

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 19/05/2028



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

ANA MAIRA PEREIRA BAGGIO

**INFLUÊNCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO E DE AGENTES
TÓPICOS ANTIMICROBIANOS NA PREVENÇÃO DA
OSTEONECROSE DOS MAXILARES RELACIONADA A
MEDICAMENTOS (MRONJ): ESTUDO PRÉ-CLÍNICO EM
RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**Araçatuba - SP
2026**

ANA MAIRA PEREIRA BAGGIO

**INFLUÊNCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO E DE AGENTES
TÓPICOS ANTIMICROBIANOS NA PREVENÇÃO DA
OSTEONECROSE DOS MAXILARES RELACIONADA A
MEDICAMENTOS (MRONJ): ESTUDO PRÉ-CLÍNICO EM
RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi

**Araçatuba - SP
2026**

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B144i	Baggio, Ana Maira Pereira. Influência da fotobiomodulação e de agentes tópicos antimicrobianos na prevenção da osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos (MRONJ): estudo pré-clínico em ratas ovariectomizadas / Ana Maira Pereira Baggio. – Araçatuba, 2026 90 f. : il. ; tab. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba Orientadora: Profa. Ana Paula Farnezi Bassi 1. Osteonecrose 2. Mandíbula 3. Regeneração óssea 4. Terapia com luz de baixa intensidade 5. Anti-infecciosos I. T. Black D7 CDD 617.64
-------	---

“Dedico este trabalho aos meus pais, cujo orgulho e incentivo sempre me acompanharam. Sua alegria por cada conquista minha foi um apoio silencioso e constante ao longo desta trajetória.”

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA UNESP**, na pessoa do seu atual diretor, Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem, por disponibilizar infraestrutura de excelência e todos os recursos necessários que possibilitaram minha formação acadêmica, desde a graduação até a pós-graduação. Permanecer nesta instituição, responsável por toda a minha trajetória, é motivo de grande orgulho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA UNESP**, na pessoa de sua atual coordenadora, Prof.^a Ass. Roberta Okamoto, pelo suporte institucional e pela condução comprometida do programa.

À **Seção Técnica de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA UNESP**, pelos esforços contínuos e pela organização, fundamentais para a concretização desta etapa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao **Programa Institucional de Internacionalização CAPES-PrInt** – Processo nº 88887.894710/2023-00, que viabilizou parte desta formação em âmbito internacional.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, na pessoa do atual vice coordenador do programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA UNESP, Prof. Ass. André Luiz Fraga Briso, pela concessão de bolsa de pesquisa - Processo n.º 141959/2025-8.

Ao **Massachusetts General Hospital (MGH)** e à **Harvard School of Dental Medicine (HSDM)**, pela oportunidade de realização de parte desta pesquisa em um ambiente de excelência científica, contribuindo de forma significativa para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao **Department of Oral and Maxillofacial Surgery do Skeletal Biology Research Center**, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Fernando Pozzi Semengui Guastaldi, pelo acolhimento, suporte científico e pelas valiosas contribuições ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos os **professores** do departamento de Diagnóstico e Cirurgia, pelos ensinamentos, convivência durante todos esses anos e contribuição para minha formação.

Aos **funcionários** do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, pelo auxílio técnico e pela dedicação no processamento laboratorial deste e de outros trabalhos.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA UNESP, pela atenção, disponibilidade e suporte oferecidos ao longo desta trajetória.

Aos **animais**, *in memoriam*, que contribuíram para o avanço da ciência. O presente trabalho foi realizado com respeito e responsabilidade ética, reconhecendo a importância de sua contribuição.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ser meu alicerce em todos os momentos, por me sustentar nos dias difíceis e por iluminar cada etapa desta trajetória.

Aos meus pais, **João Batista Baggio** e **Maria Lúcia Pereira Baggio**, por serem a base de tudo o que sou. Não existem palavras suficientes para expressar a minha gratidão por todo o amor, cuidado e renúncias ao longo da vida, sempre para que eu pudesse sonhar mais alto e chegar até aqui. Obrigada por nunca medirem esforços pela minha felicidade, por acreditarem em mim e por sempre colocarem minha educação como prioridade. Os valores, princípios e ensinamentos que me transmitiram foram fundamentais em cada etapa da minha trajetória. Esta conquista também é de vocês.

Ao meu irmão, **João Pedro Pereira Baggio**, por ser meu apoio constante, meu melhor amigo e um dos maiores incentivadores. Obrigada por estar sempre ao meu lado, por acreditar em mim e torcer, de forma tão genuína, pela minha felicidade e sucesso.

À toda minha **família**, por todo amor, apoio e incentivo ao longo desta caminhada. Por estarem presentes nos momentos mais importantes e por serem meu suporte nos períodos de maior desafio. Sou profundamente grata por ter uma base familiar tão sólida e acolhedora.

