



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

**BRITTNIE TIFFANY JOHNSON**

**USO DO PIROFOSFATO DE CÁLCIO INCORPARADO A  
SCAFFOLD DE ALGINATO DE SÓDIO NA PREVENÇÃO DA  
OSTEONECROSE DOS MAXILARES. ANÁLISE CLÍNICA E  
HISTOMORFOMÉTRICA**

Araçatuba - SP  
2025

**BRITTNIE TIFFANY JOHNSON**

**USO DO PIROFOSFATO DE CÁLCIO INCORPARADO A  
SCAFFOLD DE ALGINATO DE SÓDIO NA PREVENÇÃO DA  
OSTEONECROSE DOS MAXILARES. ANÁLISE CLÍNICA E  
HISTOMORFOMÉTRICA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade Estadual  
Paulista (UNESP), Faculdade de  
Odontologia de Araçatuba, para obtenção  
do título de Cirurgiã-Dentista

Orientador(a): Prof. Dr. Francisley Ávila  
Souza

Araçatuba - SP  
2025

*Dedico este trabalho primeiramente à Deus por ter conduzido os meus passos, proporcionando-me paciência, perseverança e força, guiando-me pelos caminhos corretos e à minha mãe, Winsome Patricia Wright, que é minha inspiração e porto seguro em meio as tempestades da vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter conduzido os meus passos, proporcionando-me paciência, perseverança e força, guiando-me pelos caminhos corretos.

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

Ao meu professor orientador Francisley Ávila Souza, por ter me acolhida como sua orientada de iniciação científica, permitindo a expansão do meu interesse pela área de cirurgia. Gostaria de expressar minha sincera gratidão pelo carinho, compreensão e por ter tido a oportunidade de contar com a sua orientação ao longo da graduação.

À minha professora Daniela Micheline dos Santos por me proporcionar a oportunidade de participar do treinamento técnico na disciplina de prótese fixa. Foi uma experiência enriquecedora e contribuiu significativamente para a minha aprendizagem e crescimento profissional. Além disso, agradeço a senhora por aceitar participar da minha banca avaliadora.

A todos os professores que contribuíram com a minha formação e me impulsionaram a sempre entregar o meu melhor

À pós-graduanda Leticia Gabriella de Souza Rodrigues, que teve um papel fundamental durante a elaboração deste trabalho. Muito obrigada por toda assistência que me concedeu na jornada de iniciação científica, o que tornou a experiência verdadeiramente gratificante. Sua orientação, paciência, disposição em me ensinar e compartilhar seus conhecimentos foram importantes para o meu crescimento acadêmico.

À minha mãe Winsome Patricia Wright, que mesmo estando distante fisicamente, foi uma presença constante em minha vida durante toda jornada acadêmica. Sua força, dedicação e amor transcendem qualquer fronteira, e seu apoio incondicional, tanto emocional quanto financeiro, me acompanhou em cada passo desta jornada. Mesmo morando em outro país, a senhora sempre esteve ao meu lado, oferecendo palavras de carinho, sabedoria e motivação, que me ajudaram a superar todos os desafios e seguir em frente com os meus estudos. Mãe, o seu

exemplo de resiliência me inspirou todos os dias e me fez acreditar que tudo é possível; sem o seu empenho, esta conquista não seria possível. Agradeço imensamente por ser minha inspiração, por todos os sacrifícios e esforço realizado em pro da minha educação.

Aos meus irmãos, Oral Johnson e Richard Johnson, e às minhas primas Chadeka Powell e Racquel Richard, que sempre acreditaram no meu potencial, mesmo nos momentos em que eu duvidei de mim mesma. As palavras de encorajamento e a confiança que vocês depositaram em mim foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui. Cada um de vocês me motivou a nunca desistir. Sou extremamente grata por terem sido meu alicerce, não apenas nesta trajetória acadêmica, mas em toda a minha vida.

Às minhas colegas da faculdade que me apoiaram de maneira incondicional durante os períodos mais desafiadores da graduação. Vocês foram fundamentais nos momentos em que me senti perdida ou desanimada, sempre oferecendo palavras de incentivo e ajuda incansável nas dúvidas. Sem a paciência, compreensão e companheirismo de vocês, eu não teria conseguido superar tantos obstáculos. Agradeço de coração por tudo.

A mim mesma, por ter conseguido trilhar o caminho de realizar um curso na língua portuguesa, superando todas as dificuldades que surgiram ao longo da graduação. Foi uma jornada imensamente desafiadora, mas que me trouxe grandes aprendizagens, crescimento pessoal e acadêmico. Agradeço por não ter desistido e por ter acreditado no meu potencial, mesmo quando os obstáculos pareciam grandes demais. Essa conquista é resultado da minha determinação, resiliência, persistência e esforço, e me enche de orgulho ver o quanto evolui ao longo dessa trajetória. Que venha a próxima fase!

*“Never forget that intelligence rules the world and ignorance carries the burden. Therefore, remove yourself as far as possible from ignorance and seek as far as possible to be intelligent.”*

*Marcus Garvey, 1987*

## RESUMO

JOHNSON, B.T. **Uso do pirofosfato de cálcio incorporado a scaffold de alginato de sódio na prevenção da osteonecrose dos maxilares. Análise clínica e histomorfométrica.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)– Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

A osteonecrose dos ossos maxilares teve um crescente aumento de casos relatados pela literatura, por isso tem tido cada vez mais destaque, bem como o uso cada vez mais recorrente das terapias com os medicamentos Bifosfonatos, que são utilizados para o tratamento de pacientes que sofrem de osteoporose ou doenças malignas. Assim, devido a sua recorrência, isso gerou a necessidade de que novos trabalhos sejam produzidos pela comunidade científica, onde se tem estudado e delineado muitos estudos sobre esta doença, buscando não só o seu tratamento como também a sua prevenção. O objetivo deste projeto foi avaliar o efeito do Pirofosfato de Cálcio incorporado a Scaffold de Alginato feitos por Liofilização, e também do Scaffold sem a incorporação do Pirofosfato de cálcio, como terapia preventiva sobre a OMIM, durante o processo de reparo alveolar em ratos. Foram utilizados 32 ratos wistar que foram tratados com 04 aplicações de 0,035 mg/kg de ácido zoledrônico (ZOE) por via caudal com intervalos de 15 dias entre as aplicações e posteriormente tiveram seus molares inferiores esquerdos removidos. Após a exodontia, os animais seguiram com o tratamento com ZOE no mesmo protocolo até a eutanásia. Os animais foram divididos em quatro grupos (n=8) de acordo com o tratamento do alvéolo dental: GC (Controle– não será aplicado ZOE), GZ (Zoledronato), GPS (Pirofosfato incorporado a Scaffold), GSA (Scaffolds de Alginato). Foi realizado análise in vivo, onde 28 dias após o procedimento cirúrgico, aconteceu a eutanásia dos animais, todas as peças coletadas, que foram as hemi-mandíbulas de todos os 32 ratos. Foi realizada uma análise clínica, logo após a eutanásia, e na sequência realizada a análise de cortes desmineralizados, para a avaliação através de: 1) Análise Histológica e Histomorfométrica (onde as áreas de estudo foram avaliadas na análise quantitativa: área de tecido ósseo íntegro, tecidos moles (tecido epitelial, conjuntivo, vasos sanguíneos) e lacunas ósseas).

**Palavras-chave:** Osteonecrose; Pirofosfato de Cálcio; Biomaterial; Alvéolo dental.

## **ABSTRACT**

**JOHNSON, B.T. Use of calcium pyrophosphate incorporated into sodium alginate scaffold in the prevention of osteonecrosis of the jaws. Clinical and histomorphometric analysis.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

Osteonecrosis of the jaw bones has seen a growing increase in cases reported in literature, which is why it has been increasingly highlighted, as well as the increasingly recurrent use of therapies with Bisphosphonate medications, which are used to treat patients suffering from osteoporosis or malignant diseases. Thus, due to its recurrence, this has generated the need for new work to be produced by the scientific community, where many studies have been studied and designed on this disease, seeking not only its treatment but also its prevention. The objective of this project was to evaluate the effect of Calcium Pyrophosphate incorporated into Alginate Scaffold made by Freeze-Drying, and of the Scaffold without the incorporation of Calcium Pyrophosphate, as preventive therapy on OMIM, during the alveolar repair process in rats. 32 Wistar rats were utilized and treated with 04 applications of 0.035 mg/kg of zoledronic acid (ZOE) caudally with 15-day intervals between applications and subsequently had their lower left molars removed. After extraction, the animals continued with ZOE treatment in the same protocol until euthanasia. The animals were divided into four groups (n=8) according to the treatment of the dental socket: GC (Control – ZOE was not applied), GZ (Zoledronate), GPS (Pyrophosphate incorporated into Scaffold), GSA (Alginate Scaffolds). In vivo analysis was executed, where 28 days after the surgical procedure, the animals were euthanized, all organs collected, which were the hemi-mandible of all 32 rats. A clinical analysis was carried out, immediately after euthanasia, and subsequently the analysis of demineralized sections was carried out, for evaluation through: 1) Histological and Histomorphometric Analysis (where the study areas were evaluated in the quantitative analysis: area of intact bone tissue, soft tissues (epithelial tissue, connective tissue, blood vessels) and bone gaps).

**Keywords:** Osteonecrosis; Calcium pyrophosphate; Biomaterial; Tooth socket.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Fluxograma de distribuição dos animais em grupos, de acordo com a terapia preventiva induzida e análise dos grupos por cortes desmineralizados. | 17 |
| Figura 2 - Sequência de fotos referentes ao procedimento de extração do primeiro molar inferior do lado esquerdo                                           | 20 |
| Figura 3 - Primeiro molar inferior do lado esquerdo após extração                                                                                          | 21 |
| Figura 4 - Fluxograma do tempo de trabalho do grupo de análise descalcificado.                                                                             | 21 |
| Figura 5 - Fotos Clínicas representativas dos grupos experimentais                                                                                         | 24 |
| Figura 6 - Gráficos representativos da classificação dos scores obtidos em cada grupo experimental                                                         | 25 |
| Figura 7 - Fotomicrografias representativas do grupo ZOL                                                                                                   | 26 |
| Figura 8 - Fotomicrografias representativas do grupo GPS                                                                                                   | 27 |
| Figura 9 - Fotomicrografias representativas do grupo GSA                                                                                                   | 27 |
| Figura 10 - Fotomicrografias representativas do grupo GSA                                                                                                  | 28 |
| Figura 11 - Fotomicrografias representativas do grupo ZOL                                                                                                  | 32 |
| Figura 12 - Fotomicrografias representativas do grupo GPS                                                                                                  | 34 |
| Figura 13 – Fotomicrografias representativas do grupo GSA                                                                                                  | 35 |
| Figura 14 – Gráfico da área de neoformação óssea (NBA)                                                                                                     | 36 |
| Figura 15 - Gráfico da área de tecido conjuntivo                                                                                                           | 37 |
| Figura 16 - Gráfico da dinâmica óssea                                                                                                                      | 38 |
| Figura 17 - Gráfico da dinâmica óssea                                                                                                                      | 38 |

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Parâmetros, scores e distribuição das amostras de acordo com a análise histopatológica do nível de inflamação tecidual no período pós-operatório de 28 dias

29

Tabela 2 - Parâmetros, scores e distribuição das amostras de acordo com a análise histopatológica do padrão de estrutura dos tecidos no período pós-operatório de 28 dias

30

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

|      |                                                                 |
|------|-----------------------------------------------------------------|
| OMIM | Osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos            |
| ONJ  | Osteonecrose da mandíbula                                       |
| BTCP | Beta Tricálcio Fosfato                                          |
| CPP  | Pirofosfato de Cálcio                                           |
| GC   | Grupo controle                                                  |
| GPS  | Grupo pirofosfato de cálcio incorporado em scaffold de alginato |
| GSA  | Grupo scaffold de alginato                                      |
| GZ   | Grupo Zoledronato                                               |
| ZOE  | Ácido zoledrônico                                               |
| CEUA | Comitê de Ética no Uso de Animais                               |
| HE   | Hematoxilina e eosina                                           |
| HÁ   | Hidroxiapatita                                                  |
| IM   | Intramuscular                                                   |

