coexistem os riscos de progressão associados ao quadro (4,10,12,13). Para além da discussão em relação a sua etiopatogenia, é de substancial relevância a compressão acerca da prevenção e das possibilidades terapêuticas da MRONJ, objetivando um melhor prognóstico, visto que o tratamento desses pacientes ainda representa um desafio médico-odontológico, carecendo de um consenso clínico ou protocolo. (2, 11, 13).

A prevenção da MRONJ compreende fatores modificáveis que reduzam os riscos do seu desenvolvimento. Considerar os efeitos adversos do medicamento, maximizar a saúde geral do paciente, além do seu encaminhamento ao cirurgião dentista para a adequação do meio bucal e possíveis intervenções são cuidados primários que antecedem o uso das drogas antirreabsortivas (4,11). Modalidades terapêuticas presentes na literatura também são empregadas como medidas de prevenção ao desenvolvimento da MRONJ em pacientes que fizeram ou fazem uso de antirreabsortivos e que são submetidos a procedimentos cirúrgicos odontológicos, como o uso de antibioticoterapia sistêmica profilática, administração de pentoxifilina e tocoferol, além de tratamentos adjuvantes como oxigenação hiperbárica, terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e ozonioterapia sob veículo oleoso, no intuito de otimizar o metabolismo ósseo ou prevenir o processo infeccioso (3,13,14,15). As terapias cirúrgicas são indicadas diante do dano tecidual ósseo irreversível, que consiste na exérese do segmento de osso necrótico, por meio de curetagem, sequestrectomia conservadora ou ressecção óssea, em conformidade com a dimensão da região afetada (2, 3, 5, 13, 15).

Encontrado na natureza sob a forma de molécula gasosa cíclica, o ozônio (O<sub>3</sub>), clinicamente pode ser utilizado na odontologia a partir de aplicações de gás sobre os tecidos, água ozonizada ou suspensão oleosa (13, 23). Seus possíveis benefícios estão associados à atuação antimicrobiana e propriedades curativas (22).

A ozonioterapia administrada nos casos de MRONJ, em especial topicamente sob sua forma oleosa, demonstrou em estudos pré-clínicos a geração de fatores de crescimento e ativação de mecanismos de ação antioxidante para promoção do reparo tecidual e ainda dados promissores em relação à ação preventiva do desenvolvimento de lesões osteonecróticas após exodontias (22, 23).

Os compostos plaquetários se caracterizam como alternativas de terapias locais autólogas, pouco invasivas e de baixo custo econômico na cirurgia maxilofacial e dentoalveolar (24, 26, 29). A base desses compostos trata-se de uma rede de fibrina tridimensional com trombócitos, leucócitos e células tronco, além de citocinas, proteínas e uma grande variedade de fatores de crescimento, como Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), um poderoso estimulante para a quimioatração de osteoblastos, o Fator de Transformação Crescimento Beta (TGF- $\beta$ 1), uma proteína reguladora envolvida na remodelação óssea e cicatrização de fraturas, além do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEFG) que auxilia o reparo ósseo através da promoção de estruturas vasculares (26,29). Oriunda de um método recente que consiste na centrifugação do sangue do próprio paciente, sem posterior adição de produtos químicos, a Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF) permite a partir do seu processo de coagulação natural o aumento da meia vida e liberação dos componentes supracitados (27, 26, 28).

Após o processo mecânico em centrifuga por 10 ou 12 minutos sob 3000 rpm ou 2700 rpm, respectivamente, é possível observar a conformação física da L-PRF, caracterizada por 3 camadas, a porção mais inferior concentrando o aglomerado de glóbulos vermelhos, na parte superior o plasma acelular e o segmento intermediário composto pelo coágulo de fibrina rico em plaquetas e leucócitos (25, 26, 39). A porção central trata-se, portanto, da matriz de LPRF que é aplicada como membrana para o fechamento do osso exposto e pode ser considerada um método complementar à terapia cirúrgica. Esse composto plaquetário possui resistência mecânica, efeito estabilizador da ferida e tem demonstrado resultados promissores no tratamento da MRONJ, com potencial de auxiliar na proliferação celular e diferenciação osteogênica, melhorando os estágios clínicos em nível significativo ou ainda auxiliando na cura da doença (24, 25, 26, 28). Apesar disso, em virtude dos aspectos multifatoriais da MRONJ e da falta de conhecimento totalmente esclarecido sobre o seu mecanismo patogênico, preconizam-se estudos prospectivos, randomizados e adequadamente

desenhados para comprovar os efeitos biológicos da L-PRF no tratamento e prevenção da MRONJ (26,27,28,29).

Ainda que algumas modalidades terapêuticas tenham demonstrado perspectivas favoráveis ao enfrentamento da MRONJ, inexistente um consenso clínico sobre as suas utilizações (13, 26). Em vista disso, os dados provindos desse estudo se tornam relevantes, posto que evidências pré-clínicas in vivo utilizando as terapias com L-PRF e a suspensão oleosa de ozônio contribuirão para o entendimento acerca de mecanismos eficazes quanto a prevenção e reparação óssea que futuramente poderão minimizar os prejuízos à qualidade de vida do paciente acometido pela MRONJ.

Este trabalho objetivou estabelecer análise comparativa relacionada as terapias locais com a utilização de fibrina rica em plaquetas e a suspensão de óleo ozonizado nos parâmetros reparacionais do tecido ósseo frente a indução experimental de osteonecrose associada ao uso de zoledronato em ratas senis.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Desenho Experimental

Antes do início da proposta, o projeto foi enviado para avaliação da Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e, após obter parecer favorável (Processo FOA nº 839/2023) o trabalho teve início. Todos os procedimentos realizados seguem as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os guidelines previamente publicados no “Animal Arrive guidelines 2.0”. Foram utilizados 30 animais ( $n=7 + 2$  doadores de sangue) (*Rattus norvegicus albinus* Wistar) senis, fêmeas, com cerca de 18 meses e peso corporal variando entre 300 e 350 gramas, de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, providas pelo Biotério Central da própria instituição.

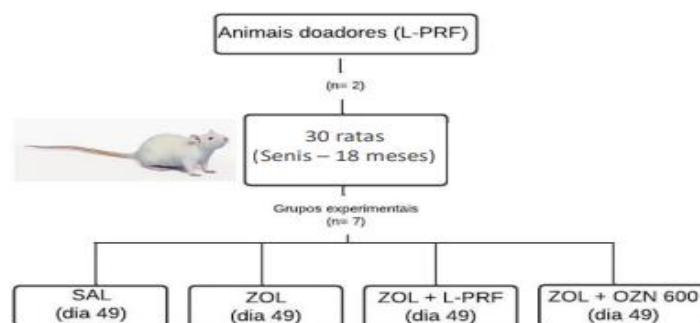
No decorrer de todo o experimento, os animais estiveram mantidos em gaiolas (com no máximo 4 animais por gaiola) em ambiente com temperatura estável ( $22 \pm 2^\circ$  C), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração balanceada, contendo 1,4% Ca e 0,8% P (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todo o experimento e água ad libitum, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos, no qual serão submetidos a jejum hídrico.

Para determinar a quantidade amostral, foram realizadas buscas nas principais bases de dados (PUBMED, Scopus, Embase, Web of Science e Scielo), havendo como base pesquisas experimentais com animais que contivesse metodologia análoga e/ou abrangesse o emprego local de fibrina rica em plaquetas e leucócitos ou óleo ozonizado. Para tal, utilizou-se como diretrizes de investigação as palavras-chaves “Osteonecrose; L-PRF; Ozônio; Exodontia” e, devido à inexistência de estudos preliminares avaliando ambos os elementos, adotou-se como critério os trabalhos de Ervolino et al. (2019) (13) e Xiao et al. (2017) (33) que utilizam metodologia semelhante a esse estudo, estabelecendo, portanto, o valor de  $n=7$  por grupo experimental. 28 ratas foram randomizadas em 4 grupos experimentais sendo o Grupo 1 - SAL, com 7 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 2 - ZOL com 7 ratas que foram induzidas à osteonecrose pela aplicação de zoledronato 100µg/kg, a cada 3 dias por 7 semanas (controle positivo); Grupo 3 - ZOL+L-PRF com 7 ratas que também receberam o uso de zoledronato e submetidas a aposição de matriz de L-PRF sobre o alvéolo imediatamente após a exodontia. Grupo 4 - ZOL+OZN600 com 7 ratas induzidas a osteonecrose com zoledronato e terapia local com óleo de girassol ozonizado (600 mEq/kg) em concentração de 0,3 mg/kg por 2 minutos nos períodos 0, 2 e 4 dias pós cirúrgico; as dosagens do protocolo medicamentoso foram ajustadas para animais, apoiadas em terapêuticas oncológicas em humanos.

O protocolo para obtenção da matriz de LPR-F oriundo da coleta e centrifugação da amostra sanguínea se fundamentou no estudo Awadeen et. Al. 2020 (34) e no processo de centrifugação estabelecido por Choukroun et al 2006(25). A concentração do óleo de girassol ozonizado adotada para o grupo experimental desta pesquisa se apoiou em dados clínicos de reparação tecidual previstos na revisão sistemática de Lim et al. (2019) (35) optando-se pela concentração com melhor atuação na terapia adjuvante. Figura 1: Distribuição dos animais a partir de fluxograma representativo. Grupos experimentais SAL, ZOL, ZOL + L-PRF, ZOL + OZN 600 (N=28) e animais doadores (N=2). Os dias referem-se ao período de eutanásia dos respectivos grupos.