Ao meu noivo, **Rodrigo Capalbo**, por ser meu companheiro de vida e de jornada. Obrigada pelo apoio incondicional, pela compreensão das minhas escolhas, pelo cuidado e carinho diários e por estar ao meu lado em cada etapa deste processo. É um privilégio dividir a vida com você. Obrigada por tudo que você é para mim e pela vida que estamos construindo juntos.

A todos os meus **amigos**, que, mesmo com os diferentes caminhos que a vida nos levou, permanecem presentes de forma sincera e especial. Obrigada por compartilharem comigo momentos importantes e por torcerem pelas minhas conquistas.

Aos **amigos** que a **pós-graduação** me proporcionou, com quem dividi desafios, aprendizados e conquistas. Obrigada pelo companheirismo, pelo apoio mútuo e por tornarem essa trajetória mais leve e significativa.

À **Izabela Fornazari Delamura**, colega de pós-graduação que se tornou amiga de todas as horas, e responsável direta pela concretização desse e de outros trabalhos. Obrigada

por ser exemplo de determinação, pelo companheirismo e troca diários. Por incentivar, ouvir e acolher sempre que preciso. A pós-graduação não teria sido a mesma sem você.

À **Stefany Barbosa Alves da Cruz**, minha amiga de graduação e pós-graduação, com quem aprendi e cresci muito. Obrigada por sempre incentivar, apoiar e torcer pelo meu sucesso tanto quanto torço pelo seu.

Ao **Dr. Vinícius Ferreira Bizelli**, meu colega de pós-graduação, mas que foi um verdadeiro professor para mim e minha maior inspiração dentro da pós. Obrigada pela paciência e maestria com que me ensinou durante esses anos, e pela amizade que construímos fora do ambiente acadêmico.

À minha orientadora, **Prof^a. Dr.^a Ana Paula Farnezi Bassi**, por ter transformado a minha trajetória ao me conceder, ainda no início da graduação, a oportunidade de ingressar na pesquisa. Ao longo destes oito anos de convivência, sou profundamente grata por toda a orientação, apoio, paciência e confiança depositada em mim. Agradeço por cada ensinamento compartilhado, por todas as oportunidades proporcionadas e, principalmente, por ter acreditado no meu potencial mesmo nos momentos em que eu mesma duvidei. Ser escolhida como sua primeira orientada a vivenciar uma experiência no exterior foi, sem dúvida, um dos marcos mais significativos da minha formação, e levo comigo esse gesto com imensa gratidão. Sua orientação foi essencial para que este trabalho se tornasse realidade e para a construção de quem sou hoje. Serei eternamente grata por tudo.

Ao meu orientador no exterior, **Prof. Dr. Fernando Pozzi Semengui Guastaldi**, pelo acolhimento em seu laboratório e pela confiança depositada em mim desde o início da minha experiência em Boston. Agradeço pelos ensinamentos compartilhados, pela disponibilidade em ensinar diariamente e pelas valiosas oportunidades proporcionadas, que contribuíram de forma significativa para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Sua dedicação à pesquisa e sua postura como orientador o tornam um exemplo que levarei comigo ao longo da minha trajetória. Essa vivência foi extremamente enriquecedora e transformadora, e será sempre lembrada com muito carinho.

Ao **Prof. Dr. Edilson Ervolino**, por prontamente aceitar compor a banca avaliadora deste trabalho e pelo valioso auxílio na execução da metodologia. Sua generosidade e entusiasmo em ensinar pesquisa são evidentes e verdadeiramente inspiradores.

À **Profª. Dr.ª Daniela Ponzoni**, por integrar a banca avaliadora deste e de outros trabalhos apresentados por mim, acompanhando de perto e contribuindo em etapas importantes da minha trajetória, desde a graduação até a pós-graduação. Sou muito grata por todos os ensinamentos, que sigo levando comigo.

À **Profª. Dr.ª Mariana Aparecida Brozski**, por sua participação na banca avaliadora deste trabalho e pela disponibilidade em contribuir com este momento importante. Sua postura ética, competência profissional e dedicação ao ensino a tornam uma referência admirável como cirurgiã e professora.

Ao **Prof. Dr. Youssef Jounaidi**, pela colaboração fundamental na análise molecular deste trabalho, por abrir as portas do seu laboratório no MGH, sempre muito solícito e paciente.

Ao **Yannick Sillmann e Pascal Eber**, meus colegas de laboratório no MGH, que foram essenciais para a obtenção dos resultados deste trabalho e pelo sucesso de outros. Por me acolherem com muito carinho e respeito, por toda ajuda e por se tornarem tão especiais. Pelos momentos vividos juntos dentro e fora do hospital e pela amizade construída. Estarei sempre na torcida pelo sucesso de vocês.

À **Helena Tattersfield**, do Department of Anesthesia, Critical Care and Pain Medicine (MGH) pela generosidade e toda ajuda com a análise de qRT-PCR deste trabalho.