## SUMÁRIO

|                                                            |      |
|------------------------------------------------------------|------|
| 1 INTRODUÇÃO                                               | 13   |
| 2 OBJETIVOS                                                | 16   |
| 2.1 Objetivo Geral                                         | 16   |
| 2.2 Objetivos Específicos                                  | 1616 |
| 3 METODOLOGIA                                              | 17   |
| 3.1 Animais                                                | 17   |
| 3.2 Aplicação de ácido zoledrônico                         | 18   |
| 3.3 Aplicação de soro fisiológico                          | 18   |
| 3.4 Extração dentária                                      | 18   |
| 3.5 Grupos experimentais                                   | 19   |
| 3.6 Eutanásia                                              | 21   |
| 3.7 Análise Clínica                                        | 22   |
| 3.8 Análise Histológica Qualitativa e Quantitativa         | 22   |
| 4 RESULTADOS                                               | 24   |
| 4.1 Análise Clínica                                        | 24   |
| 4.2 Estudo Experimental In Vivo (Tecidos Desmineralizados) | 26   |
| 4.3 Análise Histológica Qualitativa                        | 28   |
| 4.4 Análise Histométrica                                   | 36   |
| 5 DISCUSSÃO                                                | 39   |
| 6 CONCLUSÃO                                                | 4124 |
| REFERÊNCIAS                                                | 42   |
| ANEXOS                                                     | 47   |

## 1 INTRODUÇÃO

Tem se tornado cada vez mais prevalentes os casos de osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMIM), desde 2003 tem sido mais relatos.<sup>1,2</sup> A OMIM pode ter por definição como tecido ósseo exposto na cavidade oral, por um período maior que oito semanas em pacientes tratados com antirreabsortivos, associados ou não a agentes antiangiogênicos e imunomoduladores, sem histórico de radiação prévia.<sup>3</sup>

Bifosfonatos são uma classe de antirreabsortivos que são amplamente utilizados na prevenção de fragilidades/fraturas ósseas em pacientes osteopênicos/osteoporóticos, no controle de doenças como hipercalcemia, ou na prevenção de metástase ósseas.<sup>4,5,6,7</sup> Sua forma de ação consiste em diminuir a taxa de remodelamento ósseo e impedir que os osteoclastos realizem a reabsorção óssea e sofram apoptose,<sup>8,9</sup> através da incorporação de análogos de adenosina trifosfato (ATP),<sup>10</sup> ou inibindo a enzima peroxissomal farnesil difosfato (FPPS) sintase e por consequência, bloqueando a prenilação de GTPase na via do mevalonato, durante a síntese de colesterol.<sup>11</sup>

Os bifosfonatos que contêm em sua apresentação nitrogênio são mais potentes e se acumulam na concentração máxima na matriz e nos osteoclastos. O aumento concomitante da densidade óssea pode resultar em risco aumentado de desenvolvimento de osteonecrose da mandíbula (ONJ), pois o microtraumatismo constante do movimento da mandíbula e a falta de remodelamento adequado na presença de bifosfonatos podem contribuir para a gênese da ONJ. O risco de desenvolver ONJ aumenta em casos em que o paciente toma o medicamento por um período mais longo, especialmente naqueles com bifosfonato intravenoso.<sup>8,9,12</sup>

Os tratamentos propostos para OMIM podem ser de longa duração e por vezes deixar sequelas no paciente ou ainda apresentar insucesso.<sup>13</sup> A taxa de sucesso em tratamentos cirúrgicos é maior quando comparado com os tratamentos realizados somente com antibioticoterapia,<sup>14</sup> contudo, o tratamento pode ser desafiador e afetar adversamente a qualidade de vida do paciente.<sup>15</sup> As terapias alternativas para tratamento e prevenção da OMIM tem sido alvo de delineamento de pesquisas, e os resultados destes estudos vêm demonstrando bons resultados.

Diversas terapias têm sido estudadas, seja no tratamento e ou na prevenção da OMIM.<sup>16,17,18</sup> Neste trabalho, destaca-se as cerâmicas a base de Beta-tricálcio-fosfato ( $\beta$ -TCP), que foram capazes de prevenir a formação de osso necrótico e induzir uma maior formação de tecido ósseo.<sup>19</sup> Acrescenta-se também que além de altamente biocompatível é possivelmente osteoindutor.<sup>20</sup> O uso de cerâmicas a base de  $\beta$ -TCP (in vitro) reduz a toxicidade para os fibroblastos<sup>21</sup>, que são células essenciais no processo de reparo alveolar.<sup>22</sup> Estas apresentam pH alcalino que pode auxiliar no reparo tecidual, uma vez que pH ácido pode influenciar na patogênese da OMIM.<sup>23</sup> Trabalhos prévios publicados na literatura demonstraram efeitos positivos na utilização do biomaterial carregado ou não para a prevenção da OMIM.<sup>18,24,25,</sup>

Dentre os biomateriais, merece destaque as biocerâmicas sintéticas, que são livres de proteínas ou outros componentes orgânicos residuais, possuem mínima reação imunológica e baixa toxicidade sistêmica.<sup>26</sup> Nesse grupo, encontram-se os derivados de fosfato de cálcio, muito utilizados em aplicações médicas por sua similaridade química com a composição inorgânica dos tecidos duros e serem bioativos.<sup>27</sup>

Dentre esses derivados têm-se os pirofosfatos de cálcio (CPP) obtidos pela condensação das estruturas hidrogenofosfatos em ambientes químicos ricos em íons  $\text{PO}_4^{3-}$ .<sup>28</sup> É considerado o menor polifosfato linear e apresenta três formas polimórficas:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  CPP, obtidas sob alta temperatura de sinterização. A fase cristalina  $\beta$ -CPP demonstra resposta biológica favorável para formação de novos tecidos ósseos, bem como a propriedade de biodegradação intermediária a biocerâmicas mais tradicionais (HA e  $\beta$ TCP). Devido a isso e por se tratar de um material pouco estudado na literatura, torna-se um composto alternativo em potencial como substituto ósseo.<sup>29</sup>

Em regeneração tecidual o pirofosfato de cálcio é um biomaterial com alta potencialidade de emprego e que atualmente apresenta uma subutilização na área odontológica.<sup>30</sup> Pode ser considerado uma sobra proveniente do processo de síntese do  $\beta$ -TCP, e como este apresenta também alta biocompatibilidade e estimula a proliferação de células ósseas.<sup>31</sup> Contudo, ainda não existem estudos publicados que correlacionem o uso deste biomaterial na prevenção da OMIM. Neste sentido, a engenharia de tecidos tem desenvolvido métodos que propiciam um melhoramento na geometria, porosidade e composição desses biomateriais o que

tem os tornados cada vez mais eficientes e promissores, fato comprovado pelo desenvolvimento deste biomaterial que foi sintetizado e isolado em trabalho prévio no Instituto de Química de Araraquara.<sup>32</sup>

No presente estudo também foi utilizado Scaffolds de Alginato feitos por liofilização, isso se deve a estudos publicados previamente na literatura que demonstraram as propriedades dos scaffolds de fornecer um substrato adequado para fixação e proliferação celular, além de função diferenciada e migração celular, fatores esses que são de grande valia para o tecido ósseo, já que também atuam na regeneração óssea e na cicatrização de feridas, isso além de propiciar a entrega de medicamentos com alta carga e eficiência em locais específicos,<sup>43,44,45</sup> que no caso deste estudo foi utilizado em alvéolos pós-exodônticos.

Nos scaffolds foi adicionado o Pirofosfato de Cálcio; um estudo de Lee et al, realizado em calvaria de ratos, evidenciou que essa união entre scaffold de alginato com cerâmicas a base de fosfato de cálcio é favorável, pois promove uma liberação mais lenta de medicamentos, isso devido a macroarquitetura mais porosa dos scaffolds, e após a introdução destes em calvaria de ratos, eles propiciaram uma boa proliferação e diferenciação osteogênica, que desencadeou a formação de tecido ósseo, que fechou quase completamente os defeitos.<sup>46</sup>

Embora os efeitos do pirofosfato de cálcio ainda não são totalmente conhecidos, estudos demonstraram que ele é capaz de estimular a neoformação óssea,<sup>33</sup> além de induzir diretamente a diferenciação das células mesenquimais em células osteogênicas, melhorando a osteoindução, neoformação e regeneração ósseas.<sup>34</sup> Sendo assim, é notável o ineditismo da utilização do pirofosfato nas áreas cirúrgicas, principalmente no que diz respeito à sua aplicação no reparo ósseo alveolar.

Diante da heterogeneidade dos trabalhos publicados e das diferentes formas de análises, faz-se necessário o delineamento experimental de um trabalho que investigue a ação de novos métodos preventivos, por isso neste estudo se propõe o uso do pirofosfato de cálcio incorporado ao scaffold de alginato na prevenção da OMIM.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a função do pirofosfato de cálcio e dos scaffolds de alginato na prevenção da osteonecrose dos maxilares (OMIM) após exodontia em ratos tratados com ácido zoledrônico, bem como a atuação desta terapia no tecido ósseo, observando através das análises se haverá uma indução de neoformação, manutenção da microarquitetura e qualidade do trabeculado ósseo e se ocorrerá o fechamento da loja cirúrgica e organização do tecido conjuntivo.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) Avaliar a área de tecido ósseo neoformado, tecido conjuntivo e possíveis áreas de tecido ósseo necrótico durante o processo de reparo alveolar após a aplicação da terapia proposta no alvéolo dentário de ratos tratados com ácido zoledrônico,
- b) Avaliar a área de tecido ósseo íntegro, tecidos moles (tecido epitelial, conjuntivo, vasos sanguíneos) e lacunas ósseas.

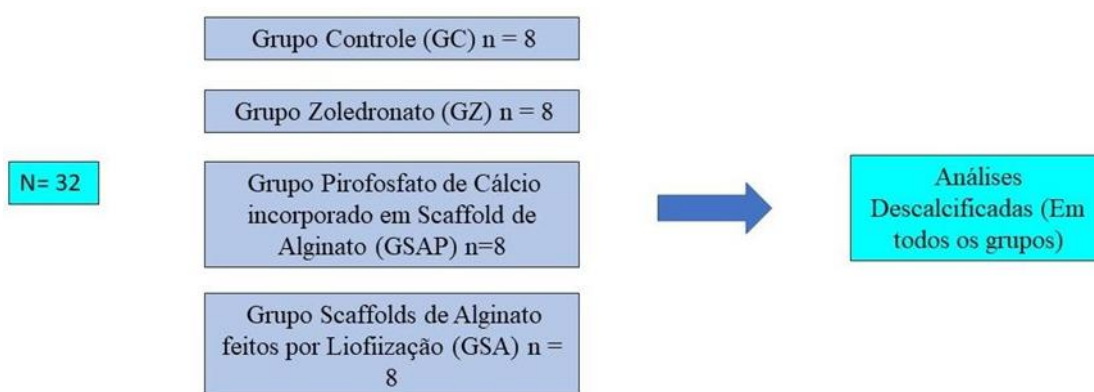
### 3 METODOLOGIA

O presente trabalho foi iniciado após aprovação do Comitê de ética no uso de animais – CEUA, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Processo FOA nº451-2023) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho.”

#### 3.1 Animais

Abaixo segue o esquema de distribuição dos animais em grupos de acordo com as terapias preventivas e análise que foram realizadas (Figura 1).

**Figura 1- Fluxograma de distribuição dos animais em grupos, de acordo com a terapia preventiva induzida e análise dos grupos por cortes desmineralizados.**



Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

Foram utilizados 32 ratos albinus wistar machos com 3 meses de idade e peso aproximado de 350-450g. Os animais foram mantidos em biotério próprio da UNESP com controle da temperatura e luz do ambiente. Os animais foram alimentados com ração e água ad libitum. Para determinar o poder da amostra foi considerado um nível de significância de 5% (com desvio padrão de 2%), e com um poder de teste de 80%, sendo definido alpha como 0,05, e oito ratos por grupos (n=8) foram necessários com finalidade de comparar os diferentes grupos.

### **3.2 Aplicação do ácido zoledrônico**

Todos os animais foram tratados com o uso do ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), exceto os animais do grupo GC (Controle).

Seguindo o modelo experimental de Curra et al. (2016)<sup>34</sup> foi administrado 04 aplicações de 0,035 mg/kg de ácido zoledrônico (ZOE) dissolvido em 0,1ml de veículo (NaCl 0,9%), por animal, através da veia caudal, com intervalos de 15 dias entre as aplicações. Uma semana após a quarta aplicação, os animais tiveram seus molares inferiores esquerdos removidos e o tratamento realizado. Após a exodontia, os animais seguiram com o tratamento com a medicação, seguindo o mesmo protocolo descrito acima, até o período de eutanásia.

### **3.3 Aplicação de soro fisiológico**

Os animais do grupo Controle (GC) receberam a aplicação de soro fisiológico (NaCl 0,9%) na veia caudal dos animais, a quantidade era de 0,1 ml de soro por animal, seguindo o mesmo protocolo de aplicação do ácido zoledrônico, sendo aplicado uma vez a cada 15 dias, até o período de eutanásia.