**Figura 1: Distribuição dos animais a partir de fluxograma representativo. Grupos experimentais SAL, ZOL, ZOL + L-PRF, ZOL + OZN 600 (N=28) e animais doadores (N=2). Os dias referem-se ao período de eutanásia dos respectivos grupos.**



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

### **2.1.1 Delineamento do procedimento cirúrgico**

#### **2.1.2 Pré-operatório**

Os 30 animais passaram por um período de adaptação ao biotério, previamente a jejum de 12 horas de todos os animais. No período inicial ainda, o procedimento pioneiro com propósito de suscitar a osteonecrose nos animais foi a instalação de ligaduras de algodão em torno do seu primeiro molar inferior esquerdo, visando conduzir a região à periodontite, o que também viabilizou a extração facilitada. Objetivando o conforto, os procedimentos experimentais invasivos foram realizados sob anestesia através da administração de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) além da anestesia infiltrativa para analgesia e hemostasia da área operada com cloridrato de mepivacaína (0,3 ml/kg, Mepiadre 2% com adrenalina 1:100.000, DFL). A técnica de eutanásia consistiu na perfusão cardíaca, mediante combinação de 100 ml de solução salina e 0,1% de heparina e 800ml de formaldeído 4% (Chemical®, St. Louis, MO, USA) em tampão fosfato-salino (PBS – Sigma Chemical®) 0.1 M, 4°C, pH 7.4.

**Figura 2 – Representação do aspecto clínico imediatamente após a instalação da ligadura de algodão no primeiro molar inferior esquerdo.**



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

### 2.1.3 Período de Indução da Osteonecrose

Ainda no baseline, no dia 0, deu-se início ao processo de indução da osteonecrose em 29 animais, por meio do protocolo de zoledronato 100µg/kg diluídos em 0,45 ml de solução salina, por via intraperitoneal, em uma seringa SLIP INSULINA de 1ml, descartável com agulha de calibre 13mm x 0,38mm, a cada 3 dias, por um período de 7 semanas (49 dias) até a eutanásia. 21 destes animais relativos aos grupos experimentais: ZOL; ZOL+L-PRF e ZOL+OZN600; + 2 animais doadores para L-PRF). Os animais restantes (7 relativos ao grupo SAL) não foram expostos zoledronato, estes receberam 0,45 ml de solução salina também por via intraperitoneal, sob as mesmas condições e seguindo o idêntico cronograma.

**Figura 3 – Representação da aplicação do protocolo de zoledronato via intraperitoneal**



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

### 2.1.4 Exodontia

Transcorridas três semanas do início da aplicação do zoledronato, sob anestesia através da administração de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) além da anestesia infiltrativa para analgesia e hemostasia da área operada com cloridrato de mepivacaína (0,3 ml/kg, Mepiadre 2% com adrenalina 1:100.000, DFL) e, posteriormente a um jejum de 12 horas, as ratas foram posicionadas na mesa de operação para a manutenção da abertura bucal, realizou-se seguidamente a remoção



da ligadura de algodão. Seguidamente, conduziu-se todos os animais à antissepsia oral com PVPI 10% (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica,

**Figura 4 – A- Representação do aspecto clínico após realização da sindesmotomia ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. B - Condição clínica imediata do alvéolo após a realização da exodontia.**



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

## 2.2 Terapias Locais

### 2.2.1 Coleta e terapia local com L-PRF

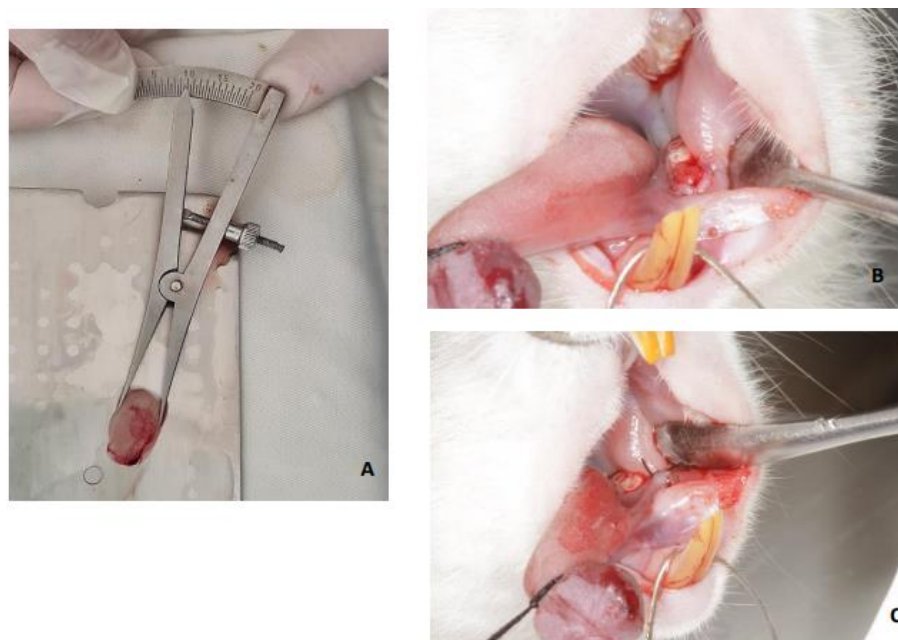
Inicialmente, dois animais foram selecionados como doadores de sangue, objetivando a produção da L-PRF. As etapas experimentais de instalação da ligadura de algodão, protocolo medicamentoso com zoledronato e exodontia ocorreram em iguais circunstâncias para esses animais, visando minimizar o viés, no entanto, estes não foram submetidos a nenhuma das terapias locais. Primeiramente, realizou-se a punção cardíaca, utilizando agulhas hipodérmicas, por meio da qual obteve-se amostras de 10 ml de sangue que serão acondicionadas em tubos de vidro sem anticoagulante. Posteriormente, o segundo operador programou a centrifugação em 3000 rpm por 10 minutos de acordo com o protocolo proposto por Choukroun et al 2006 e descrito no projeto. Passado o processo de centrifugação foi possível observar a diferenciação física da L-PRF, a porção mais inferior concentrando o aglomerado de glóbulos vermelhos, na parte superior o plasma acelular e o segmento intermediário composto pelo coágulo de fibrina rico em plaquetas e leucócitos.

Cuidadosamente, o operador acondicionou o coágulo em estojo PRF (Supremo instrumentos cirúrgicos), utilizado para conformação da matriz de concentrados plasmáticos por meio de sua compressão. A L-PRF foi inserida no

alvéolo pós exodôntico, no pós-operatório imediato, haja visto que a liberação lenta dos produtos envolvidos na degradação da matriz de fibrina se mostra mais favorável ao reparo tecidual.

**Figura 5 – A- Representação da conformação física da L-PRF após centrifugação e separação da porção de interesse. B- Aspecto clínico imediatamente após a inserção da L-PRF no alvéolo. C – Aspecto clínico do pósoperatório imediato.**

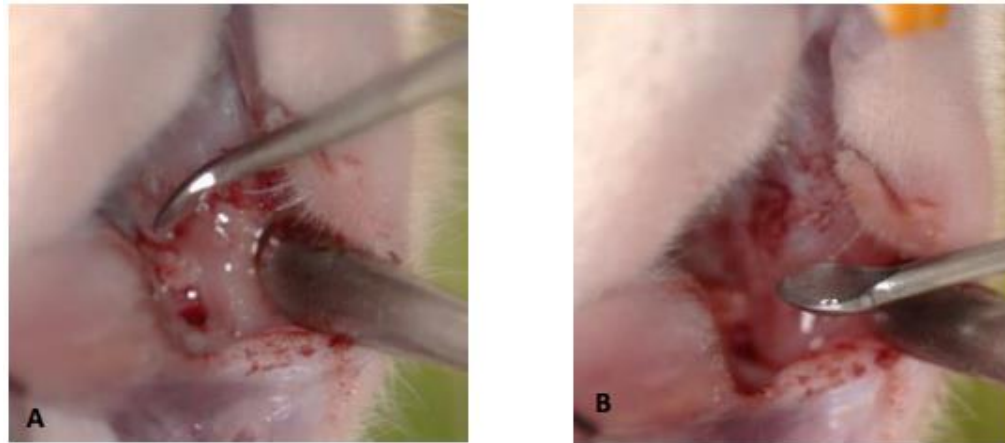
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)



### 2.2.2 Ozonioterapia Local

Os animais referentes ao grupo ZOL+OZN 600 tiveram aplicação de óleo de girassol ozonizado na concentração de 600 mEq/kg (“Dose Extra” farmácia de manipulação – Pelotas/Rio Grande do Sul-BR), na região de alvéolo correspondente ao primeiro molar inferior esquerdo, durante 2 minutos, em concentração de 0,3mg/kg em uma seringa descartável de 1 ml com agulha de calibre 13mm x 0,38mm. A aplicação foi realizada por via de contenção do animal e ocorreram nos dias 0 (pós-operatório imediato), 2 e 4. Figura 6 – (A e B) Aplicação do óleo de girassol ozonizado em cureta de Molt em alvéolo após exodontia.