A todos os alunos do nosso grupo de pesquisa, de iniciação científica ou pós-graduação, pela convivência, troca de conhecimentos e contribuição no desenvolvimento desse e outros trabalhos. Em especial ao **Arthur Alécio Henrique Viotto, Douglas Biagi Sadrac Ferreira, Marco Picolini, Francieli Flores, Melissa Koto Murai, Luana Ferreira Oliveira e Juliana Mazzini**.

Aos professores da pós-graduação, **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, Profª. Dr.ª Daniela Ponzoni, Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani, Prof. Dr. Francisley Ávila Souza, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho e Profª. Dr.ª Alessandra Marcondes Aranega**, por serem peças fundamentais em minha formação.

Ao serviço hospitalar da **Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba** e às unidades da **Unimed Araçatuba e Birigui**, bem como a todos os funcionários, professores e colegas de pós-graduação envolvidos nos plantões hospitalares da equipe de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da FOA/UNESP, expresso minha sincera gratidão. A

convivência diária, o trabalho em equipe e as experiências compartilhadas foram fundamentais para minha formação clínica, ética e humana ao longo desses anos.

Aos **pacientes** atendidos durante essa trajetória, minha profunda gratidão pela confiança depositada. Em especial, aos pacientes acometidos por osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos (MRONJ), que, mesmo diante de situações tão desafiadoras, contribuíram de forma significativa para meu aprendizado, crescimento profissional e para a realização deste trabalho. Cada atendimento foi também uma oportunidade de aprendizado e reflexão, que levarei comigo ao longo de toda minha vida profissional.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação ao longo desta jornada. Levo comigo cada aprendizado e cada experiência vivida com profunda gratidão.

“Alguns processos levam tempo – na ciência e na vida”

RESUMO

BAGGIO, A. M. P. **Influência da fotobiomodulação e de agentes tópicos antimicrobianos na prevenção da osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos (MRONJ): estudo pré-clínico em ratas ovariectomizadas.** 2026. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

A osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos (MRONJ) representa uma complicação de relevância clínica na odontologia, caracterizada por exposição óssea persistente na região maxilofacial associada ao uso de medicamentos antirreabsortivos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da fotobiomodulação (FBM) e de agentes antimicrobianos tópicos na prevenção da MRONJ em ratas ovariectomizadas tratadas com zoledronato. Oitenta e quatro animais foram distribuídos em sete grupos experimentais: ZOL, ZOL+PB, ZOL+MT, ZOL+CLX, ZOL+PB+MT, ZOL+PB+CLX e SAL. Após três semanas de tratamento medicamentoso e indução de periodontite experimental, foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo, seguida da aplicação dos protocolos terapêuticos, incluindo a FBM, pasta à base de metronidazol 10% e lidocaína 2% ou gel de clorexidina 2%). Os animais foram eutanasiados 28 dias após a exodontia para análises clínicas, histológicas, histométricas e moleculares. A administração do zoledronato comprometeu significativamente o reparo alveolar, promovendo atraso na reepitelização, persistência de infiltrado inflamatório e aumento da área de tecido ósseo não vital (TONV = 574,8 μm^2), significativamente superior ao observado em todos os grupos tratados ($p < 0,0001$). Além disso, o grupo ZOL apresentou a menor área de tecido ósseo neoformado (TONF=254,8 μm^2), enquanto o grupo SAL apresentou a maior média (674,8 μm^2) ($p < 0,0001$). Entre os tratamentos, a FBM + metronidazol (ZOL+PB+MT) promoveu os melhores resultados, apresentando a maior neoformação óssea entre os grupos tratados (563,8 μm^2) e a menor área de TONV (277,7 μm^2) ($p < 0,0001$). Os grupos submetidos às terapias também apresentaram maior atividade celular no interior dos alvéolos quando comparados ao ZOL isolado. A análise molecular demonstrou que o zoledronato reduziu significativamente a expressão de VEGFA, IL-10 e marcadores osteogênicos (COL1A1, ALPL e OST), além de aumentar a expressão de IL-6. Em contrapartida, os protocolos contendo FBM promoveram aumento da expressão de VEGFA (0,3532–0,3823 vs. 0,0190; $p < 0,0001$), redução da expressão de IL-6, com valores próximos ao grupo saudável para ZOL+PB+MT (0,6267 vs. 0,4500; $p = 0,2368$), e aumento significativo da expressão dos marcadores de formação óssea, corroborando os achados histológicos e histométricos. Conclui-se que a fotobiomodulação, especialmente quando associada à pasta de metronidazol, favorece o reparo alveolar e reduz os sinais experimentais compatíveis com MRONJ, demonstrando potencial como estratégia adjuvante para prevenção dessa condição.