### **3.4 Extração dentária**

Todos os animais tiveram seus primeiros molares inferiores esquerdos extraídos na 7ª semana após o início do protocolo de indução de OMIM. O procedimento cirúrgico foi realizado sob sedação com injeção intramuscular (IM) de 90mg/kg de Cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil), e 10mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). Após sedação foi realizada a anti-sepsia com PVPI degermante e tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), seguido da aposição de campos estéreis. Como complementação anestésica os animais receberam infiltração local de cloridrato de 0.3 ml/Kg mepivacaína (Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal em mesa de operação personalizada. A

sindestomotomia da inserção gengival foi realizada cuidadosamente por meio de um descolador delicado (Descolador de Molt 9, Quinelato, São Paulo, Brasil) seguido da luxação e exodontia do dente. Após a exodontia foi realizado um descolamento dos tecidos moles da região que corresponde ao alvéolo do elemento extraído, com intuito de auxiliar na manutenção do coágulo e fechamento primário do alvéolo por tecido mole. Em seguida foi realizada a sutura com fio absorvível de Poliglactina 910 espessura 4.0 (Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil). No pós-operatório os animais receberam administração IM de 0,1 ml de Pentabiótico Veterinário (Laboratório Zoetis – indústria de produtos veterinários Ltda), em dose única, imediatamente após o procedimento cirúrgico.

### 3.5 Grupos Experimentais

Após tratamento com o uso do ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil) os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, de acordo com o tratamento que receberam, tiveram seus primeiros molares inferiores esquerdos extraídos (seguindo o modelo de Statkiewicz et al. 2018)<sup>13</sup>.

**Grupo Controle (GC):** Os animais sofreram a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo após o tratamento simulação de tratamento. Nesse grupo foi aplicado o 0,1 ml de soro fisiológico (NaCl 0,9%) no mesmo protocolo de aplicação dos grupos experimentais. Não foi realizado tratamento no alvéolo, apenas foi preenchido por coágulo sanguíneo.

**Grupo Zoledronato (GZ):** Os animais sofreram a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo após o tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), porém nenhum outro tratamento foi realizado e o alvéolo foi preenchido apenas por coágulo sanguíneo;

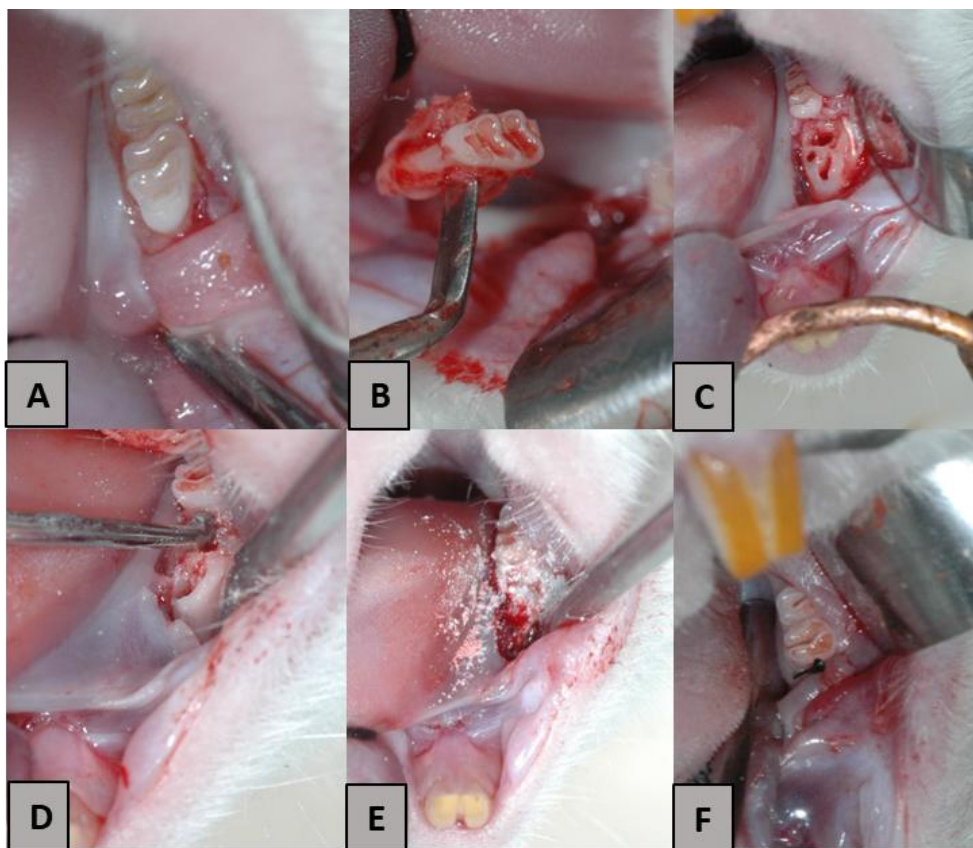
**Grupo Pirofosfato de Cálcio incorporado em Scaffold de Alginato (GPS):** Foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo após o tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), os animais tiveram os alvéolos preenchidos por Scaffold de Alginato manufaturados por liofilização e incorporados pelo biomaterial Pirofosfato de Cálcio.

A inserção do biomaterial foi feita da seguinte forma: o scaffold com o biomaterial incorporado foi cortado até se adaptar melhor no alvéolo pós exodôntico, então ele era embebido em soro fisiológico, e na sequência se adicionava mais biomaterial Pirofosfato de Cálcio em pó ao scaffold, e então ele era acomodado no interior do alvéolo, e suturado na sequência.

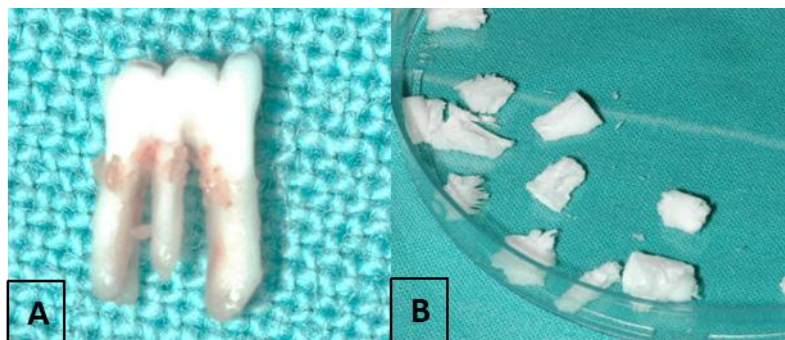
**Grupo Scaffold de Alginato (GSA):** Foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo após o tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), e os animais tiveram seus alvéolos reenchidos por Scaffold de Alginato manufaturados por processo de liofilização.

A inserção do scaffold foi feita da seguinte forma: o scaffold foi cortado até se adaptar melhor no alvéolo pós exodôntico, então ele era embebido em soro fisiológico, posteriormente era acomodado no interior do alvéolo e suturado na sequência.

**Figura 2 - Sequência de fotos referentes ao procedimento de extração do primeiro molar inferior do lado esquerdo**



**Figura 3 - Primeiro molar inferior do lado esquerdo após extração**



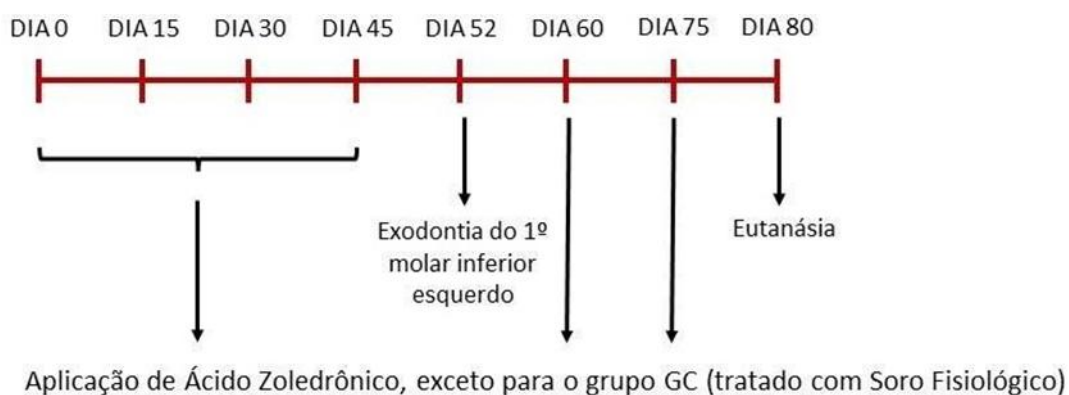
(A) Primeiro molar inferior do lado esquerdo após extração (B) Biomaterial pirofosfato de cálcio incorporado em scaffold de Alginato de sódio.

Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

### 3.6 Eutanásia

Nesta metodologia de cortes descalcificados foram empregados 8 animais por grupo, totalizando 32 animais divididos em 4 grupos, onde todos foram submetidos a análise de cortes descalcificados. Após 28 dias da exodontia dos primeiros molares inferiores do lado esquerdo os animais foram submetidos a eutanásia com dose excessiva de anestésico, tiopental sódico (150mg/kg) e lidocaína 2% (10 mg/kg). Foi realizado uma ressecção em bloco da região alveolar para análise histológica. O esquema de trabalho pode ser melhor observado na imagem abaixo (Figura 4).

**Figura 4 - Fluxograma do tempo de trabalho do grupo de análise descalcificado**



### 3.7 Análise Clínica

Após a eutanásia dos animais, as amostras foram coletadas, fotografadas e classificadas com o objetivo de avaliar a presença da osteonecrose. As amostras (figuras 3,4,5) foram acomodadas em uma estativa e fotografadas de modo padronizado com máquina fotográfica Canon io5 com lente EF 100mm f/2.8 macro e flash MR-14EX II Macro ring light. Foi utilizado dados previamente publicados 37 para guiar a classificação da osteonecrose. Foi classificado como Grau 0 = mucosa curada e nenhum osso necrótico aparente no local de extração, 1 = nenhuma evidência clínica de osso necrótico, mas não especialistas no local de extração, 2= osso exposto/necrótico sem sinais de infecção, 3 = osso exposto/necrótico com sinais de infecção no local de extração, 4 = osso exposto necrótico com infecção e osso exposto e necrótico que se estende além a região do osso alveolar. Além disso, foram analisados fatores como as características do fechamento da ferida (normal / incompleto / atrasado), exposição óssea, alterações necróticas e presença de supuração e fistulas.

### 3.8 Análise Histológica Qualitativa e Quantitativa

As mandíbulas foram removidas e reduzidas para realização da análise histológica dos cortes em parafina. As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP – Brasil) por 24 horas e após esta etapa foi iniciado o processo de descalcificação em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e hidróxido de sódio a 20%.

Após a descalcificação adequada, foi realizada a desidratação das peças através da sequência de álcoois sendo finalizada com o processo de diafanização com xilol. Na sequência as peças foram submetidas ao processo de embebição em parafina 1, 2, 3 e por fim foram imersas em parafina para inclusão. Em seguida, a parafina em excesso foi removida e as peças serão instaladas no sentido cervical (pósterio-anterior) nos tacos de madeira, onde foram realizados cortes sagitais de 5 µm de espessura por meio de micrótomo (RM2235, Leica Biosystems Nussloch GmbH 2017).

Quatro lâminas de cada amostra foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE). As imagens de lâminas coradas com HE serão obtidas através do microscópio óptico (Leica DM4000 B LED, Heerbruggm Switzerland) com o auxílio de lentes objetivas Carls Zeiss (2.5X0.07, 5X0.12, 10X e 40X0.65) acoplados uma câmera de captação de imagem e conectado ao computador (Configuração: Intel Core i5® com sistema operacional Windows 7® e Software para processamento e análise de imagens (AxioVision 4.9.1®0, Carl Zeiss by Imaging Associates ltd, Jena, Deutschland).