**Figura 6 – (A e B) Aplicação do óleo de girassol ozonizado em cureta de Molt em alvéolo após exodontia.**

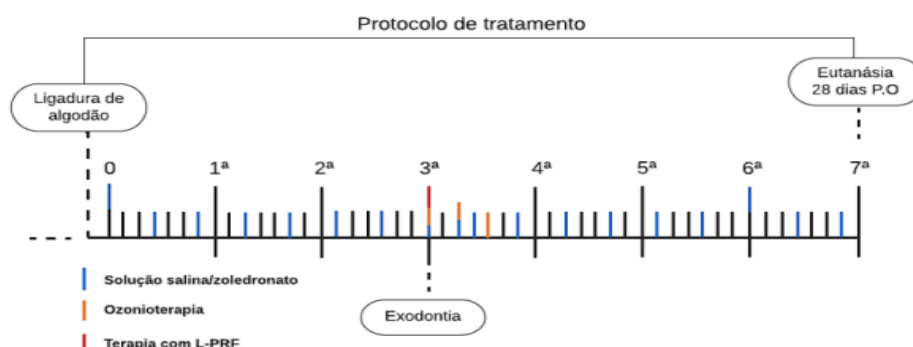


Fonte:Elaborado pelo autor (2023)

### 2.2.3 Eutanásia

Preliminarmente à eutanásia, se deram registros fotográficos dos animais para análise clínica através de câmera Nikon sob flash macro de 105 mm sempre pelo mesmo operador. O procedimento de eutanásia dos grupos experimentais SAL, ZOL, ZOL+L-PRF e ZOL+OZN600 ocorreu 28 dias (4 semanas) após o procedimento de exodontia, completando 49 dias (7 semanas) a contar do início do protocolo medicamentoso. Por fim, a eutanásia do animal escolhido como doador de sangue para produção de matriz de L-PRF foi preconizada ao fim de sua função, ou seja, aos 21 dias da ligadura de algodão, no período da exodontia.

**Figura 7 – Representação da ordem cronológica dos principais eventos do experimento em animais**



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

A técnica de eutanásia consistiu na perfusão cardíaca, mediante combinação de 100 ml de solução salina e 0,1% de heparina e 800ml de formaldeído 4%

(Chemical®, St. Louis, MO, USA) em tampão fosfato-salino (PBS – Sigma Chemical®) 0.1 M, 4°C, pH 7.4. Posteriormente à dissecação das mandíbulas, estas foram postas no agente fixador (formol tamponado) e posteriormente foi realizado escaneamento e processamento.

## **2.3 Análises**

### **2.3.1 Análise clínica**

A avaliação clínica foi realizada em todas as amostras coletadas, junto a registros de imagens, avaliando aspectos como condições da mucosa, coloração dos tecidos moles, presença ou não de tecido reparacional, exposição óssea, sequestro ósseo, presença de secreção purulenta, ou quaisquer características relacionadas ao reparo.

### **2.3.2 Análises e processamento de tecidos calcificados - Microtomografia computadorizada (MicroCT)**

Para a análise tridimensional da arquitetura óssea, os grupos SAL, ZOL, ZOL+LPRF, ZOL+OZN600, tiveram os espécimes que se encontravam no agente fixador lavados em água corrente por 12 horas, a fim de remover quaisquer resíduos de formaldeído, com posterior armazenagem em álcool 70%. Posteriormente, os espécimes foram submetidos a análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada, pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), no qual se geraram cortes de cortes de 8 µm de espessura (90Kv e 111µA) com filtro de cobre e passo de rotação de 0,05 mm. As áreas pela projeção dos raios-X nos espécimes foram armazenadas e reconstruídas, determinando a área de interesse por meio do software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6. 6.0).

Através do software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) realizaram-se as reconstruções das imagens, permitindo adequação do posicionamento padrão para todas as amostras em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Sequentemente, definiu-se a área radiográfica de interesse (ARI) por meio do software CTAnalyser – CTAn (2003- 11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), tal processo delimita área de 4mm<sup>3</sup>, incluindo o alvéolo dentário inclui a porção do local

de extração dentária anteriormente ocupada pelas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior esquerdo e tecidos adjacentes. O CTAn analisou e mediu a imagem de acordo com a escalas de cinza. Após o ajuste e remoção dos tons de cinza da área correspondente do alvéolo, o threshold utilizado na análise será de 25- 90 tons de cinza, permitindo a obtenção do volume de osso presente/formado no interior dos alvéolos. Os parâmetros analisados foram referentes à quantidade do tecido ósseo (BV.TV= porcentagem do volume ósseo) e qualidade do tecido ósseo (Tb.Th= espessura do trabeculado ósseo, Tb.SP= separação das trabéculas ósseas, Tb.N= número das trabéculas e To (tot) = porcentagem de porosidade total)(36).

### **2.3.3 Análises e processamento de tecidos descalcificados**

Consecutivamente ao processamento em MicroCT, os espécimes regressaram ao fixador a fim de completar 72 horas no fixador, partindo para a descalcificação em ácido etilenodiamino tetra-acético 10% (EDTA) por 6-8 semanas. Descalcificadas, as peças seguiram para desidratação numa sequência de álcoois (70 a 100%). Em seguida, realizou-se a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina visando obter cortes de 5 µm de espessura, por meio de micrótomo e a confecção das lâminas coletadas, de lingual para vestibular, as secções histológicas da porção do alvéolo dental e tecidos adjacentes analisados de maneira a padronizá-las e facilitar a identificação. As lâminas pares após a microtomia foram destinadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE).

A área de interesse foi dividida em duas: AMI (I) e a AMI (II), estas foram definidas por meio da análise microscópica realizada. A AMI (I) compõe 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 compõe uma linha situada paralelamente à dentina coronária e à superfície radicular do segundo molar inferior esquerdo, estendendo-se 4mm mesialmente. Seu limite coronário será composto de uma linha paralela ao limite da margem cemento-gengival do segundo molar inferior esquerdo, estendendo-se 4mm apicalmente. O AMI (II) consiste 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 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 das duas áreas analisadas.

#### **2.3.3.1. Análise histológica**

Um histologista certificado, cego aos tratamentos, realizou todas as análises microscópicas. Para a análise histométrica foram avaliados três cortes histológicos localizados na porção vestibular, média e lingual do local da extração dentária. Os parâmetros avaliados referem-se à qualidade e quantidade óssea, maturação do tecido e perfil inflamatório, incluindo contagem de células inflamatórias e vasos sanguíneos. Para tal, as lâminas coradas em HE foram fotomicrografadas na região do defeito ósseo crítico, em uma objetiva de 40x por meio do software Image J, através da ferramenta “Free hands”, permitindo a mensuração da área de tecido ósseo neoformado, além da avaliação da maturidade e dos aspectos do tecido ósseo dos diferentes grupos. Para avaliação do perfil inflamatório, com ênfase em contagem de linfócitos e contagem de número de vasos sanguíneos, realizaram-se três fotomicrografias para cada amostra em objetivas de 100x, em diferentes regiões do defeito. Em seguida, no software Image J, utilizou-se as ferramentas “Grid” e “Cell Counter Notice”, para localização e quantificação das estruturas referidas.

#### **2.3.3.2 Histometria do tecido ósseo: AON e TON**

A análise histométrica do tecido ósseo neoformado (AON) foi efetuada por meio de fotomicrografias das áreas adjacentes do alvéolo do dente, capturadas com o auxílio de um programa de análise de imagem (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). A área ocupada pelo AON foi determinada e expressa em  $\mu\text{m}^2$  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 quantidade total de tecido ósseo será quantificada por intermédio do software de análise de imagens (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss). Posteriormente, a percentagem da AON e de tecido ósseo não vital (TONV) serão calculados através do mesmo programa de análise. O TONV caracteriza uma região

em que mais de dez lacunas de osteócitos vizinhos se mostraram vazias ou contendo restos de osteócitos necróticos.

#### **2.3.3.3. Análise por Picrosírius Red (PSR)**

Para análise por Picrosírius Red (PSR), as áreas de interesse foram removidas e, sequencialmente, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo (Leica – Biosystems® RM 2245, Nussloch, Alemanha), com 5 µm de espessura. Os cortes acoplados em duas lâminas, com três cortes cada. Essas lâminas foram submetidas à coloração pela técnica de PSR para análise da maturação das fibras colágenas (40). Os níveis de maturação das fibras de colágeno analisados nas secções coradas pelo PSR sob microscopia de luz polarizada. O programa LAS (Leica LAS 4.12, Leica Microsystems) foi utilizado, permitindo a seleção de cores correspondentes para cada tipo de fibra de colágeno do tecido conjuntivo. Após a seleção da cor, o programa calculará automaticamente a área marcada de cada tipo de fibra colágena (40).