Palavras-chave: osteonecrose; mandíbula; regeneração óssea; terapia com luz de baixa intensidade; anti-infecciosos.

ABSTRACT

BAGGIO, A. M. P. **Influence of photobiomodulation and topical antimicrobial agents on the prevention of medication-related osteonecrosis of the jaws: preclinical study in ovariectomized rats.** 2026. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

Medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) is a clinically relevant complication in dentistry, characterized by persistent bone exposure in the maxillofacial region associated with the use of antiresorptive medications. The present study aimed to evaluate the influence of photobiomodulation therapy (PBMT) and topical antimicrobial agents on the prevention of MRONJ in ovariectomized rats treated with zoledronate. Eighty-four animals were allocated into seven experimental groups: ZOL, ZOL+PB, ZOL+MT, ZOL+CHX, ZOL+PB+MT, ZOL+PB+CHX, and SAL. After three weeks of drug administration and induction of experimental periodontitis, the left mandibular first molar was extracted, followed by the application of the therapeutic protocols, including PBMT, a paste containing 10% metronidazole and 2% lidocaine, or 2% chlorhexidine gel. Animals were euthanized 28 days after tooth extraction for clinical, histological, histometric, and molecular analyses. Zoledronate administration significantly impaired alveolar healing, promoting delayed re-epithelialization, persistence of inflammatory infiltrate, and increased area of non-vital bone tissue (NVBT = 574.8 μm^2), which was significantly greater than that observed in all treated groups ($p < 0.0001$). In addition, the ZOL group exhibited the lowest area of newly formed bone tissue (NFBT = 254.8 μm^2), whereas the SAL group showed the highest mean value (674.8 μm^2) ($p < 0.0001$). Among the treatment protocols, PBMT combined with metronidazole (ZOL+PB+MT) yielded the best outcomes, presenting the greatest bone neoformation among the treated groups (563.8 μm^2) and the smallest area of NVBT (277.7 μm^2) ($p < 0.0001$). The treated groups also demonstrated greater cellular activity within the extraction sockets compared with the ZOL group. Molecular analysis revealed that zoledronate significantly reduced the expression of VEGFA, IL-10, and osteogenic markers (COL1A1, ALPL, and OST), while increasing IL-6 expression. In contrast, protocols containing PBMT promoted increased VEGFA expression (0.3532–0.3823 vs. 0.0190; $p < 0.0001$), reduced IL-6 expression, with values approaching those of the healthy group in ZOL+PB+MT (0.6267 vs. 0.4500; $p = 0.2368$), and significantly enhanced the expression of bone formation markers, corroborating the histological and histometric findings. In conclusion, photobiomodulation therapy, particularly when associated with metronidazole paste, enhances alveolar healing and reduces experimental signs compatible with MRONJ, demonstrating potential as an adjunctive strategy for the prevention of this condition.

Keywords: osteonecrosis; mandible; bone regeneration; low-level light therapy; anti-infective agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas cirúrgicas do procedimento de ovariectomia	27
Figura 2 – Procedimento de instalação da ligadura de algodão	28
Figura 3 – Exodontia do primeiro molar inferior	29
Figura 4 – Aplicação de gel de clorexidina 2%	30
Figura 5 – Aplicação da pasta de metronidazol	31
Figura 6 – Imagem representativa da aplicação da FBM no alvéolo pós-exodôntico	32
Figura 7 – Representação esquemática do delineamento experimental	32
Figura 8 – Esquema representativo da área microscópica de interesse gengival (AMI-G)	36
Figura 9 – Representação gráfica da análise de espessura do epitélio	38
Figura 10 – Esquema representativo da área microscópica de interesse óssea (AMI-O)	39
Figura 11 – (A) Hemimandíbula e delimitação da área de interesse; (B) Tecido gengival em almofariz cerâmico esterilizado previamente por processo de esterilização a seco; (C) Adição do TRIzol para extração de RNA	42
Figura 12 – Aspecto clínico intraoral do alvéolo pós-exodôntico 28 dias após a exodontia nos diferentes grupos experimentais	47
Figura 13 – Aspecto histológico do epitélio e tecido conjuntivo que recobria o alvéolo aos 28 dias pós-operatórios. Fotomicrografias representativas do sítio de extração dentária em SAL (A), ZOL (B) e ZOL+PB (C)	51
Figura 14 – Aspecto histológico do epitélio e tecido conjuntivo que recobria o alvéolo aos 28 dias pós-operatórios. Fotomicrografias representativas do sítio de extração dentária em ZOL+MT (A) e ZOL+PB+MT (B)	52
Figura 15 – Aspecto histológico do epitélio e tecido conjuntivo que recobria o alvéolo aos 28 dias pós-operatórios. Fotomicrografias representativas do sítio de extração dentária em ZOL+CLX (A) e ZOL+PB+CLX (B)	53
Figura 16 – (A) Gráfico representativo da espessura maior do epitélio de todos os grupos; (B) Gráfico representativo da espessura menor do epitélio de todos os grupos	55
Figura 17 – Gráfico representativo do índice de heterogeneidade da arquitetura epitelial de todos os grupos	56
Figura 18 – Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios (TONF). Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do	61

tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em ZOL, ZOL+PB, ZOL+MT, ZOL+CLX, ZOL+PB+MT, ZOL+PB+CLX e SAL