Foram determinadas áreas a serem avaliadas na análise qualitativa: área de tecido ósseo íntegro, tecidos moles (tecido epitelial, conjuntivo, vasos sanguíneos) e lacunas ósseas, adaptando os critérios usados por metodologia publicada em trabalho anterior. A análise foi realizada na região de interesse, que corresponde à área do alvéolo correspondente ao primeiro molar no sentido anteroposterior. Denominou-se esta região, como sendo a região de interesse devido ao fato de ser o alvéolo em fase de reparo do primeiro molar inferior esquerdo, e este alvéolo durante o procedimento de exodontia sofreu um trauma local, que a literatura preconiza ser uma área de maior propensão a desenvolver a osteonecrose do maxilar.<sup>38</sup>

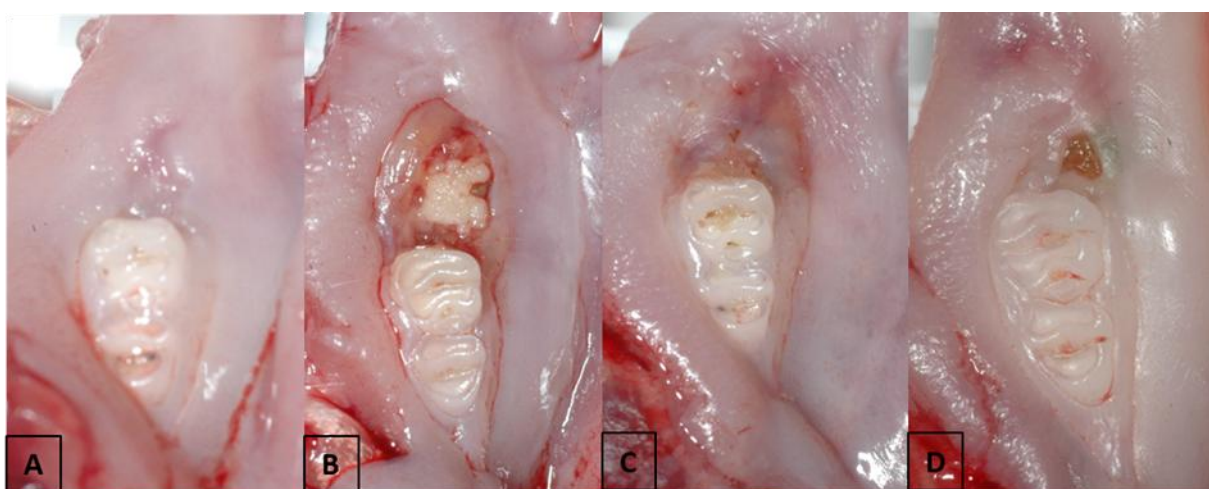
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise Clínica

A análise clínica foi realizada logo após a eutanásia dos animais, foi feita uma classificação visualmente da região alveolar, onde cada hemi-mandíbula de cada grupo recebeu um score, classificado da seguinte forma: Grau 0 - Mucosa curada e nenhum osso necrótico aparente no local de extração; Grau 1 - Nenhuma evidência clínica de osso necrótico, mas não específicas no local de extração; Grau 2 - Osso exposto/necrótico sem sinais de infecção; Grau 3 - Osso exposto/necrótico com sinais de infecção no local de extração; Grau 4 - Osso exposto/necrótico com infecção e osso exposto/necrótico que se estende além a região do osso alveolar. Na sequência, vem os gráficos que representam os resultados obtidos em cada grupo experimental.

A partir dos dados resultantes, pode-se observar que o grupo soro, foi o que apresentou a região alveolar com menores taxas de osso necrótico, entretanto, os grupos ZOL, GPS e GSA apresentaram maiores taxas de tecido mucoso não reparado e a presença de osso exposto

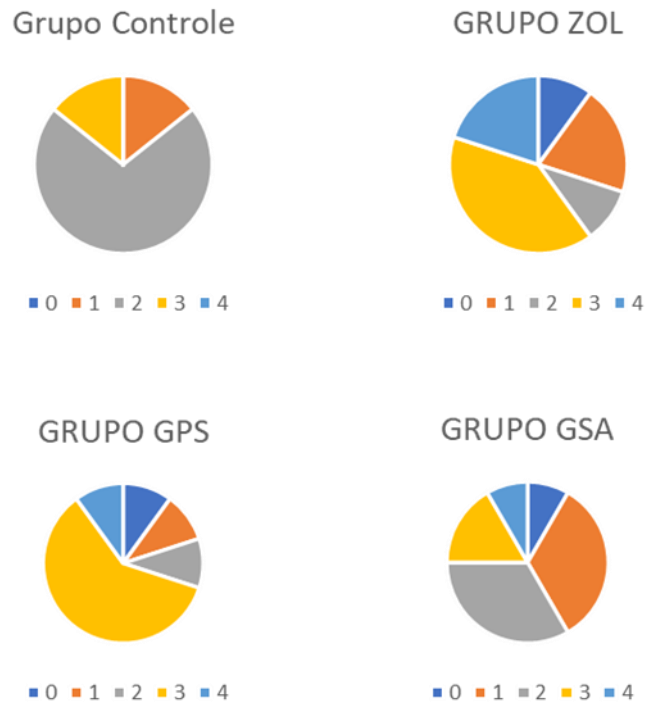
**Figura 5- Fotos Clínicas representativas dos grupos experimentais**



Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

**A)** Análise clínica grupo controle **B)** Análise clínica grupo ZOL **C)** Análise clínica grupo GPS **D)** Análise clínica grupo GSA

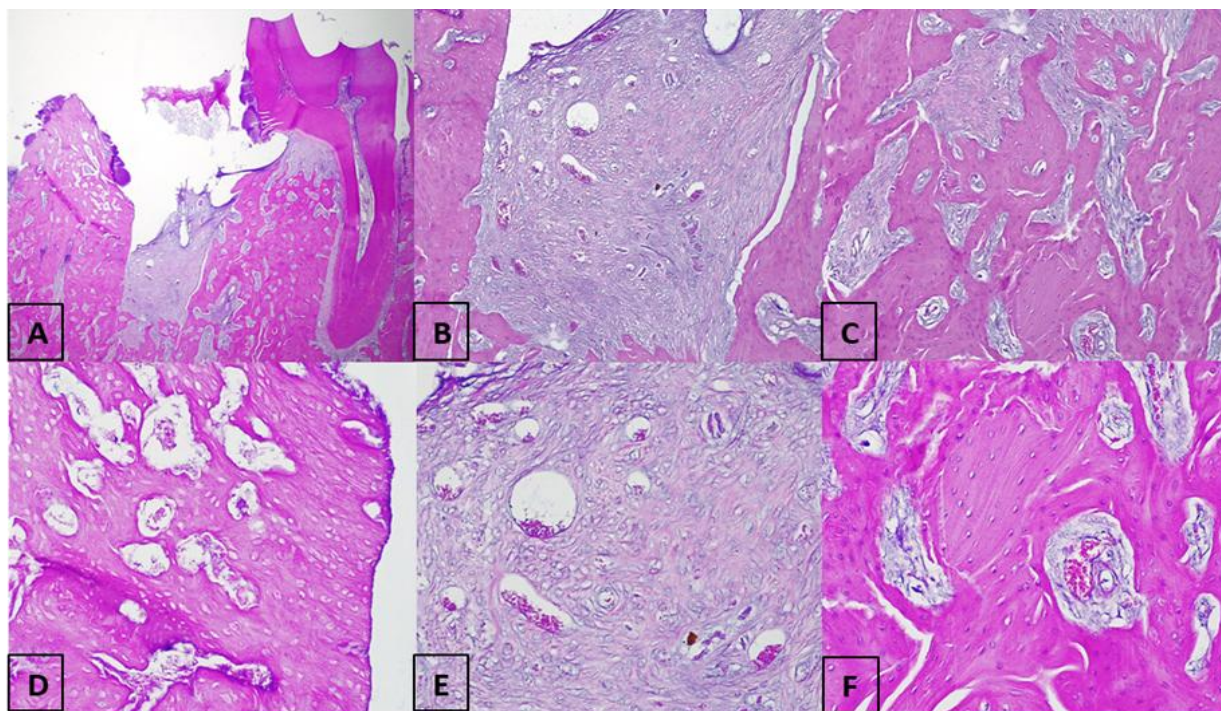
Figura 6 - Gráficos representativos da classificação dos scores obtidos em cada grupo experimental



Fonte: Elaborado pela Autora, 2025  
(a) grupo controle (b) grupo ZOL (c) grupo GPS (d) grupo GSA

## 4.2 Estudo Experimental In Vivo (Tecidos Desmineralizados)

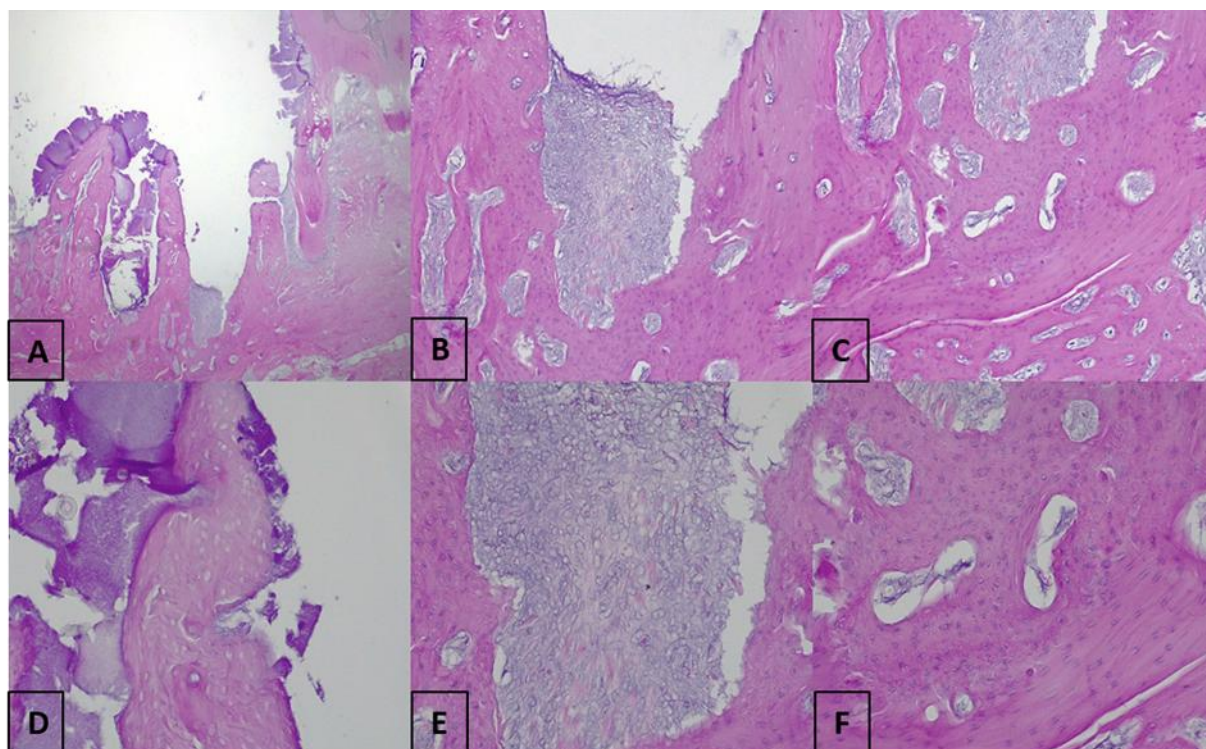
**Figura 7 – Fotomicrografias representativas do grupo ZOL**



Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

(A) Região de alvéolo distal do primeiro molar inferior, aumento de 2,5x (B) Tecido conjuntivo, aumento de 10x (C) Tecido ósseo da região apical, aumento de 10x (D) crista alveolar da região cervical, aumento de 20x, (E) tecido conjuntivo, aumento de 20x (F) Tecido ósseo da região apical, aumento de 20x

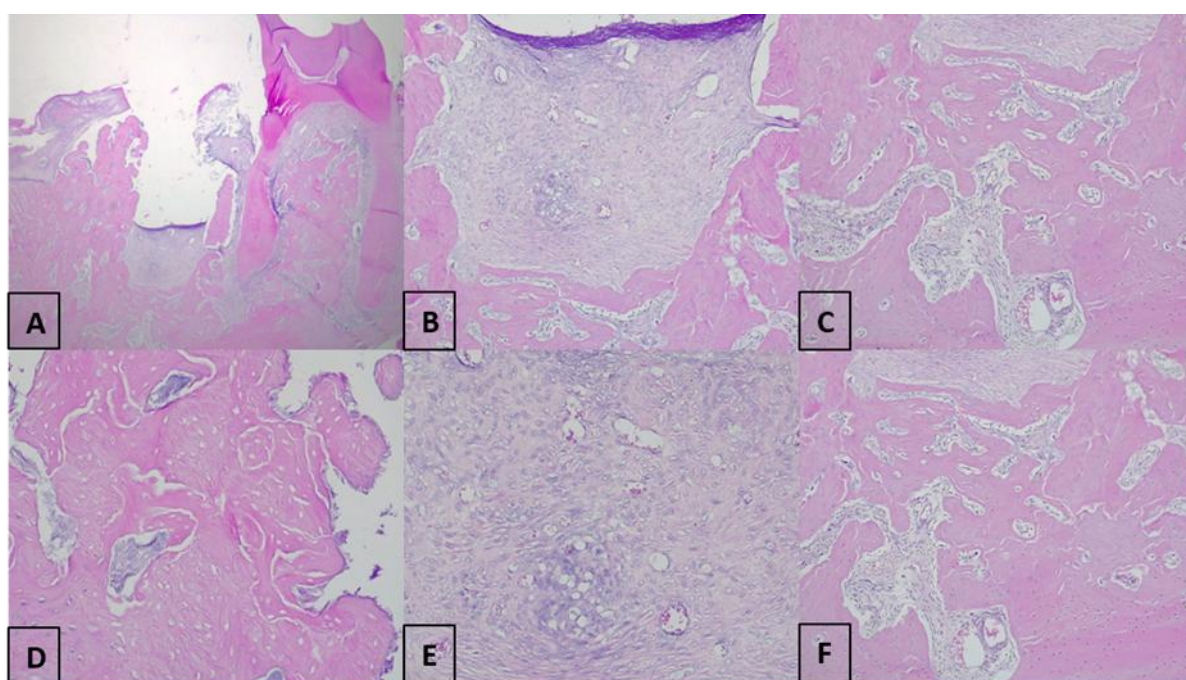
**Figura 8 – Fotomicrografias representativas do grupo GPS**



Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

(A) Região de alvéolo distal do primeiro molar inferior, aumento de 2,5x (B) Tecido conjuntivo, aumento de 10x (C) Tecido ósseo da região apical, aumento de 10x (D) crista alveolar da região cervical, aumento de 20x, (E) tecido conjuntivo, aumento de 20x (F) Tecido ósseo da região apical, aumento de 20x

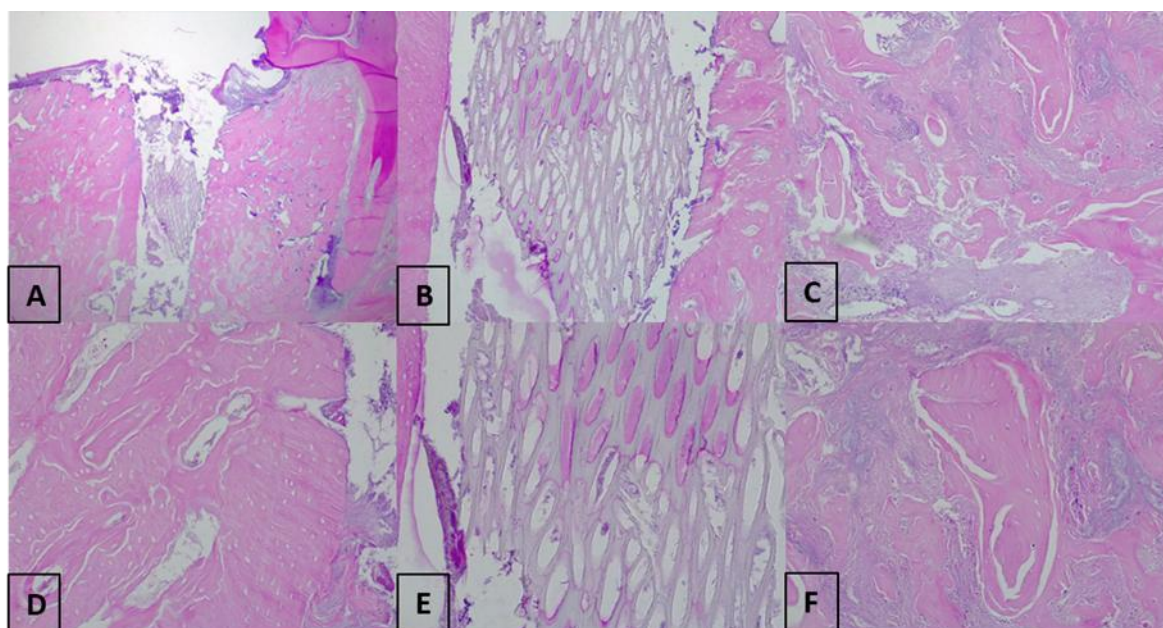
**Figura 9 – Fotomicrografias representativas do grupo GSA**



Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

(A) Região de alvéolo distal do primeiro molar inferior, aumento de 2,5x (B) Tecido conjuntivo, aumento de 10x (C) Tecido ósseo da região apical, aumento de 10x (D) crista alveolar da região cervical, aumento de 20x, (E) tecido conjuntivo, aumento de 20x (F) Tecido ósseo da região apical, aumento de 20x

**Figura 10: Fotomicrografias representativas do grupo GSA**



Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

(A) Região de alvéolo distal do primeiro molar inferior, aumento de 2,5x (B) Alvéolo com a presença de scaffold de alginato não reabsorvido, aumento de 10x (C) Tecido ósseo da região apical, aumento de 10x (D) crista alveolar da região cervical, aumento de 20x, (E) scaffold de alginato não reabsorvido, aumento de 20x (F) Tecido ósseo da região apical, aumento de 20x

### 4.3 Análise Histológica Qualitativa

A análise histológica foi realizada na região de interesse (alvéolo distal do primeiro molar inferior), baseado nos critérios estabelecidos por Ervolino et al., (2019)<sup>16</sup>, avaliando os seguintes critérios: 1) intensidade da resposta inflamatória, 2) extensão da resposta inflamatória, 3) estrutura e padrões celulares do epitélio, 4) estrutura e padrões celulares do tecido conjuntivo e 5) estrutura e padrões celulares do tecido ósseo, para o tempo pós-operatório de 28 dias. Deste modo, as tabelas a seguir descreveram os scores da análise histopatológica, de acordo com resposta inflamatória (Tabela 1) e padrão de estrutura de tecidos (Tabela 2), frente a cada tratamento preventivo proposto.

**Tabela 1 - Parâmetros, scores e distribuição das amostras de acordo com a análise histopatológica do nível de inflamação tecidual no período pós-operatório de 28 dias.**

| <b>ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA: NÍVEL DE INFLAMAÇÃO DO TECIDO</b>        |                      |              |              |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------|--------------|
| PARÂMETROS E RESPECTIVOS SCORES                                      | GRUPOS EXPERIMENTAIS |              |              |
|                                                                      | GZOL<br>(n=6)        | GPS<br>(n=6) | GSA<br>(n=6) |
| <b>INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL</b>                    |                      |              |              |
| (1) ausência de inflamação                                           | 4                    | 5            | 5            |
| (2) quantidade leve de inflamação                                    | 2                    | 1            | 1            |
| (3) quantidade moderada de inflamação                                | -                    |              |              |
| (4) quantidade severa de inflamação                                  | -                    |              |              |
| Mediana                                                              | 1                    | 1            | 1            |
| <b>EXTENSÃO DA INFLAMAÇÃO</b>                                        |                      |              |              |
| (1) ausência de inflamação                                           | 4                    | 5            | 5            |
| (2) extensão parcial do tecido conjuntivo                            | 2                    | 1            | 1            |
| (3) extensão total do tecido conjuntivo, sem alcançar o tecido ósseo | -                    | -            |              |
| (4) extensão total do tecido conjuntivo e tecido ósseo               | -                    | -            |              |
| Mediana                                                              | 1                    | 1            | 1            |

Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

**Tabela 2 – Parâmetros, scores e distribuição das amostras de acordo com a análise histopatológica do padrão de estrutura dos tecidos no período pós-operatório de 28 dias**

| <b>ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA: PADRÃO DE ESTRUTURA DOS TECIDOS</b>                                                                                          |                             |                      |                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|
| <b>PARÂMETROS E RESPECTIVOS SCORES</b>                                                                                                                   | <b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b> |                      |                      |
|                                                                                                                                                          | <b>GZOL<br/>(n=6)</b>       | <b>GPS<br/>(n=6)</b> | <b>GSA<br/>(n=6)</b> |
| <b>PADRÕES CELULARES E ESTRUTURA DO TECIDO EPITELIAL</b>                                                                                                 |                             |                      |                      |
| (1) tecido epitelial com espessura moderada recuperando completamente o local da extração                                                                | 1                           | -                    | -                    |
| (2) tecido epitelial com espessura fina recuperando completamente o local da extração                                                                    | -                           | -                    | -                    |
| (3) fina camada de tecido epitelial apenas nas bordas da ferida cirúrgica aberta                                                                         | 2                           | 1                    | 5                    |
| (4) ausência de tecido epitelial na ferida cirúrgica aberta                                                                                              | 3                           | 5                    | 1                    |
| Mediana                                                                                                                                                  | 4                           | 4                    | 3                    |
| <b>PADRÕES CELULARES E ESTRUTURA DO TECIDO CONJUNTIVO</b>                                                                                                |                             |                      |                      |
| (1) quantidade moderada de fibroblasto e grande quantidade de fibras colágenas                                                                           | 2                           | 1                    | -                    |
| (2) quantidade moderada de fibroblasto e de fibras colágenas                                                                                             | 2                           | 1                    | 3                    |
| (3) pequena quantidade de fibroblastos e fibras colágenas                                                                                                | -                           | -                    | -                    |
| (4) desorganização severa do tecido, com áreas de necrose                                                                                                | 2                           | 4                    | 3                    |
| Mediana                                                                                                                                                  | 2                           | 4                    | 2                    |
| <b>PADRÕES CELULARES E ESTRUTURA DO TECIDO ÓSSEO</b>                                                                                                     |                             |                      |                      |
| (1) ausência de osso não vital nas adjacências do local da extração e osso trabecular preenchendo mais da metade do alvéolo dentário                     | -                           | -                    | -                    |
| (2) ausência de osso não vital nas adjacências do local da extração e osso trabecular preenchendo menos da metade do alvéolo dentário                    | -                           | -                    | -                    |
| (3) presença de muitas áreas com osso não vital nas adjacências do local da extração e osso trabecular preenchendo menos de um terço do alvéolo dentário | 4                           | 2                    | 3                    |
| (4) presença de muitas áreas com osso não vital na adjacência do local da extração e osso trabecular preenchendo menos de um terço do alvéolo dentário   | 2                           | 4                    | 3                    |
| Mediana                                                                                                                                                  | 3                           | 4                    | 3                    |

Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

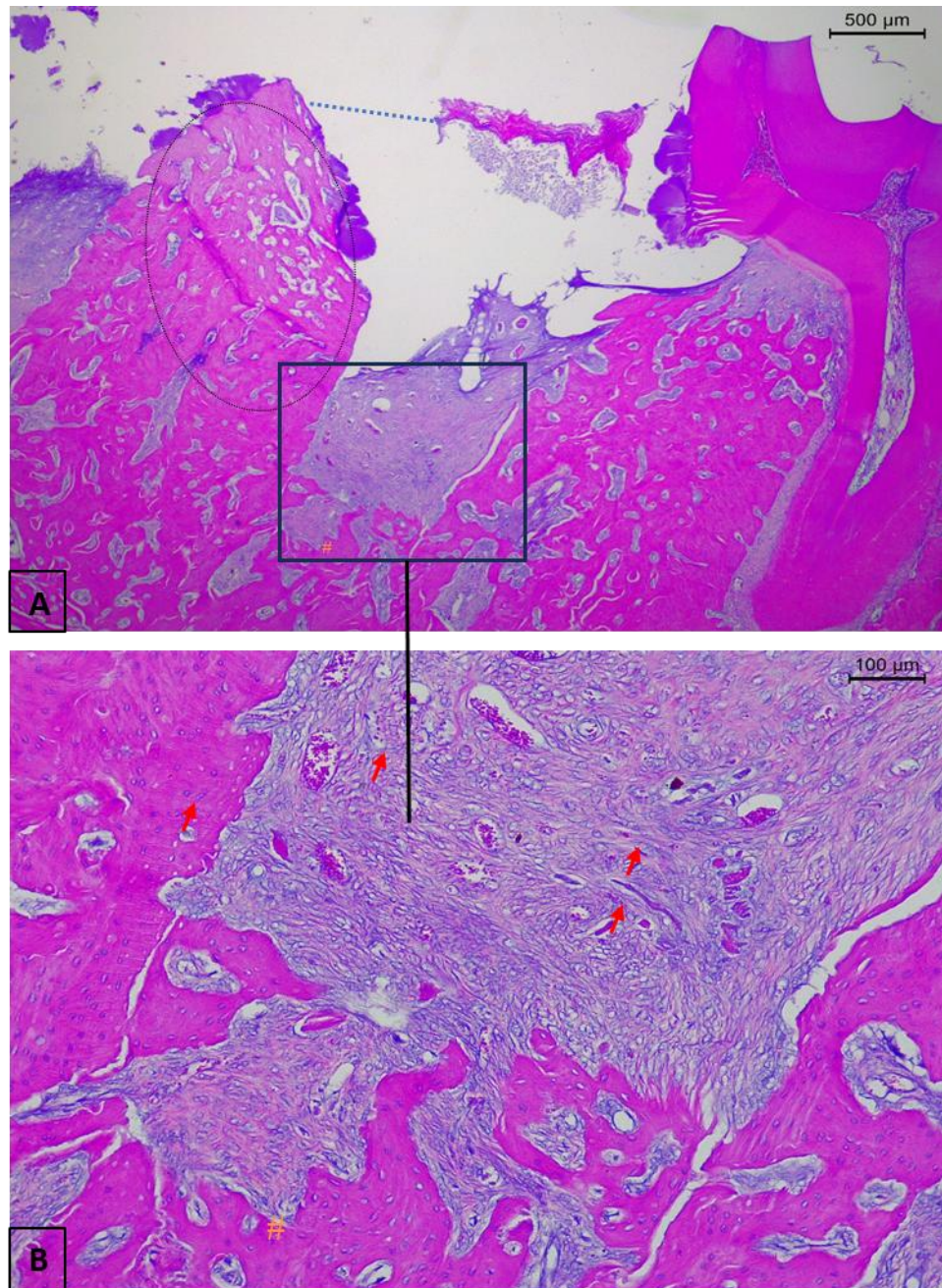
As fotomicrografias foram realizadas na região de alvéolo distal do primeiro molar inferior esquerdo, e as fotos em maiores aumentos também correspondem a esta respectiva região. Onde consegue se observar com clareza o dente adjacente, que corresponde ao segundo molar inferior esquerdo, o alvéolo preenchido por tecido conjuntivo frouxo, osso peri-alveolar, e o tecido epitelial descontínuo em alguns casos ou a sua ausência.