#### **2.4 Análise estatística**

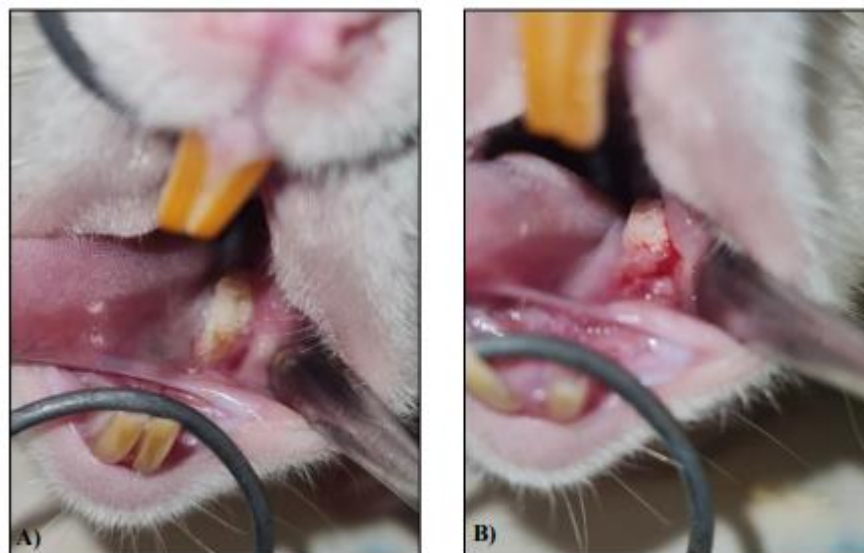
Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos obtidos, foi abordada a diferença entre os grupos experimentais (SAL; ZOL; ZOL+L-PRF; ZOL+OZN600. Todos os dados foram submetidos à curva de normalidade – teste de Shapiro-Wilk com nível de significância de 0,05 para todos os testes. Os dados histométricos foram submetidos ao teste ANOVA-1 fator e pós-teste Tukey quando  $p < 0,05$ . O software estatístico para todos os testes foi o SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, USA).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Análise Clínica

No grupo SAL foi possível observar animais com a região de primeiro molar inferior esquerdo com sinais de processo de reparo tardio e com sangramento ao manipular o tecido gengival, porém sem exposição de tecido ósseo e sinais de infecção (Figura 8).

**Figura 8 – Aspecto clínico de grupo SAL após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. (A) Alvéolo pós-exodôntico evidenciando tecido gengival neoformado com edema e normocorada. (B) Alvéolo com tecido gengival de recobrimento sangrante, sem exposição óssea.**



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

No grupo ZOL observou-se animais com a região de primeiro molar inferior esquerdo com sinais de processo de reparo tardio, com exposição de tecido ósseo e sinais de infecção e alguns com presença de sequestro ósseo. (Figura 9).

**Figura 9 – Aspecto clínico de grupo ZOL após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. (A) Alvéolo pós-exodôntico com presença de sinais flogísticos e exposição óssea. (B) Alvéolo pós-exodôntico evidenciando exposição óssea.**





Fonte:Elaborado pelo autor (2024)

Com relação ao grupo ZOL+LPRF foi possível observar a presença da gengiva de reobrindo, que se encontrava edemaciada. Em geral caracterizava-se como um processo de reparo atrasado, no entanto sem exposição do tecido ósseo alveolar. (Figura 10 A-B).

**Figura 10 – Aspecto clínico de grupo ZOL+LPRF após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. (A) Processo alveolar de animal evidenciando região de edema em processo alveolar. (B) Processo alveolar sem exposição do osso alveolar**



Fonte:Elaborado pelo autor (2024)

No que concerne às análises clínicas do grupo ZOL+OZN600 observou-se a presença de tecido de recobrimento que se encontrava edemaciada. De forma semelhante ao grupo anterior demonstrou um processo de reparo atrasado, sem exposição de tecido ósseo ou sinais de infecção (Figura 11).

**Figura 11 – Aspecto clínico de grupo ZOL+OZN600 após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. (A e B) Processo alveolar em reparo tardio, porém sem sinais flogísticos e de exposição óssea.**



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

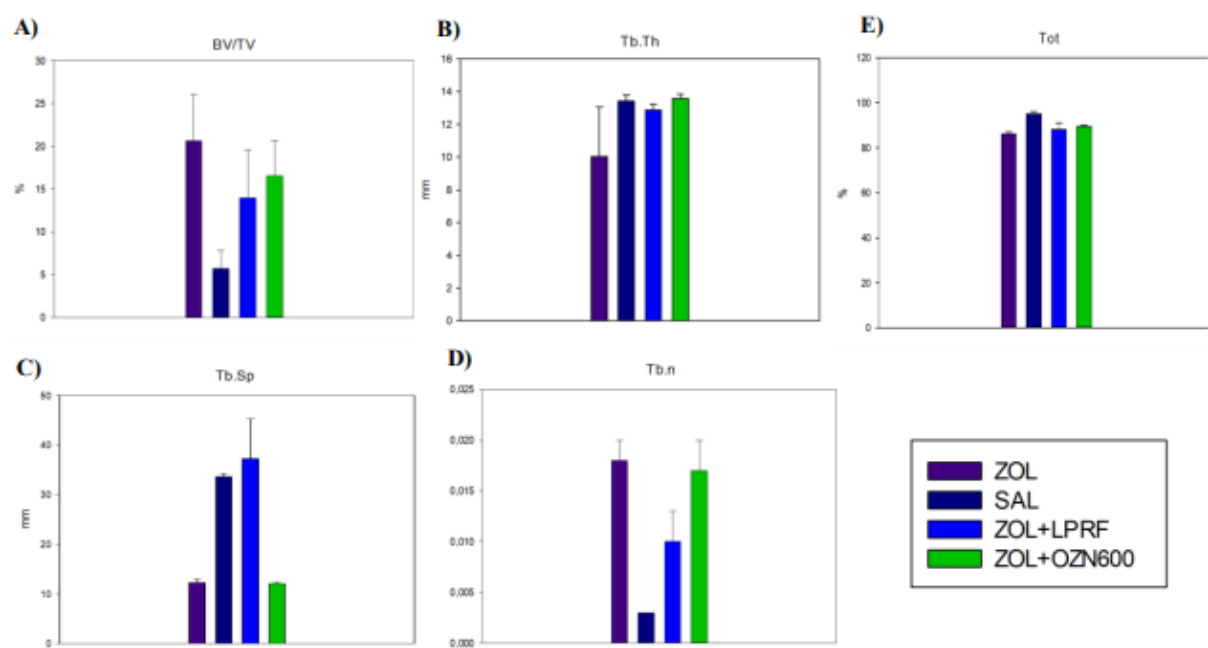
### **3.2 Análises de tecidos calcificados**

#### **3.2.1 Microtomografia computadorizada (MicroCT)**

A partir da análise microtomográfica foi possível realizar a caracterização microestrutural do tecido ósseo na região do alvéolo em reparação. Nessa perspectiva, no que concerne aos padrões quantitativos do tecido ósseo, como a porcentagem de volume ósseo (BV/TV), o grupo ZOL apresentou maior porcentagem (20,66%), seguido dos grupos ZOL+LPRF e ZOL+OZN600, entre 16,5 e 13,99%, respectivamente, sendo o grupo SAL a menor porcentagem para esta variável (5,72%) (Figura 12-A). No que se refere aos parâmetros de qualidade do tecido ósseo, a espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th) foi bastante similar entre os grupos, SAL, ZOL+OZN600, ZOL+LPRF, tendo o grupo ZOL apresentado menor valor. (Figura 12-B) Os valores com relação à separação das trabéculas ósseas (Tb.Sp) foram maiores para os grupos ZOL+LPRF e SAL, apresentando similaridade entre estes (Figura 12-C). O número de trabéculas ósseas (Tb.N) foi superior para o grupo ZOL e ZOL+OZN600 (Figura 12-D). No tocante ao percentual de porosidade total (Tot)

observou-se similaridade entre todos os grupos pesquisados, tendo o grupo SAL apresentado discreta superioridade. (Figura 12-E)

**Figura 12 - Imagens gráficas representativas da análise de microtomografia computadorizada referentes à (A) porcentagem do volume ósseo (BV.TV); (B) Espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th) (C) Separação das trabéculas ósseas (Tb.SP) (D) Número das trabéculas (Tb.N) e (E) Porcentagem de porosidade total (Tot)**



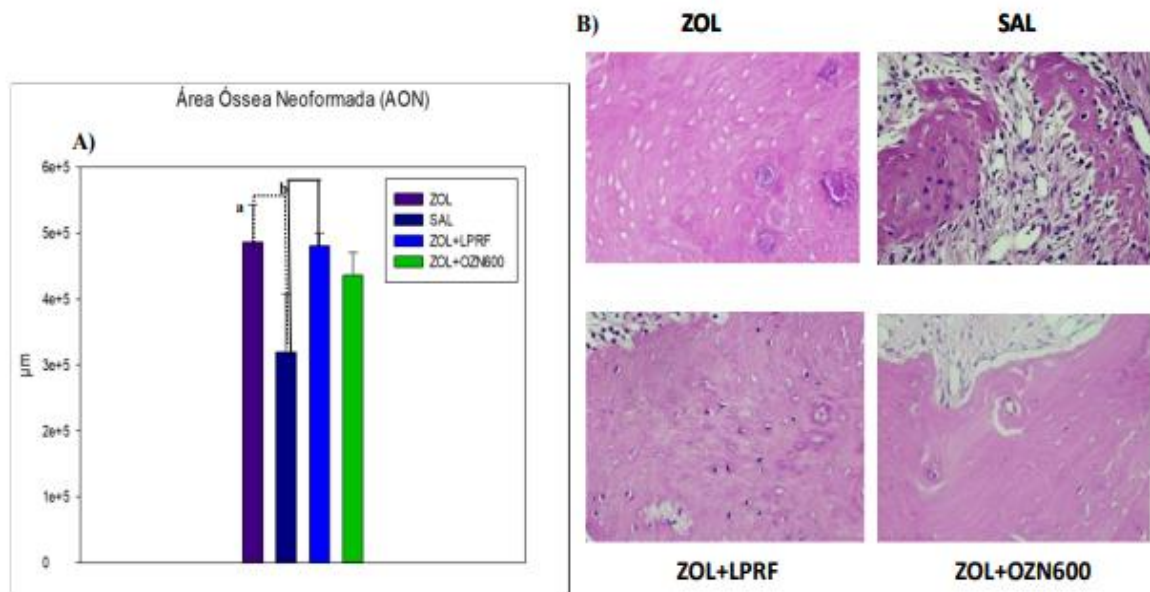
Fonte:Elaborado pelo autor (2024)

### 3.3 Análises De Tecidos Descalcificados

#### 3.3.1 Análise histométrica

A análise das fotomicrografias possibilitou quantificar a área de tecido ósseo neoformado (AON), em que se constatou as maiores taxas de neoformação para o grupo ZOL(p0,5), com menor quantidade de células do tecido conjuntivo entremeado, inclusive quando comparado ao grupo tratado com ozonioterapia (p>0,5) (Figura 13-A e B).