Figura 19 – Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios (TONV). Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em ZOL, ZOL+PB, ZOL+MT, ZOL+CLX, ZOL+PB+MT, ZOL+PB+CLX e SAL

Figura 20 – Tecido ósseo neoformado (TONF) no sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia

Figura 21 – Tecido ósseo não-vital (TONV) no sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia

Figura 22 – Quantificação de células mononucleares do sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia

Figura 23 – Células mononucleares do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em SAL, ZOL, ZOL+PB, ZOL+MT, ZOL+CLX, ZOL+PB+MT, ZOL+PB+CLX

Figura 24 – Expressão relativa de VEGFA, IL-6 e IL-10 no tecido gengival, avaliada por qRT-PCR

Figura 25 – Expressão relativa de COL1A1, ALPL, OST e OPG no tecido ósseo, avaliada por qRT-PCR

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação clínica do sítio de extração dentária 28 dias após a 49
exodontia, utilizando sistema de pontuação ordinal (0–6), no qual 0 indica ausência
total e 6 indica presença máxima do parâmetro avaliado, conforme a característica
clínica analisada

Tabela 2 – Pontuações e distribuição dos espécimes de acordo com a análise 58
histopatológica do processo de reparo pós-extração dentária em 28 dias de pós-
operatório: parâmetros inflamatórios (padrão celular e extensão da inflamação) nos
grupos SAL, ZOL, ZOL+PB, ZOL+MT, ZOL+CLX, ZOL+PB+MT e
ZOL+PB+CLX, utilizando sistema de pontuação ordinal (0–6), no qual 0 indica
ausência total e 6 indica presença máxima do parâmetro avaliado

Tabela 3 – Pontuações e distribuição dos espécimes de acordo com a análise 59
histopatológica do processo de reparo pós-extração dentária em 28 dias de pós-
operatório: padrão estrutural dos tecidos (epitelial, conjuntivo e ósseo) nos grupos
SAL, ZOL, ZOL+PB, ZOL+MT, ZOL+CLX, ZOL+PB+MT e ZOL+PB+CLX,
utilizando sistema de pontuação ordinal (0–6), no qual 0 indica ausência total e 6
indica presença máxima do parâmetro avaliado

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequências dos primers específicos dos genes utilizados nas análises de qRT-PCR	45
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALPL	Fosfatase Alcalina
AMI-G	Área Microscópica de Interesse - Gengival
AMI-O	Área Microscópica de Interesse - Óssea
AMI-O	Área Microscópica de Interesse - Óssea
ANOVA	Analysis of Variance (Análise de Variância)
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLX	Clorexidina
COL1A1	Collagen Type I Alpha 1 Chain
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FBM	Fotobiomodulação
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
MRONJ	Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws
MT	Metronidazol
OPG	Osteoprotegerina
OST	Osteocalcina
PBM	Photobiomodulation
PBS	Phosphate Buffered Saline
PVPI	Polivinilpirrolidona iodada
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real com Transcrição Reversa
RNA	Ácido Ribonucleico
TONF	Área de osso neoformado
TONV	Tecido Ósseo Não Vital
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 PROPOSIÇÃO	23
3 MATERIAL E MÉTODO	24
3.1 Delineamento Experimental e Manejo dos Animais	24
3.2 Avaliação do Ciclo Estral e Ovariectomia	26
3.3 Delineamento Cirúrgico e Indução de Osteonecrose	27
3.3.1 Indução da periodontite experimental	27
3.3.2 Indução da Osteonecrose Medicamentosa	28
3.3.3 Exodontia	28
3.4 Protocolos Terapêuticos	29
3.4.1 Gel de clorexidina	29
3.4.2 Pasta de metronidazol	30
3.4.3 Fotobiomodulação	31
3.5 Eutanásia	32
3.6 Métodos de Análise	33
3.6.1 Análise Clínica	33
3.6.1.1 Avaliação da condição geral de saúde dos animais e exame extra e intrabucal	33
3.6.2 Coleta das amostras	34
3.6.3 Processamento histológico do tecido gengival	34
3.6.4 Processamento histológico do tecido ósseo	34
3.6.5 Análises microscópicas (Conjunto 1)	35
3.6.5.1 Análise histológica do tecido gengival	35
3.6.5.1.1 Área Microscópica de Interesse – Gengiva (AMI-G)	35
3.6.5.1.2 Avaliação histológica qualitativa (AMI-G)	36
3.6.5.1.3 Espessura Epitelial	36
3.6.5.1.4 Índice de Irregularidade da Arquitetura Epitelial	37
3.6.5.2 Análise histológica do tecido ósseo alveolar	38
3.6.5.2.1 Área Microscópica de Interesse – Osso (AMI-O)	38
3.6.5.2.2 Avaliação histológica qualitativa (AMI-O)	39
3.6.5.2.3 Análise histométrica	39
3.6.5.3 Quantificação de células mononucleares	40