A partir da análise histológica, pode ser observado a dificuldade de epitelização que ocorreu para recobrir a região alveolar. Também pode ser notado a manutenção do osso alveolar, entretanto, revelou-se a presença de um osso não vital nos terços cervical e médio, e a formação de um tecido conjuntivo frouxo no terço apical do alvéolo, tendo isto ocorrido em todos os grupos deste estudo. Não houve evidências de alvéolos que tenham sido preenchidos por células ósseas, apenas notou-se a presença de células ósseas vitais no terço apical, indicando a vitalidade presente nesta região.

### **Grupo ZOL**

No grupo ZOL observa-se no terço apical a formação de um tecido conjuntivo frouxo, organizado, com ausência de células inflamatórias, numerosos vasos sanguíneos (seta vermelha). Nota-se descontinuidade de tecido epitelial recobrindo o alvéolo (linha tracejada azul). Em relação ao tecido ósseo, tem a presença de osso não vital nos terços cervical e médio (círculo tracejado preto), no terço apical há presença de tecido ósseo vital em formação substituindo o tecido conjuntivo (hashtag verde).

**Figura 11 – Fotomicrografias representativas do grupo ZOL**



Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

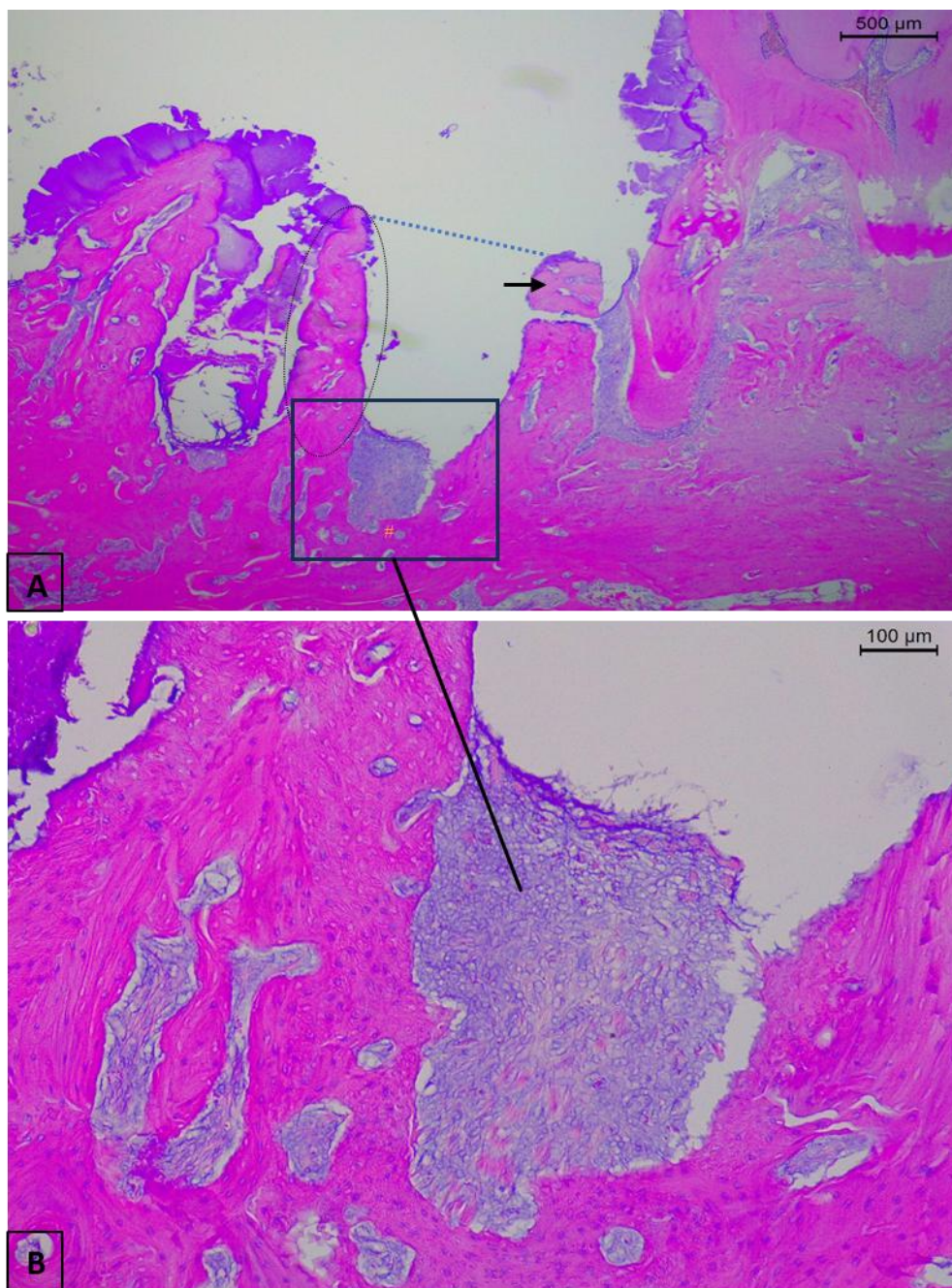
(A) Região de alvéolo distal do primeiro molar inferior, aumento de 2,5x (B) Tecido conjuntivo, aumento de 10x.

### **Grupo GPS**

Neste grupo foi possível observar a presença de tecido conjuntivo organizado no terço apical do alvéolo com ausência de infiltrado inflamatório, presença de estruturas indicativas de remanescentes do biomaterial pirofosfato de cálcio

incorporado aos scaffolds de alginato e discretos vasos sanguíneos na região (seta vermelha). Os terços cervical e médio apresentaram espaço vazio com a ausência de tecido epitelial recobrindo o alvéolo (linha tracejada azul). No tecido ósseo, observa-se a presença de um osso não vital (lacunas vazias) no terço cervical e médio (círculo tracejado preto), fragmento ósseo solto em terço apical sem vitalidade, sugestivo de sequestro ósseo (seta preta). No entanto, houve neoformação óssea (osso vital) nas áreas circundantes do terço apical com lamelas espessas (hashtag verde).

**Figura 12 – Fotomicrografias representativas do grupo GPS**



Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

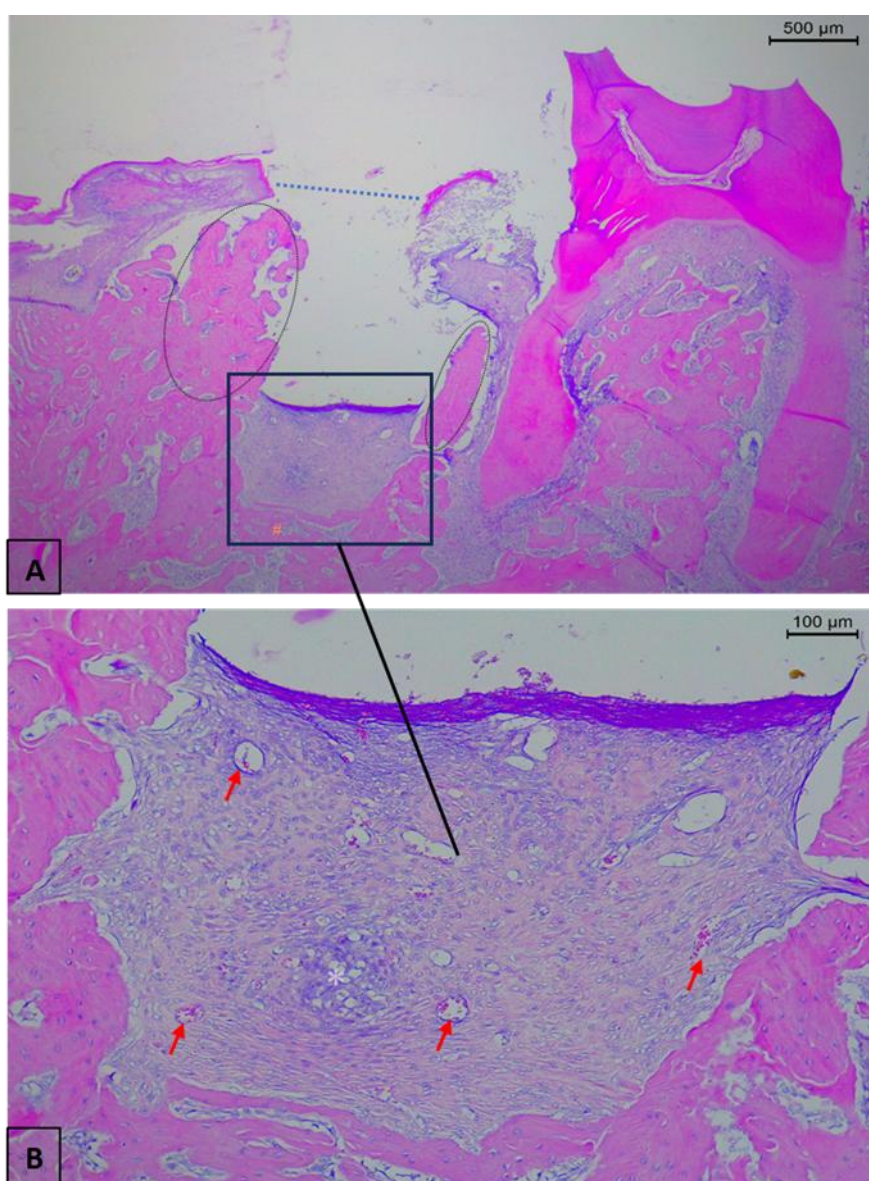
(A) Região de alvéolo distal do primeiro molar inferior, aumento de 2,5x (B) Tecido conjuntivo, aumento de 10x.

### **Grupo GSA**

Observa-se a presença de um tecido conjuntivo organizado no terço apical com infiltrado inflamatório leve a moderado (asterisco amarelo) e quantidade relativa de vasos sanguíneos presentes na região (setas vermelhas). Nota-se

descontinuidade/ausência de epitélio recobrindo o alvéolo (linha tracejada azul). Em relação ao tecido ósseo, há sugestão de neoformação óssea e presença de osso vital restrita ao terço apical (hashtag verde) e partes do terço médio, enquanto todo o terço cervical apresenta lacunas de osteócitos vazias (sem núcleo), que o caracterizam como osso não vital (círculo tracejado preto), não houve presença de infiltrados inflamatórios no tecido ósseo.