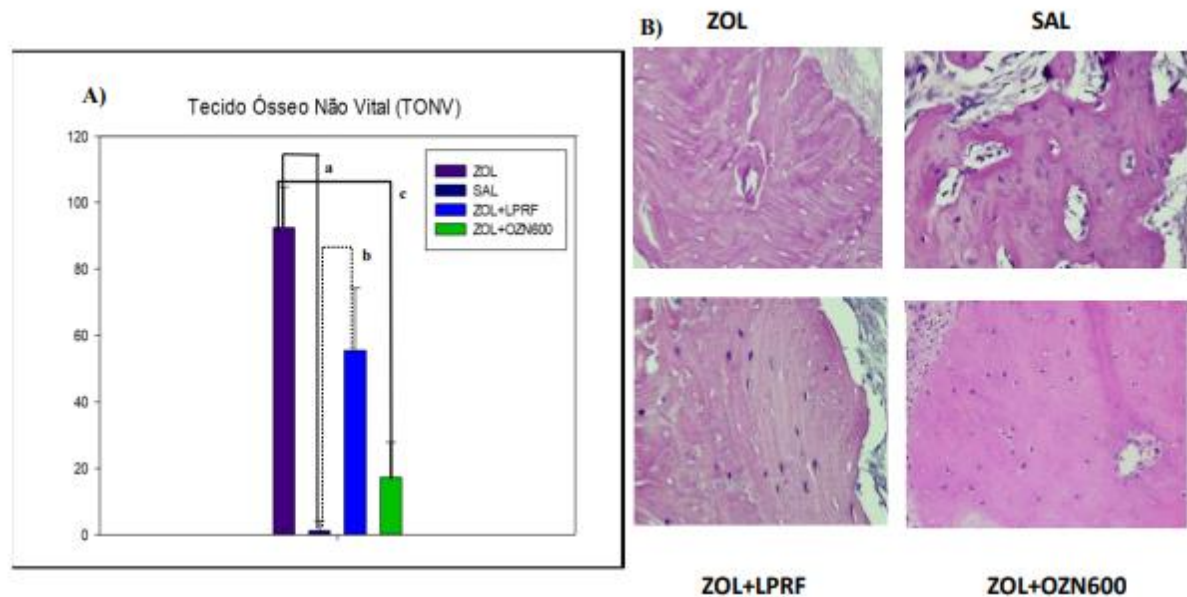
**Figura 13– Figuras representativas da análise histométrica de área óssea neoformada (AON). (A) Representações gráficas dos valores de AON .(B)Fotomicrografias das regiões de neoformação óssea de acordo com os tratamentos. Letras minúsculas representam a diferença estatística entre os grupos (a; b).**



Fonte:Elaborado pelo autor (2024)

A análise histológica possibilitou estimar o percentual de tecido ósseo não vital (TONV), cujos resultados demonstram que no grupo tratado com ZOL, tanto em áreas adjacentes como no interior do alvéolo remanescente, concentraram-se as mais elevadas taxas de osso desvitalizado comparado a todos os grupos testados, expressando quase 100%, ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, comparado ao grupo ZOL, nos grupos tratados com ZOL+LPRF ( $p > 0,5$ ) e ozonioterapia ( $p < 0,5$ ), observaram-se significativas áreas de tecido ósseo saudável, com áreas necróticas com taxas entre 55% e 17%, respectivamente (Figura 14-A). Nos locais de extração dentária e em áreas próximas, notaram-se lacunas ocupadas por osteócitos e densas trabéculas ósseas neoformadas, juntamente com tecido conjuntivo. Dessa forma, na avaliação qualitativa entre os grupos, o grupo SAL demonstrou as maiores áreas de tecido ósseo saudável ( $p < 0,5$ ), seguido pelos grupos ZOL+OZN600 e ZOL+LPRF (Figura 14-B).

**Figura 14–** Figuras representativas da análise histométrica de área de tecido ósseo não vital (TONV). (A) Valores gráficos em porcentagem da TONV B) Fotomicrografias das regiões de área óssea não vital de acordo com os tratamentos. Letras minúsculas representam a diferença estatística entre os grupos (a; b;c).



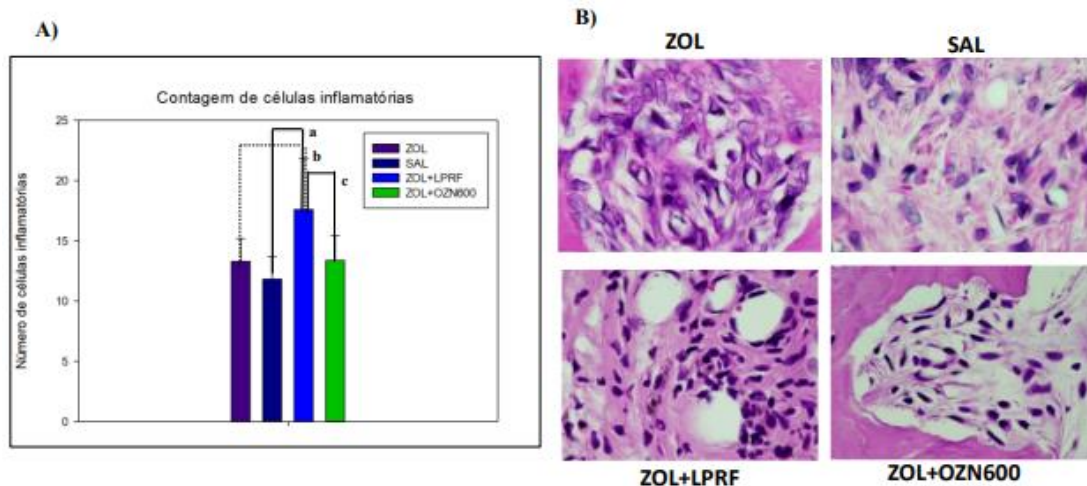
Fonte:Elaborado pelo autor (2024)

### 3.3.2 Análise histológica

No que concerne ao perfil inflamatório, a análise teve como foco a contagem de linfócitos e vasos sanguíneos. O grupo tratado com ZOL+LPRF(p0,05) (Figura 15-A).

**Figura 15–** Figuras representativas da análise histológica de células inflamatórias. (A) Valores de células inflamatórias. (B) Fotomicrografias das células inflamatórias de acordo com os tratamentos. Letras minúsculas representam a diferença estatística entre os grupos (a; b;c).

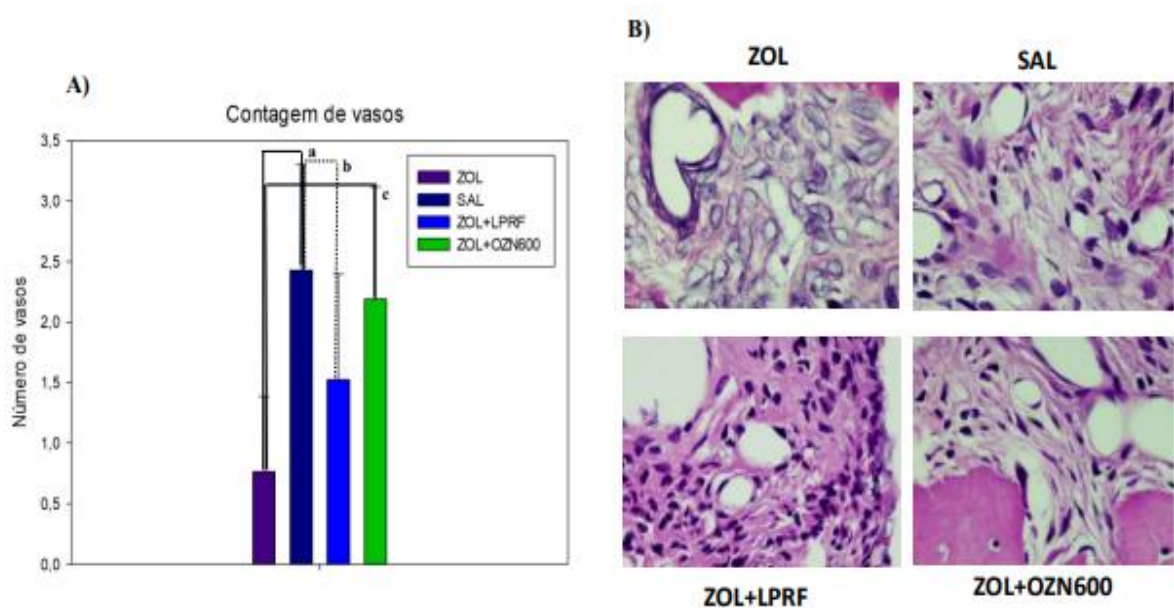




Fonte:Elaborado pelo autor (2024)

Com relação à contagem dos vasos sanguíneos, quantificou-se maior presença destes nas amostras providas do SAL ( $p < 0,05$ ) comparado a ZOL e ZOL+LPRF. Seguido ainda do grupo ZOL+LPRF ( $p > 0,05$ ) em comparação ao ZOL (Figura 16).