3.6.5.4 Calibração do examinador	40
3.7 Análise Molecular	41
3.7.1 Análise de Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa Quantitativa (qRT-PCR)	41
3.7.1.1 Coleta e Preparação das Amostras	41
3.7.1.2 Extração de RNA	41
3.7.1.3 Transcrição Reversa	42
3.7.1.4 qRT-PCR	43
3.8 Análise Estatística	45
4 RESULTADOS	46
4.1 CONJUNTO 1 – Análises Clínica e Histológica	46
4.1.1 Análise da Condição Geral de Saúde dos Animais e Exame Extra e Intrabucal	46
4.1.2 Análise Histológica e Histométrica do Tecido Gengival (AMI-G)	50
4.1.2.1 Análise histológica	50
4.1.2.2 Análise histométrica do tecido gengival (AMI-G)	54
4.1.2.2.1 Espessura maior do epitélio	54
4.1.2.2.2 Espessura menor do epitélio	54
4.1.2.2.3 Heterogeneidade da arquitetura epitelial	55
4.1.2.2.4 Correlação entre análise histológica e morfometria epitelial	57
4.1.3 Análise Histológica e Histométrica do Sítio de Extração Dental e Adjacências (AMI-O)	60
4.1.3.1 Análise Histológica (AMI-O)	60
4.1.3.2 Análise Histométrica (AMI-O)	63
4.1.3.2.1 Área de tecido ósseo neoformado (TONF)	63
4.1.3.2.2 Área de tecido ósseo não-vital (TONV)	64
4.1.3.2.3 Quantificação de células mononucleares	66
4.2 CONJUNTO 2 – Análise Molecular	68
4.2.1 Análise Molecular por qRT-PCR	68
4.2.1.1 Tecido gengival	68
4.2.1.1.1 VEGFA	68
4.2.1.1.2 IL-6	69
4.2.1.1.3 IL-10	70
4.2.1.2 Tecido ósseo	71

4.2.1.2.1 COL1A1	71
4.2.1.2.2 ALPL	72
4.2.1.2.3 OST	73
4.2.1.2.4 OPG	73
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84
ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos (MRONJ) configura uma condição clínica complexa, de natureza multifatorial e manejo desafiador, caracterizada pela exposição óssea persistente na região maxilofacial em pacientes submetidos ao uso de fármacos antirreabsortivos, isoladamente ou em associação a agentes antiangiogênicos [1,2]. Desde sua primeira descrição, a MRONJ permanece como um desafio significativo para a odontologia, não apenas pelas limitações das estratégias terapêuticas disponíveis, mas também pelo impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes acometidos, incluindo dor, infecção recorrente, limitação funcional e comprometimento psicossocial [1-3].

Entre os fármacos mais frequentemente associados ao desenvolvimento da MRONJ destacam-se os bifosfonatos nitrogenados, especialmente o Zoledronato, em função de sua elevada afinidade pelo tecido ósseo e de seu potente efeito inibitório sobre a atividade osteoclástica [3–5]. Embora esses agentes sejam amplamente utilizados no tratamento de doenças osteometabólicas e neoplásicas, sua ação prolongada no tecido ósseo interfere de forma significativa no remodelamento ósseo fisiológico [3,4]. Associada a alterações vasculares, inflamatórias e imunológicas, essa interferência pode comprometer a capacidade de reparo dos tecidos maxilofaciais, particularmente após procedimentos invasivos, como as exodontias [1–3].

O desenvolvimento da MRONJ está relacionado à interação de múltiplos fatores locais e sistêmicos [1,2,6]. Entre os principais fatores de risco descritos na literatura destacam-se a presença de infecção oral, a doença periodontal, o trauma cirúrgico, a duração e o tipo da terapia medicamentosa, bem como condições sistêmicas capazes de alterar o metabolismo ósseo e a resposta imune do hospedeiro [6]. Nesse contexto, a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na patogênese da MRONJ tem sido amplamente favorecida pelo uso de modelos experimentais, os quais permitem a investigação controlada dos eventos celulares, moleculares e teciduais associados à essa condição [7,8].

Apesar dos avanços no entendimento dos mecanismos envolvidos na MRONJ, ainda não existe consenso quanto ao tratamento/prevenção ideais [1,2,9].