**Figura 13 – Fotomicrografias representativas do grupo GSA**



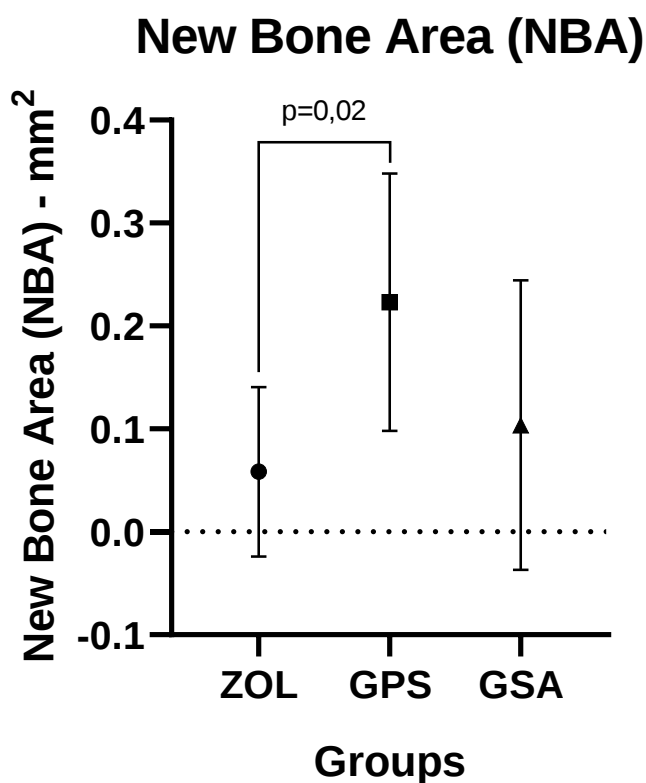
Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

(A) Região de alvéolo distal do primeiro molar inferior, aumento de 2,5x (B) Tecido conjuntivo, aumento de 10x.

#### 4,4 Análise Histométrica

Em relação ao nível de tecido ósseo neoformado (NBA), analisado através de programa Sigma Plot, com o valor de ( $P = 0,031$ ), o grupo ZOL apresentou de área de tecido ósseo 0,0584% com Desvio Padrão (DP) de 0,0824, o grupo GPS com 0,223% (DP de 0,125), e o grupo GSA 0,103% (DP de 0,141). Houve diferença estatística apenas entre os grupos ZOL e GPS ( $P = 0,0289$ ), que foi o grupo que apresentou os maiores valores, quando comparado aos demais grupos.

Figura 14 – Gráfico da Área de neoformação óssea (NBA)

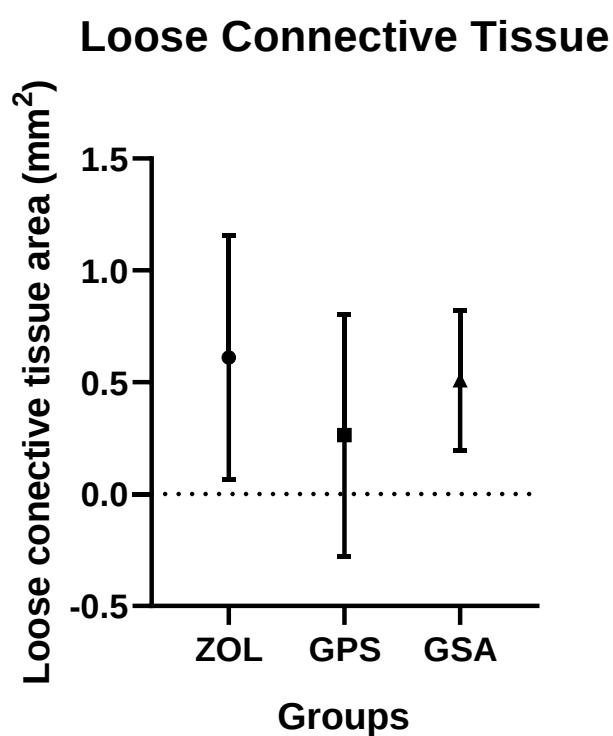


Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

O tecido conjuntivo (LCT) esteve presente em todos os grupos experimentais ( $P = 0,097$ ), o que apresentou os maiores níveis de LCT, foi o grupo ZOL com 0,611% (DP de 0,546), o grupo GSA veio na sequência com 0,508% (DP de 0,314), e GPS com as menores taxas 0,263% (DP de 0,263), não houve diferença estatística

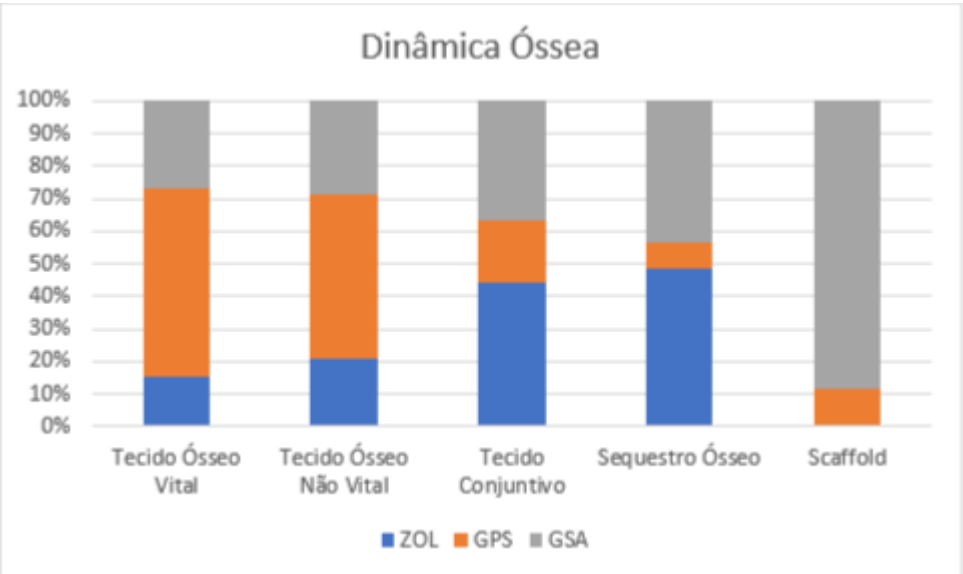
significativa entre os grupos. Também foi avaliada a dinâmica do tecido ósseo, considerando áreas de tecido ósseo não vital, sequestro ósseo e resíduos de Scaffolds de Alginato de sódio também foram encontrados histologicamente, presentes do interior de poucos alvéolos. (Gráfico 16).

**Figura 15- Gráfico Área de Tecido conjuntivo**



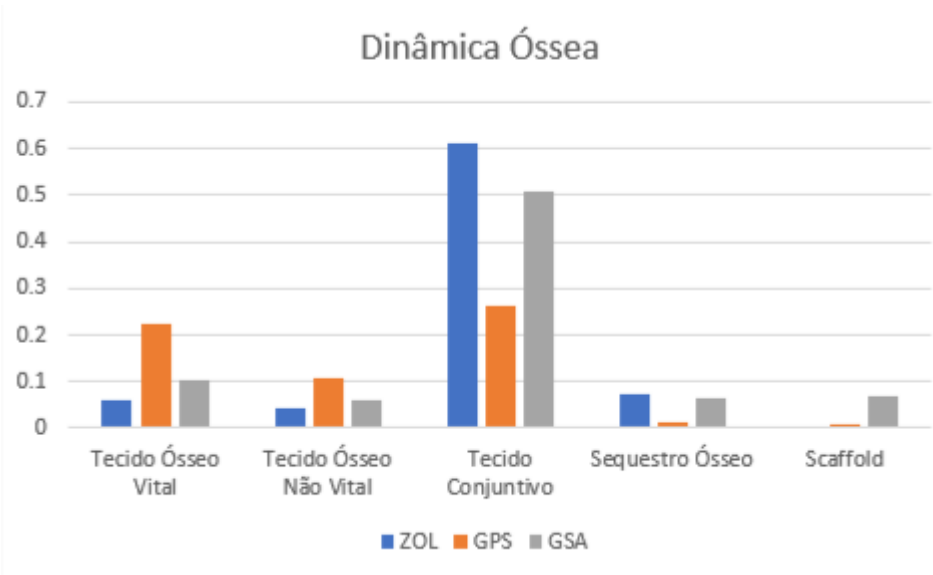
Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

Figura 16- Gráfico da Dinâmica Óssea



Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

Figura 17 – Gráfico Dinâmica Óssea



Fonte: Elaborado pela Autora, 2025

## 5 DISCUSSÃO

Com este estudo, se esperava que a incorporação de pirofosfato de cálcio em scaffold de alginato de sódio fosse capaz de promover a reparação alveolar em ratos submetidos ao tratamento com ácido zoledrônico, resultando em neoformação óssea na região alveolar e impedindo o acontecimento da OMIM. Apesar da OMIM ser menos evidente nos grupos GPS e GSA, em comparação ao grupo ZOL, nos dois primeiros grupos também não se observou o fechamento total do alvéolo por tecido ósseo, o que indica um considerável atraso no processo de reparação alveolar.

Pesquisas prévias conduzidas pelo grupo de estudo, seguindo a mesma abordagem metodológica evidenciaram benefícios do biomaterial composto por beta-tricálcio-fosfato em alvéolos de animais tratados com ácido zoledrônico, evitando a ocorrência da OMIM<sup>18</sup>. Embora o pirofosfato de cálcio apresente uma ação semelhante aos bisfosfonatos, o que pode parecer um contrassenso para a sua aplicação na prevenção de OMIM, estudos científicos sugerem que este biomaterial pode proporcionar vantagens, sendo elas: favorece a neoformação óssea, promove diretamente a diferenciação de células mesenquimais em osteogênicas, aprimorando assim os processos de regeneração, osteoindução e neoformação óssea <sup>33</sup>.

O mecanismo de ação dos bisfosfonatos é agir diretamente no turnover ósseo, inibindo a diferenciação de células osteoclásticas<sup>40</sup>, sendo um efeito confirmado neste estudo, no qual o grupo ZOL exibiu um atraso significativo no processo de reparação alveolar em decorrência das interferências diretas e negativas na homeostasia óssea. Foi igualmente notado este atraso nos grupos GPS e GSA, particularmente nas áreas cervical e média, onde observou-se um tecido ósseo sem vitalidade, devido à presença de células ósseas anucleadas, particularmente na região de crista alveolar. Já existem provas que comprovam impactos adversos dessa medicação também nos osteoblastos<sup>41</sup>. Neste estudo, a indução da OMIM, por meio do modelo experimental sugerido demonstrou eficácia, conforme os resultados alcançados, particularmente no grupo ZOL, que exibiu osso sem vitalidade durante o processo de reparação alveolar, além de áreas de sequestro ósseo. Resultados parecidos foram relatados em pesquisa anterior publicada<sup>35</sup>.

Nesta pesquisa, a análise histológica qualitativa revelou que os grupos GPS, ZOL e GSA não apresentaram fechamento primário do alvéolo após 28 dias de reparo alveolar, com exceções raras, nas quais o alvéolo era recoberto por uma fina camada de epitélio. Esta ausência foi mais notável no grupo ZOL, onde todas as amostras exibiram um epitélio sem continuidade. Este fenômeno pode ser explicado pela significativa citotoxicidade dos bifosfonatos sobre os fibroblastos, células cruciais para o reparo alveolar, o qual depende dos fibroblastos oriundos do ligamento periodontal. Observaram-se resultados similares em estudo *in vitro* com culturas de células<sup>42</sup>. Clinicamente, a deficiência na reparação alveolar foi evidenciada pela presença de tecido ósseo exposto, indicando obstáculos para o fechamento adequado do alvéolo e a completa recuperação tecidual da área, particularmente no grupo ZOL.

Ao analisar a resposta inflamatória nos grupos ZOL, GPS e GSA, uma diminuição de células inflamatórias foi notada na área, sendo quase inexistentes em alguns animais analisados. Vale salientar a importância da resposta inflamatória para o reparo alveolar, especialmente durante a etapa exsudativa. Contudo, no nosso estudo, o período de análise foi de 28 dias pós-operatórios, ultrapassando consideravelmente a fase exsudativa nos alvéolos de ratos<sup>16</sup>. Outra pesquisa indica que, quando ocorre uma pré-estimulação inflamatória no local, pode haver uma inflamação, intensificando problema pré-existente<sup>44</sup>. Esse impacto não foi detectado no grupo GPS em nosso estudo, pois o pirofosfato de cálcio não causou inflamação na área, o que pode acontecer devido à sua biocompatibilidade.

A análise histológica dos grupos GPS e GSA revelou a formação de tecido conjuntivo na área apical do alvéolo, marcada pela presença de discretos vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras de colágeno. O pirofosfato de cálcio ao modular a reparação alveolar não induziu a formação de tecido ósseo no interior do alvéolo, o que pode ser decorrente da sua reabsorção ser mais rápida em comparação ao beta-tricálcio-fosfato. Essa propriedade pode ter restringido o tempo necessário para que o material induzisse osteocondução, neoformação óssea e reparação alveolar em ratos submetidos ao tratamento com ácido zoledrônico.