**Figura 16– Figuras representativas da análise histológica de vasos sanguíneos. (A) Representação gráfica do número de vasos sanguíneos. (B) Fotomicrografias dos vasos sanguíneo presentes de acordo com os tratamentos. Letras minúsculas representam a diferença estatística entres os grupos (a; b;c).**

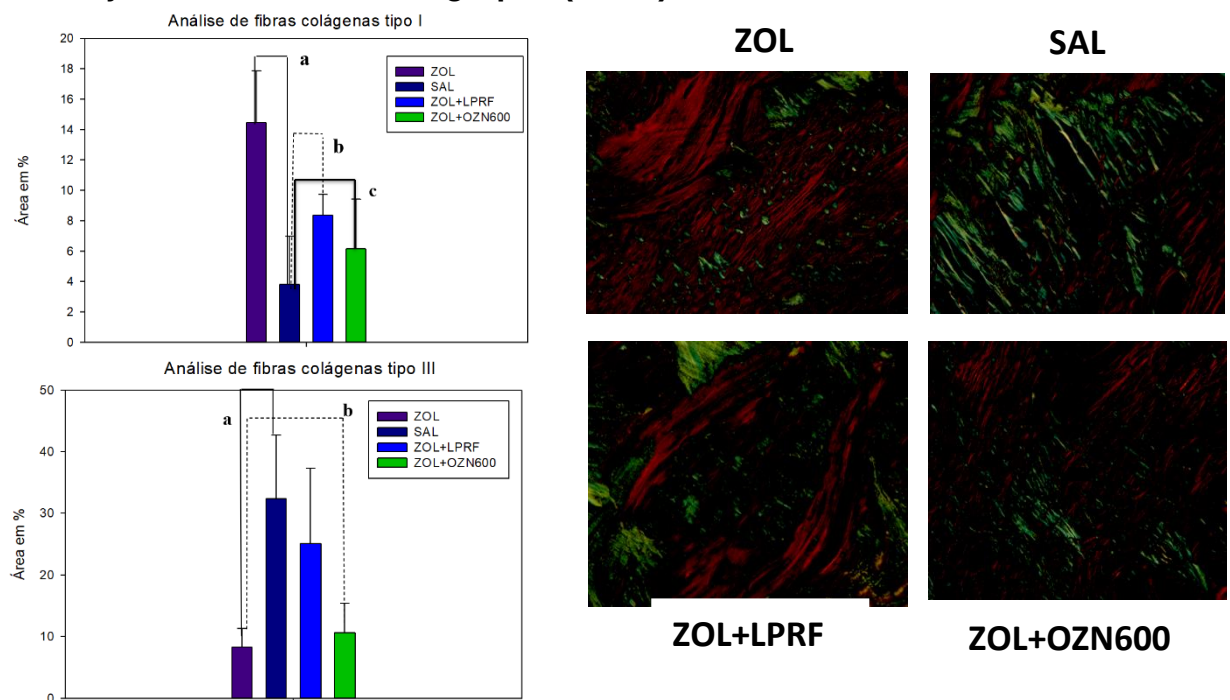


Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

### 3.3.3 Análise Picrosirius Red (PSR)

Com relação a quantidade de fibras colágenas do tipo I e III, observou-se contagem superior de fibras colágenas do tipo I para todos os grupos que utilizaram ZOL, seja isolado ou associado ao composto plaquetário e ozônio terapia, comparativamente ao grupo SAL ( $p < 0,05$ ) (Figura 17-A). Consequentemente, o grupo SAL teve maior quantidade de fibras colágenas do tipo III polarizadas em comparação aos grupos ZOL, ZOL+OZN600 ( $p < 0,05$ ). Seguidamente o grupo ZOL+LPRF apresentou maiores áreas dessas fibras comparados aos grupos ZOL+OZN e ZOL ( $p > 0,05$ ). Nessa mesma perspectiva, o grupo ZOL+OZN demonstrou maior quantidade de fibras colágenas do tipo III que o grupo ZOL ( $p > 0,05$ ) (Figura 17-B). As fotomicrografias condizem com a realidade, nas quais são observadas maiores regiões polarizadas em vermelho, representando as fibras colágenas do tipo I, nos grupos que utilizaram o zoledronato, assim como maior polarização de fibras colágenas do tipo III, marcações esverdeadas para o grupo SAL (Figura 17-C).

**Figura 17–** Imagens representativas da análise das fibras colágenas I e III em PSR. (A) Representação gráfica das fibras colágenas tipo I. (B) Representação gráfica das fibras colágenas tipo III (C) Fotomicrografias das fibras colágenas presentes de acordo com os tratamentos. Letras minúsculas representam a diferença estatística entre os grupos (a; b;c).



## 4 DISCUSSÃO

Descrita pela primeira vez há duas décadas, a etiologia da MRONJ permanece ainda não totalmente elucidada, sugerindo que a condição possa ser resultado de diversos fatores [2]. Da mesma forma, não existem protocolos estabelecidos para o tratamento das lesões da MRONJ, o que a caracteriza como um desafio médico-odontológico [2,42]. Estudos sugerem que o uso de terapias adjuvantes ao tratamento cirúrgico pode oferecer vantagens em comparação com terapias cirúrgicas isoladas [42]. Nesse contexto, os desfechos deste estudo *in vivo* permitiram uma avaliação comparativa entre o L-PRF e o óleo ozonizado como terapias adjuvantes para o tratamento e prevenção da MRONJ e que demonstraram potencialidade no que tange à manutenção da vitalidade do osso reparacional.

Certamente, além do uso, a duração da terapia com antirreabsortivos emerge como um fator de risco significativo para o desenvolvimento de MRONJ, acrescentando-se assim um fator à sua etiopatogenia multifatorial [42, 43]. Isso ocorre devido à afinidade dos grupos fosfato pela hidroxiapatita, um componente principal da matriz óssea, o que facilita a sua ligação e subsequente ação nos osteoclastos. Após sua liberação da matriz inorgânica óssea, o fármaco é absorvido pelos osteoclastos, inibindo a enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPsintase), o que acarreta alterações no citoesqueleto dessas células, prejudicando a sua atividade, além de aumentar o potencial de apoptose celular, induzindo a prejuízos do turnover ósseo (2, 3, 5).

Toro et al (2019) [44] avaliou as características reparacionais do tecido ósseo em modelo experimental animal medicado com doses oncológicas de zoledronato e concluiu que o uso do fármaco não afetou negativamente a quantidade de tecido ósseo neoformado, mas ocasionou o surgimento de extensas áreas de tecido ósseo não vital. Evidencia-se isso através dos resultados referentes aos parâmetros quantitativos de tecido ósseo neoformado deste trabalho, nos quais é possível observar maiores quantidades teciduais para os grupos que utilizaram o protocolo de zoledronato, tanto nas análises de tecidos calcificados quanto descalcificados. Tais resultados suscitam achados de estudos pregressos nos quais o zoledronato foi capaz de induzir a osteogênese ao influenciar a expressão de reguladores da transcrição de osteoblastos, como a proteína morfogenética BMP-2, Runx2, osterix, além do aumento da expressão gênica de p21 e MC3T3-E1 importantes precursores da



diferenciação osteogênica [46].

Como supramencionado, a literatura defende que os mecanismos fisiopatológicos que podem levar ao desenvolvimento da MRONJ frente ao uso dos bisofosfonatos são multifatoriais, compreendendo a própria remodelação óssea prejudicada, a inibição da angiogênese, as disfunções imunes, a direta toxicidade destas drogas e sua alta especificidade por sítios ósseos que demandam maiores taxas de remodelação [2, 4, 43]. Tais perspectivas associadas ao principal fator de risco que se configura pela cirurgia/trauma dentoalveolar podem levar ao desenvolvimento da patologia. [3,5,9,43]. Os resultados do presente estudo corroboram com tais assertivas, dado que nos parâmetros qualitativos do tecido ósseo foi observado áreas de necrose tecidual tanto na região do alvéolo quanto em regiões adjacentes dos grupos que utilizaram o protocolo de zoledronato.