As abordagens conservadoras, baseadas principalmente no controle da infecção e da inflamação, frequentemente apresentam resultados limitados, sobretudo em estágios mais avançados da doença. Por outro lado, intervenções cirúrgicas, embora necessárias em determinados casos, podem agravar o quadro clínico em função da capacidade reduzida de reparo ósseo nesses pacientes [1,2,9]. Diante desse cenário, terapias adjuvantes têm sido propostas com o objetivo de modular a resposta inflamatória, estimular o reparo tecidual e favorecer a regeneração óssea [10,11].

A fotobiomodulação (FBM) tem despertado crescente interesse na odontologia experimental devido ao seu potencial de promover analgesia, reduzir a inflamação, estimular a angiogênese e favorecer a atividade osteoblástica, contribuindo para o reparo ósseo e de tecidos moles em diferentes condições patológicas [10]. Paralelamente, o uso de terapias antimicrobianas tópicas, como a clorexidina e o metronidazol, permanece como uma estratégia fundamental para o controle da carga bacteriana local, especialmente em ambientes ósseos comprometidos e suscetíveis à infecção secundária [11,12].

Considerando a natureza multifatorial da MRONJ, a associação de terapias com diferentes mecanismos de ação pode representar uma abordagem promissora para o manejo da doença. Entretanto, ainda são escassos os estudos experimentais que avaliem, de forma sistemática, os efeitos isolados e combinados da FBM e de agentes antimicrobianos tópicos sobre o reparo ósseo, o processo inflamatório e a expressão gênica em modelos experimentais.

Dessa forma, o presente trabalho propôs investigar, em um modelo experimental de MRONJ, os efeitos de diferentes protocolos terapêuticos sobre o processo de reparo alveolar. A compreensão da resposta tecidual às terapias avaliadas e dos mecanismos biológicos envolvidos poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e cientificamente fundamentadas, ampliando as perspectivas de manejo clínico da MRONJ.

6 CONCLUSÃO

A FBM promove modulação positiva do microambiente reparacional em condição de comprometimento induzido por zoledronato, especialmente quando associada ao controle antimicrobiano com metronidazol. A terapia combinada parece atuar tanto na redução do estímulo inflamatório quanto na estimulação da atividade osteoblástica, resultando em melhora significativa da neoformação óssea alveolar. Contudo, a incapacidade de restaurar completamente os níveis observados no grupo saudável indica que o impacto do bisfosfonato no metabolismo ósseo permanece parcialmente irreversível no período experimental analisado.

REFERÊNCIAS

1. Ruggiero SL, Dodson TB, Aghaloo T, Carlson ER, Ward BB, Kademani D. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' position paper on medication-related osteonecrosis of the jaws: 2022 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2022;80(5):920-43. doi: 10.1016/j.joms.2022.02.008.
2. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: 2009 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5 Suppl):2-12. doi: 10.1016/j.joms.2009.01.009.
3. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(9):1115-7. doi: 10.1016/s0278-2391(03)00720-1.
4. Luvizuto ER, Dias SM, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR Jr, Okamoto R, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone.* 2010;46(4):1021-9. doi: 10.1016/j.bone.2009.12.016.
5. Izzotti A, Menini M, Pulliero A, Dini G, Cartiglia C, Pera P, et al. Bisphosphonates-associated osteonecrosis of the jaw: the role of gene-environment interaction. *J Prev Med Hyg.* 2013;54(3):138-45.
6. McGowan K, McGowan T, Ivanovski S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. *Oral Dis.* 2018;24(4):527-36. doi: 10.1111/odi.12708.
7. Hadad H, Matheus HR, Pai SI, Souza FA, Guastaldi FPS. Rodents as an animal model for studying tooth extraction-related medication-related osteonecrosis of the jaw: assessment of outcomes. *Arch Oral Biol.* 2024;159:105875. doi: 10.1016/j.archoralbio.2023.105875.
8. Aguirre JI, Castillo EJ, Kimmel DB. Preclinical models of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). *Bone.* 2021;153:116184. doi: 10.1016/j.bone.2021.116184.

9. Kagami H, Inoue M, Kobayashi A, Taguchi A, Li X, Yoshizawa M. Issues with the surgical treatment of antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis.* 2018;24(1-2):52-6. doi: 10.1111/odi.12783.
10. Statkiewicz C, Toro LF, Mello-Neto JM, Sá DP, Casatti CA, Issa JPM, et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2018;184:7-17. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.05.004.
11. Varidel A, Wong E. Conservative management of severe medication-related osteonecrosis of the jaw with pathological fracture. *J Craniofac Surg.* 2022;33(3):e329-33. doi: 10.1097/SCS.00000000000008222.
12. Faverani L, Cruz S, Delanora L, Delamura I, Silva M, Santos JF, et al. Management of medication-related osteonecrosis of the jaw through the association of surgical treatment with local and systemic adjuvant therapies: a case series with follow-ups of up to 3 years. *Quintessence Int.* 2025;56(8):654-66. doi: 10.3290/j.qi.b6376673.
13. 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. *PLoS Biol.* 2020;18(7):e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410.
14. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone.* 2019;120:101-13. doi: 10.1016/j.bone.2018.10.014.
15. Silva MC, Delamura IF, Simon MES, Barbosa S, Ting DT, Bechara K, et al. Is there an ideal concentration of ozonized oil for the prevention and modulation of zoledronate-induced mandibular osteonecrosis? A study on senescent rats. *J Funct Biomater.* 2024;15(12):353. doi: 10.3390/jfb15120353.
16. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Guia para o uso de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica. Brasília: MCTI/CONCEA; 2023.

17. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62(4A):609-14. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008.
18. Baggio AMP, Bizelli VF, Delamura IF, Viotto AHA, Veras ASC, Teixeira GR, et al. Systemic ozone therapy as an adjunctive treatment in guided bone regeneration: a histomorphometrical and immunohistochemical study in rats. *Clin Oral Investig.* 2024;28(10):556. doi: 10.1007/s00784-024-05961-3.
19. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5 Suppl):61-70. doi: 10.1016/j.joms.2009.01.007.
20. Delanora LA, Lima Neto TJ, Rocha TE, Silveira GRC, Levin L, Shibli JA, et al. Systemic ozone therapy improves oral hard and soft tissue healing in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ): a study in senescent female rats. *Biomedicines.* 2025;13(5):1248. doi: 10.3390/biomedicines13051248.
21. Pacheco VN, Langie R, Benfica JRD, Munaretto JC, Etges A, Ponzoni D, et al. Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: part II: assessment of alveolar bone tissue inflammatory response in rats. *Int J Exp Pathol.* 2018;99(5):258-63. doi: 10.1111/iep.12291.
22. Russell RGG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011;49(1):2-19. doi: 10.1016/j.bone.2011.04.022.
23. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(9):1032-45. doi: 10.4065/83.9.1032.
24. Kuroshima S, Sasaki M, Sawase T. Medication-related osteonecrosis of the jaw: a literature review. *J Oral Biosci.* 2019;61(2):99-104. doi: 10.1016/j.job.2019.03.005.
25. Otto S, Schreyer C, Hafner S, Mast G, Ehrenfeld M, Stürzenbaum S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40(4):303-309. doi: 10.1016/j.jcms.2011.05.003.

26. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302(3):1055-61. doi: 10.1124/jpet.102.035295.
27. Santini D, Vincenzi B, Avvisati G, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, et al. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2002;8(5):1080-4.
28. Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol*. 2008;84(5):1091-9. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00394.x.
29. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*. 2017;4(3):337-61. doi: 10.3934/biophy.2017.3.337.
30. Yan Y, Lan H, Miao G, Wang H, Li Z, Zhang Q, et al. SHED-exosomes functionalized micro-nano bioactive glass/PCL membrane regulates macrophage polarization and promotes osteogenic differentiation. *J Appl Oral Sci*. 2026;34:e20250541. doi: 10.1590/1678-7765-2025-0541.
31. Freitas LF, Hamblin MR. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2016;22(3):7000417. doi: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.
32. Silva LJ, Poi WR, Panzarini SR, Rodrigues TS, Simonato LE. Clinical evaluation of an ointment with 10% metronidazole and 2% lidocaine in the treatment of alveolitis. *Minerva Stomatol*. 2006;55(7-8):431-6.
33. Pradeep AR, Kumari M, Priyanka N, Naik SB. Efficacy of chlorhexidine, metronidazole and combination gel in the treatment of gingivitis: a randomized clinical trial. *J Int Acad Periodontol*. 2012;14(4):91-6.
34. Cunha G, D'Angieri Saugo G, Gabrielli MAC, Barbeiro CO, Almeida LY, Bufalino A, et al. Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine and Blue®M applied to human gingival fibroblasts and keratinocytes: an in vitro study. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2024;125(12 Suppl 2):101923. doi: 10.1016/j.jormas.2024.101923.

35. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol.* 1999;70(12):1443-8. doi: 10.1902/jop.1999.70.12.1443.
36. Amaroli A, Agas D, Laus F, Cuteri V, Hanna R, Sabbieti MG, et al. The effects of photobiomodulation of 808 nm diode laser therapy on the in vitro osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Front Physiol.* 2018;9:123. doi: 10.3389/fphys.2018.00123.
37. Vescovi P, Merigo E, Meleti M, Manfredi M, Fornaini C, Nammour S, et al. Conservative surgical management of stage I bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Int J Dent.* 2014;2014:107690. doi: 10.1155/2014/107690.
38. Goker F, Grecchi E, Grecchi F, Francetti L, Del Fabbro M. Treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): a systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021;25(6):2662-73. doi: 10.26355/eurrev_202103_25430.