Deve-se destacar que o grupo GPS evidenciou vestígios do biomaterial pirofosfato de cálcio (figura 12) enquanto um animal do grupo GSA (figura 10) exibiu

um scaffold de alginato não absorvido no interior do alvéolo. Uma observação similar foi notada em uma pesquisa anterior publicada<sup>45</sup>.

Em conclusão, salienta-se o caráter inovador deste estudo, que é o primeiro a analisar o reparo ósseo alveolar com pirofosfato de cálcio em animais tratados com ácido zoledrônico. Entretanto, o tempo de avaliação de 28 dias deste estudo limita a compreensão do efeito do biomaterial nas fases iniciais do reparo alveolar, como nos períodos de 7 e 14 dias. Mesmo com essas limitações, esta pesquisa destacou os efeitos do pirofosfato de cálcio no reparo alveolar em ratos tratados com ácido zoledrônico, considerando aspectos clínicos e histológicos.

## **6 CONCLUSÃO**

A partir dos dados resultantes, conclui-se que o protocolo medicamentoso proposto foi capaz de induzir a OMIM, e as terapias preventivas não se mostraram eficazes para induzir neoformação óssea e modular o reparo alveolar em ratos tratados com ácido zoledrônico.

## REFERÊNCIAS

1. Wang Q, Liu J, Qi S, Liao X, Liu D, Pan J. Clinical analysis of medication related osteonecrosis of the jaws: a growing severe complication in China. *J Dent Sci.* 2018;13(3):190-7. doi: 10.1016/j.jds.2017.12.003.
2. 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.
3. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw: 2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72(10):1938-56. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.031.
4. Hagiwara M, Delea TE, Cong Z, Chung K. Utilization of intravenous bisphosphonates in patients with bone metastases secondary to breast, lung, or prostate cancer. *Support Care Cancer.* 2014;22(1):103-13. doi: 10.1007/s00520-013-1951-z.
5. Zhang J, Wang R, Zhao YL, Sun XH, Zhao HX, Tan L, et al. Efficacy of intravenous zoledronic acid in the prevention and treatment of osteoporosis: a meta-analysis. *Asian Pac J Trop Med.* 2012;5(9):743-8. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60118-7.
6. Petrovic M, Jelovac DB, Antic S, Antunovic M, Lukic N, Sabani M, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaws: two center retrospective cohort studies. *Biomed Res Int.* 2019;2019:8345309. doi: 10.1155/2019/8345309.
7. Bamias A, Kastiris E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol.* 2005;23(34):8580-7. doi: 10.1200/JCO.2005.02.8670.
8. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011;49(1):2-19. doi: 10.1016/j.bone.2011.04.022.
9. Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008;19(6):733-59. doi: 10.1007/s00198-007-0540-8.
10. Frith JC, Mönkkönen J, Auriola S, Mönkkönen H, Rogers MJ. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum.* 2001;44(9):2201-10. doi: 10.1002/1529-0131(200109)44:9<2201::aid-art374>3.0.co;2-e.
11. Reszka AA, Rodan GA. Nitrogen-containing bisphosphonate mechanism of action. *Mini Rev Med Chem.* 2004;4(7):711-9.

12. Jain V, Seith A, Manchanda S, Pillai R, Sharma DN, Mathur VP. Effect of intravenous administration of zoledronic acid on jaw bone density in cases having skeletal metastasis: a prospective clinical study. *J Indian Prosthodont Soc.* 2019;19(3):203-9. doi: 10.4103/jips.jips\_368\_18.
13. Statkievicz 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.
14. Rupel K, Ottaviani G, Gobbo M, Contardo L, Tirelli G, Vescovi P, et al. A systematic review of therapeutical approaches in bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Oncol.* 2014;50(11):1049-57. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.08.016.
15. Johnson King O, Halai T, Eyeson J. Case report of atypical osteonecrosis of the jaws: a clinical dilemma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2019;57(4):371-3. doi: 10.1016/j.bjoms.2019.03.013.
16. Ervolino E, Statkievicz 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.
17. Toro LF, Mello-Neto JM, Santos FFVD, Ferreira LC, Statkievicz C, Cintra LTÂ, et al. Application of autologous platelet-rich plasma on tooth extraction site prevents occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws in rats. *Sci Rep.* 2019;9(1):22. doi: 10.1038/s41598-018-37063-y.
18. Hadad H, Jesus LK, Santos AFP, Matheus HR, Rodrigues LGS, Poli PP, et al. Beta tricalcium phosphate, either alone or in combination with antimicrobial photodynamic therapy or doxycycline, prevents medication-related osteonecrosis of the jaw. *Sci Rep.* 2022;12(1):16510. doi: 10.1038/s41598-022-20128-4.
19. Silva JR, Balbas MCM, Corrêa CÁ, Zanela M, Okamoto R, Pereira RDS, et al. The role of bone grafts in preventing medication-related osteonecrosis of the jaw: histomorphometric, immunohistochemical, and clinical evaluation in animal model. *Craniofac Trauma Reconstr.* 2022;15(4):304-11. doi: 10.1177/19433875211048367.
20. Schmidt LE, Hadad H, Vasconcelos IR, Colombo LT, Silva RC, Santos AFP, et al. Critical defect healing assessment in rat calvaria filled with injectable calcium phosphate cement. *J Funct Biomater.* 2019;10(2):21. doi: 10.3390/jfb10020021.
21. Soares MQS, Van Dessel J, Jacobs R, Santos PSS, Cestari TM, Garlet GP, et al. Zoledronic acid induces site-specific structural changes and decreases vascular area in the alveolar bone. *J Oral Maxillofac Surg.* 2018;76(9):1893-901. doi: 10.1016/j.joms.2018.03.007.

22. Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Aracatuba*. 1973;2(2):153-69.
23. Kim JW, Alfafara AMD, Kim HY, Kim SY, Kim SJ. Effects of pH alteration on the pathogenesis of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Bone*. 2019;122:45-51. doi: 10.1016/j.bone.2019.02.007.
24. Tanaka Y, Aung KT, Ono M, Mikai A, Dang AT, Hara ES, et al. Suppression of bone necrosis around tooth extraction socket in a MRONJ-like mouse model by E-rhBMP-2 containing artificial bone graft administration. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12823. doi: 10.3390/ijms222312823.
25. Funayama N, Yagyu T, Imada M, Ueyama Y, Nakagawa Y, Kirita T. Impact of beta-tricalcium phosphate on preventing tooth extraction-triggered bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. *Sci Rep*. 2023;13(1):16032. Published 2023 Sep 25. doi:10.1038/s41598-023-43315-3.
26. Debone R, Pelizaro TAG, Rodriguez-Chanfrau JE, Almirall A, Serna L, Veranes-Pantoja Y. Calcium phosphates nanoparticles : the effect of freeze-drying on particle size reduction. *Mater Chem Phys*. 2020;239. doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.122004.
27. Lee KS, Han HS, Kim YC, Han JHL, Seung RH, Lee HS, et al. Evaluation of porous  $\beta$ -calcium pyrophosphate as bioresorbable bone graft substitute material, *Mater Res Innov*. 2015;19(2):86-90. doi: 10.1179/1433075X14Y.0000000215.
28. Windarti T, Haris A, Astuti Y, Darmawan A. Synthesis of  $\beta$ -calcium pyrophosphate by sol-gel method. *Mater Sci Eng*. 2017;172:012058. doi: 10.1088/1757-899X/172/1/012058.
29. Rosini S, Rosini S, Bertoldi I, Frediani B. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(17):3309-17.
30. Safronova T, Kiselev A, Selezneva I, Shatalova T, Lukina Y, Filippov Y, et al. Bioceramics based on  $\beta$ -calcium pyrophosphate. *Materials*. 2022;15(9):3105. doi: 10.3390/ma15093105.
31. Pinto GC. Biofabricação 3D: obtenção de scaffolds de blendas biodegradáveis contendo fosfatos de cálcio para medicina regenerativa de tecidos [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2023.
32. Grover LM, Wright AJ, Gbureck U, Bolarinwa A, Song J, Liu Y, et al. The effect of amorphous pyrophosphate on calcium phosphate cement resorption and bone generation. *Biomaterials*. 2013;34(28):6631-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.001.
33. Svensson S, Palmer M, Svensson J, Johansson A, Engqvist H, Omar O, et al. Monocytes and pyrophosphate promote mesenchymal stem cell viability and early

osteogenic differentiation. *J Mater Sci Mater Med*. 2022;33(1):11. doi: 10.1007/s10856-021-06639-y.

34. Curra C, Cardoso CL, Ferreira Júnior O, Curi MM, Matsumoto MA, Cavenago BC, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw. Introduction of a new modified experimental model. *Acta Cir Bras*. 2016;31(5):308-13. doi: 10.1590/S0102-865020160050000003.

35. Bi Y, Gao Y, Ehrichtiou D, et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am J Pathol*. 2010;177(1):280-290. doi: 10.2353/ajpath.2010.090592.

36. Sarkarat F, Kalantar Motamedi MH, Jahanbani J, Sepehri D, Kahali R, et al. Platelet-rich plasma in treatment of zoledronic acid-induced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Trauma Mon*. 2014;19(2):e17196. doi: 10.5812/traumamon.17196.

37. Yang H, Pan H, Yu F, Chen K, Shang G, Xu Y. A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):5161-7.

38. Basso FG, Soares DG, Pansani TN, Turrioni AP, Scheffel DL, Hebling J, et al. Response of a co-culture model of epithelial cells and gingival fibroblasts to zoledronic acid. *Braz Oral Res*. 2016;30(1):e122. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0122.

39. Hemmi T, Yusa K, Ishikawa S, Takano H, Fukuda M, Iino M. Synergistic effect of zoledronate and compressive force suppresses proliferation and differentiation of human gingival fibroblasts. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2024;62(1):63-70. doi: 10.1016/j.bjoms.2023.10.018.

40. Grimm S, Mundethu A, Symmank J, Hennig C, Walter C, Reichardt E, et al. Compressive force strengthened the pro-inflammatory effect of zoledronic acid on il-1 $\beta$  stimulated human periodontal fibroblasts. *Clin Oral Investig*. 2021;25(6):3453-61. doi: 10.1007/s00784-020-03667-w.

41. García-García P, Reyes R, Pérez-Herrero E, Arnau MR, Évora C, Delgado A. Alginate-hydrogel versus alginate-solid system. Efficacy in bone regeneration in osteoporosis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;115:111009. doi: 10.1016/j.msec.2020.111009.

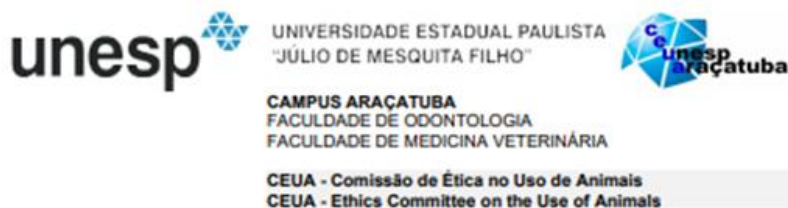
42. Lee GS, Park JH, Shin US, Kim HW. Direct deposited porous scaffolds of calcium phosphate cement with alginate for drug delivery and bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2011;7:3178–3186. doi: 10.1016/j.actbio.2011.04.008.

43. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2012;29(1):1-63. doi: 10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v29.i1.10.

44. Preethi Soundarya S, Haritha Menon A, Viji Chandran S, Selvamurugan N. Bone tissue engineering: scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. *Int J Biol Macromol*. 2018;119:1228-39.
45. Zielińska A, Karczewski J, Eder P, Kolanowski T, Szalata M, Wielgus K, et al. Scaffolds for drug delivery and tissue engineering: the role of genetics. *J Control Release*. 2023;359:207-23.
46. Lee GS, Park JH, Shin US, Kim HW. Direct deposited porous scaffolds of calcium phosphate cement with alginate for drug delivery and bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2011;7(8):3178-86. doi: 10.1016/j.actbio.2011.04.008

## ANEXOS

### ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Análise da prevenção da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos com pirofosfato de cálcio associado ou não ao óleo ozonizado. Estudo in vivo"**, Processo FOA nº 451-2023, sob responsabilidade de Francisley Ávila Souza apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 27 de Junho de 2023.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 27 de Junho de 2025.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 27 de Julho de 2025.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Analysis of the prevention of osteonecrosis of the jaws induced by drugs with calcium pyrophosphate associated or not with ozonized oil. In vivo study"**, Protocol FOA nº 451-2023, under the supervision of Francisley Ávila Souza presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 27, 2023.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** June 27, 2025.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** July 27, 2025.

**Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

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