Com relação aos prejuízos na angiogênese, a ação desta droga sobre a alteração da vascularização e hipóxia, e a subsequente atenuação das cascatas de sinalização associadas com neoangiogênese e resposta inflamatória, levam a redução de fator de crescimento vascular endotelial tipo A e angiogenina-1, conhecidos reguladores de angiogênese e que no ambiente ósseo pós-exodôntico suprimem a angiogênese, levando a defeitos na microvasculatura [45]. Em suma, os efeitos dos bifosfonatos sobre as células endoteliais englobam uma redução na viabilidade celular, na migração celular e na angiogênese, além de um aumento no apoptose celular. Esses efeitos culminam em uma menor vascularização tanto do osso quanto do tecido circundante, o que, por fim, contribui para o desenvolvimento de MRONJ [43]. Essa perspectiva é evidente nos resultados do presente estudo, tanto em razão da baixa quantificação de vasos sanguíneos presentes no tecido conjuntivo adjacente às áreas de neoformação óssea, bem como nos resultados referentes ao tecido ósseo não vital, sobretudo, no grupo tratado com zoledronato isoladamente.

O ozônio medicinal possui excelentes propriedades químicas derivadas de sua capacidade de ativação do metabolismo celular, efeito antimicrobiano, propriedades antioxidantes e capacidade de bioestimulação [35]. No que concerne à sua aplicabilidade em solução oleosa no tratamento de lesões proveniente de MRONJ, Ripamonti (2011) [17] destacou sua potencialidade, considerando-o como um recurso terapêutico promissor, eficaz, seguro e de fácil aplicação.

Notoriamente, a ozonioterapia possui capacidade de melhorar a oferta de O<sub>2</sub> tecidual por meio de ação hemorreológica, vasodilatação e estimulação da angiogênese, em virtude do estresse oxidativo acentuado, aumentando a liberação de oxigênio pelos glóbulos vermelhos, estimulando a taxa de glicólise, produção de ATP e o ciclo de Krebs. Como resultado, ocorre um aumento na concentração de glóbulos vermelhos e na taxa de hemoglobina, diapedese e fagocitose e adicionalmente, auxilia na produção de prostaciclina, culminando na melhora da vascularização [48]. Tais propriedades são de grande valia em microambientes com diminuição da concentração de oxigênio, como é o caso de MRONJ, no qual os tecidos não conseguem atender adequadamente às demandas necessárias para que o processo de reparo ocorra, devido a supressão vascular. Incontestadamente, os melhoramentos acerca da angiogênese e vascularização tornaram-se evidentes nos resultados deste trabalho acerca da contagem de vasos sanguíneos no tecido conjuntivo, nos quais o grupo que utilizou o protocolo de ozonioterapia demonstrou um aumento significativo da quantificação de vasos contrastado com os demais grupos, o que pode contribuir significativamente para as variáveis referentes à vitalidade óssea das regiões de osso neoformado.

Nas análises dos resultados deste estudo notou-se a preservação do tecido alveolar e significativa manutenção da vitalidade tecidual, visto que foram identificadas extensas áreas com lacunas preenchidas por osteócitos. Esses dados corroboram com os achados de Monteiro (2021) [23] cujo estudo revelou resultados promissores para a terapia com ozônio, administrada na forma de óleo ozonizado, em protocolo similar ao do presente estudo, na prevenção do desenvolvimento de lesões osteonecróticas após extrações dentárias em animais previamente submetidos a um protocolo de indução de doença, conferindo tais resultados à capacidade de geração de fatores de crescimento e ativação de mecanismos de ação antioxidante promoção do reparo tecidual.

Os compostos plaquetários são produtos autólogos, portanto, provindos do próprio indivíduo, e possuem altas concentrações de diferentes fatores de crescimento secretados por plaquetas [39, 49]. Estes concentrados podem promover a cicatrização tecidual e a regeneração óssea e, por conseguinte, tem grande aplicabilidade em diversas áreas da medicina, sendo utilizado no campo oral e maxilofacial há mais de 20 anos, e em 2007 utilizados pela primeira vez na MRONJ [49]. Existem quatro

subtipos de concentrados de plaquetas classificados por suas propriedades de fibrina e células: plasma puro rico em plaquetas (P-PRP), plasma rico em leucócitos e plaquetas (L-PRP), fibrina pura rica em plaquetas (P-PRF) e fibrina rica em leucócitos e plaquetas (L-PRF) [42].

O L-PRF não apenas atua como uma estrutura tridimensional de fibrina, mas também contém numerosas células autólogas, como plaquetas, macrófagos e neutrófilos. Os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas incluem o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), o fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), e parecem persistir por pelo menos 14 dias devido a uma polimerização lenta e natural durante a centrifugação. [49,50] Nesse sentido, tem a capacidade de promover a neoangiogênese e a homeostase inflamatória, além de estimular a produção de colágeno [50]. Conhecidamente, as lesões de MRONJ estão associadas clinicamente à exposição do tecido ósseo desvitalizado devido à falta de epiteliação, o que predispõe à colonização por populações microbianas. Nessa perspectiva, a L-PRF pode se caracterizar como recurso de prevenção ou tratamento, em vista de suas numerosas células imonológicas, que podem inibir quadros infecciosos [49].

Através dos resultados obtidos, observou-se que as ações bioestimulatórias, imunomoduladoras e antimicrobianas intrínsecas ao L-PRF possibilitou que o grupo teste que recebera a aposição do composto plaquetário sobre o alvéolo pós-exodôntico apresentasse favorável manutenção da vitalidade do osso reparacional, mesmo que inferior ao grupo tratado com a suspensão oleosa de ozônio. Os achados contribuem com aqueles suscitados por Sh (2023) [51] que observou melhora significativa na prevenção de fatores complicadores relacionado ao uso dos bisfosfonatos, como a manifestação clínica da MRONJ e que, no entanto, concluiu que histologicamente havia grandes áreas de tecido desvitalizado, questionando a completa efetividade na prevenção da condição. Jamalpour (2022) [50] por sua vez, evidencia melhoras em aspectos histológicos e clínicos para os grupos tratados com compostos plaquetários, inclusive apresentando resultados superiores com relação à vitalidade óssea ao confrontá-los com terapias isoladas como a fotobiomodulação.

Comparativamente, ambas as terapias empregadas nos grupos testes

apresentaram perspectivas promissoras na prevenção e tratamento da MRONJ. Embora em ambos os tratamentos não tenha sido possível anular completamente as áreas de tecido ósseo não vital, dado a limitante característica que o zoledronato promove sobre a biologia óssea, verificou-se significativa diminuição dessas regiões necróticas nos parâmetros histológicos, com superioridade para o grupo tratado com ozonioterapia. Demonstrou-se em ambos os tratamentos uma melhora relevante dos aspectos clínicos analisados, possivelmente relacionadas às suas propriedades no que concerne a angiogênese, imunomodulação e liberação de fatores de crescimento suprarreferidos. Nesse cenário, devido aos vantajosos desfechos provindos das abordagens propostas, estimulam-se estudos futuros que inclusive busquem verificar o desempenho destas terapias sobre os tecidos moles que são cruciais para a resolução clínica da MRONJ, além de pesquisas que utilizem concomitante estes recursos terapêuticos, a fim de investigar possíveis ações sinérgicas entre as terapias, já que ambos os protocolos são referidos com baixo custos, seguros e alta aceitabilidade [35,49].

Algumas limitações deste estudo necessitam ser salientadas. Primeiramente, sua natureza pré-clínica impossibilita uma extrapolação direta para o contexto humano. Uma das principais limitações está relacionada à dificuldade em determinar o tempo de manutenção do óleo ozonizado no alvéolo para que seus efeitos propostos sejam maximizados. Ainda que um protocolo de dois minutos foi estabelecido não se sabe efetivamente quanto tempo a solução permaneceu na região exercendo sua ação bioestimulatória e imunomoduladora. Com relação às limitações do protocolo do L-PRF, aponta-se que o período da coleta das amostras, ultrapassa o conhecido período de manutenção e liberação dos efeitos promovidos pelo composto plaquetário em questão. Ademais, ressalta-se que, devido às limitações do modelo experimental animal, a L-PRF foi obtida através da centrifugação sanguínea de outro animal doador, configurando um método de coleta homólogo. Essa abordagem difere do protocolo padrão para sua obtenção, que consiste na coleta autógena, o que pode ter influenciado o seu potencial reparacional no tecido ósseo.

## **5 CONCLUSÕES**

Em decorrência do exposto, pode-se inferir que o uso do L-PRF e da ozonioterapia em suspensão de óleo podem ser empregues para prevenção de MRONJ, diante dos promissores resultados ao otimizar a qualidade tecidual óssea reparacional, viabilizando a manutenção da vitalidade e a osteogênese. Este trabalho fundamenta novos estudos clínicos com ênfase na segurança das suas aplicações e entendimento que as terapias locais tem potencial de contribuir de forma efetiva no reparo alveolar pós-exodôntico.

## REFERÊNCIAS

1. Andrade JM, Andrade FCD, Oliveira EJP, Duarte YAO, Andrade FB. Life expectancy with poor health- related quality of life among Brazilian older adults. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2021; 94:104346.
2. 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 Jaw–2022 Update. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2022.
3. Statkiewicz C., Toro L. F., de Mello-Neto, J. M., de Sá, D. P., Casatti, C. A., Issa, J. P. M., ... Ervolino, E. (2018). 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*, 184, 7–17.
4. Gupta M, Gupta N. Bisphosphonate Related Jaw Osteonecrosis. 2022 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
5. Tella, S. H., & Gallagher, J. C. (2014). Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 142, 155–170.
6. Lazăr AC, Socaciu R, Mureșan O, Păcurar M. Retrospective study regarding the appearance of osteonecrosis related to bisphosphonate therapy. *Rom J Morphol Embryol*. 2019;60(4):1227-1231.
7. Soma T, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kaneko Y, et al. Tooth extraction in mice administered zoledronate increases inflammatory cytokine levels and promotes osteonecrosis of the jaw. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2021;39(3):372-84.
8. Gómez Font R, Martínez García ML, Olmos Martínez JM. Osteonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments: update. 2008.
9. Aljohani S, Fliefel R, Ihbe J, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. What is the effect of anti-resorptive drugs (ARDs) on the development of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in osteoporosis patients: A systematic review. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2017;45(9):1493-502.
10. Marx RE, Cillo Jr JE, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2007;65(12):2397-410.
11. Otto S, Schnoedt EM, Haidari S, Brunner TF, Aljohani S, Mosleh M, et al. Autofluorescence-guided surgery for the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): a retrospective single-center study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2021;131(5):519-26.
12. Toker H. The effects of allograft combined with ozone therapy on regeneration of calvarial defects in rats. *Cumhuriyet Dental Journal*. 2017;19(3):205-13.
13. Ervolino E, Statkiewicz 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.
14. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of medical research*. 2006;37(4):425-35.
15. Heifetz-Li JJ, Abdelsamie S, Campbell CB, Roth S, Fielding AF, Mulligan JP. Systematic

review of the use of pentoxifylline and tocopherol for the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2019;128(5):491-7. e2.

16. Momesso GAC, Lemos CAA, Santiago-Júnior JF, Faverani LP, Pellizzer EP. Laser surgery in management of medication-related osteonecrosis of the jaws: a meta-analysis. *Oral and maxillofacial surgery*. 2020;24(2):133-44.

17. Ripamonti CI, Cislighi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O<sub>3</sub>) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: Preliminary results of a phase I–II study. *Oral oncology*. 2011;47(3):185-90.

18. Aghaloo T, Hazboun R, Tetradis S. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaws. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics*. 2015;27(4):489-96.

19. Song M, Alshaikh A, Kim T, Kim S, Dang M, Mehrazarin S, et al. Preexisting periapical inflammatory condition exacerbates tooth extraction-induced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw lesions in mice. *Journal of endodontics*. 2016;42(11):1641-6.

20. Thumbigere-Math V, Michalowicz BS, Hodges JS, Tsai ML, Swenson KK, Rockwell L, et al. Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of periodontology*. 2014;85(2):226-33.

21. Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M, Bassorgun I, Ozler M, Oter S, et al. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2014;43(6):777-83.

22. Kan B, Sencimen M, Bayar GR, Korkusuz P, Coskun AT, Korkmaz A, et al. Histomorphometric and microtomographic evaluation of the effects of hyperbaric oxygen and systemic ozone, used alone and in combination, on calvarial defect healing in rats. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2015;73(6):1231. e1-. e10.

23. Monteiro C, Vieira E, Emerick C, Azevedo R, Pascoal V, Homsí N, et al. Ozonated oil effect for prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in rats undergoing zoledronic acid therapy. *Clinical Oral Investigations*. 2021;25(12):6653-9.

24. Fortunato L, Bennardo F, Buffone C, Giudice A. Is the application of platelet concentrates effective in the prevention and treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw? A systematic review. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2020;48(3):268-85.

25. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e56-e60.

26. Kim J-W, Kim S-J, Kim M-R. Leucocyte-rich and platelet-rich fibrin for the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a prospective feasibility study. *British journal of oral and maxillofacial surgery*. 2014;52(9):854-9.

27. Gönen ZB, Yılmaz Asan C. Treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw using platelet-rich fibrin. *Cranio®*. 2017;35(5):332-6.

28. Rusilas H, Balčiūnaitė A, Žilinskas J. Autologous platelet concentrates in treatment of medication related osteonecrosis of the jaw. *Stomatologija*. 2020;22(1):23.

29. Szentpeteri S, Schmidt L, Restar L, Csaki G, Szabo G, Vaszilko M. The effect of platelet-rich fibrin membrane in surgical therapy of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2020;78(5):738-48.

30. Steller D, Herbst N, Pries R, Juhl D, Hakim SG. Positive impact of Platelet-rich plasma and Platelet-rich fibrin on viability, migration and proliferation of osteoblasts and fibroblasts treated with zoledronic acid. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-11.
31. MacKay JW, Murray PJ, Kasmai B, Johnson G, Donell ST, Toms AP. Subchondral bone in osteoarthritis: association between MRI texture analysis and histomorphometry. *Osteoarthritis and cartilage*. 2017;25(5):700-7.
32. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2020;40(9):1769-77.
33. 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. *Bioscience reports*. 2017;37(6).
34. Awadeen MA, Al-Belasy FA, Ameen LE, Helal ME, Grawish ME. Early therapeutic effect of platelet- rich fibrin combined with allogeneic bone marrow-derived stem cells on rats' critical-sized mandibular defects. *World Journal of Stem Cells*. 2020;x'12(1):55.
35. Lim Y, Lee H, Woodby B, Valacchi G. Ozonated oils and cutaneous wound healing. *Current Pharmaceutical Design*. 2019;25(20):2264-78.
36. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of bone and mineral research*. 2010;25(7):1468-86.
37. Benetti F, Briso A, de Araújo Lopes J, Carminatti M, Conti L, Gallinari M, et al. In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45-cells in the pulp of bleached teeth. *International endodontic journal*. 2019;52(12):1723-37.
38. Cintra LTA, Benetti F, Ferreira LL, Rahal V, Ervolino E, Jacinto RdC, et al. [Article Retraction] Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. *Journal of Applied Oral Science*. 2016;24:171-80.
39. Cano-Duran J, Pena-Cardelles J, Ortega-Concepcion D, Paredes-Rodriguez V, Garcia-Riart M, Lopez- Quiles J. The role of Leucocyte-rich and platelet-rich fibrin (L-PRF) in the treatment of the medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2017;9(8):e1051-9.
40. Bigueti CC, De Oliva AH, Healy K, Mahmoud RH, Custódio IDC, Constantino DH, Ervolino E, Duarte MAH, Fakhouri WD, Matsumoto MA. 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 Jun 14;14(6):e0214173.
41. Grecu AF, Grecu DC, Nica O, Ciuca EM, Camen A, Ciurea ME. A Novel Method of Obtaining Platelet Rich Fibrin from Rats and Quantifying Platelet Count. *Curr Health Sci J*. 2019 Jan-Mar;45(1):104-110.
42. Tenore, G., Zimbalatti, A., Rocchetti, F., Graniero, F., Gaglioti, D., Mohsen, A., Caputo, M., Lollobrigida, M., Lamazza, L., De Biase, A., Barbato, E., & Romeo, U. (2020). Management of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) using leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) and photobiomodulation: A retrospective study. *Journal of Clinical Medicine*, 9(11), 3505. <https://doi.org/10.3390/jcm9113505>
43. Nogueira, D., Caldas, I. M., & Dinis-Oliveira, R. J. (2023). Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: Clinical and forensic aspects. *Archives of Oral Biology*, 155(105792),



105792. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2023.105792>

44. Toro, L. F. (2019). Avaliação do processo de reparo peri-implantar em ratas tratadas com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato [Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP]. <http://hdl.handle.net/11449/181160>
45. Gkouveris, I., Hadaya, D., Soundia, A., Bezouglaia, O., Chau, Y., Dry, S. M., Pirih, F. Q., Aghaloo, T. L., & Tetradis, S. (2019). Vasculature submucosal changes at early stages of osteonecrosis of the jaw (ONJ). *Bone*, 123, 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.03.031>
46. Zhang, Y., Jia, S., Wen, G., Xie, S., Song, Z., Qi, M., Liang, Y., Bi, W., & Dong, W. (2023). Zoledronate promotes Peri-implant osteogenesis in diabetic osteoporosis by the AMPK pathway. *Calcified Tissue International*, 113(3), 329–343. <https://doi.org/10.1007/s00223-023-01112-0>
47. Srivichit, B., Thonusin, C., Chattipakorn, N. et al. Impacts of bisphosphonates on the bone and its surrounding tissues: mechanistic insights into medication-related osteonecrosis of the jaw. *Arch Toxicol* 96, 1227–1255 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03220-y>
48. Di Fede, O.; Del Gaizo, C.; Panzarella, V.; La Mantia, G.; Tozzo, P.; Di Grigoli, A.; Lo Casto, A.; Mauceri, R.; Campisi, G. Ozone Infiltration for Osteonecrosis of the Jaw Therapy: A Case Series. *J. Clin. Med.* 2022, 11, 5307. <https://doi.org/10.3390/jcm11185307>
49. Parise, G. K., Costa, B. N., Nogueira, M. L., Sassi, L. M., & Schussel, J. L. (2022). Efficacy of fibrin-rich platelets and leukocytes (L-PRF) in tissue repair in surgical oral procedures in patients using zoledronic acid—case—control study. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 27(3), 507–512. <https://doi.org/10.1007/s10006-022-01094-7>
50. Jamalpour, M. R., Shahabi, S., Baghestani, M., Shokri, A., Jamshidi, S., & Khazaei, S. (2022). Complementarity of surgical therapy, photobiomodulation, A-PRF and L-PRF for management of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): an animal study. *BMC Oral Health*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02275-2>