

ISABELLA BACARIN BOCARDE MOTTA

**Análise da fisiopatologia da osteonecrose dos
maxilares induzida por zoledronato em ratas adultas
ovariectomizadas submetidas a extração dentária**

ISABELLA BACARIN BOCARDE MOTTA

**Análise da fisiopatologia da osteonecrose dos
maxilares induzida por zoledronato em ratas adultas
ovariectomizadas submetidas a extração dentária**

Trabalho de Conclusão de Curso
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Bacharel em
Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, UNESP

**Orientadora: Prof^a. Dr^a.
Alessandra Marcondes Aranega**

**Araçatuba - SP
2025**

Dedico este trabalho aos meus pais e as minhas irmãs que sonharam e fizeram o possível e o impossível para que se tornasse realidade. Por todo esforço, pela paciência, pela educação e amor permitindo que eu chegasse a este momento. Sem vocês eu não sou nada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder força, perseverança e saúde para concluir esta etapa. Por me ajudar a vencer todas as barreiras e me manter cada vez mais forte. Sei que Você sempre está e esteve comigo de mãos dadas.

À minha mãe, Eliane, cuja força e amor foram os alicerces da minha caminhada. Sei que, ao longo da minha trajetória, você abdicou de muito em sua vida para que eu pudesse ter oportunidades, crescer e conquistar meus sonhos. Seu sacrifício e sua dedicação incansável são a prova do mais puro amor, e por isso, sou eternamente grata. Este trabalho é para você.

Ao meu pai, Marcelo, por estar sempre ao meu lado, me ouvindo, aconselhando e incentivando em cada passo da minha jornada. Sua competência e habilidade são inspirações para mim, e espero um dia alcançar a mesma excelência que tanto admiro em você.

Às minhas irmãs, Andréa e Marcela, pelo apoio inestimável à nossa mãe e pela paciência ao longo dessa jornada. O suporte foi essencial, e sou imensamente grata por tê-las ao meu lado.

À minha querida dupla, Leonardo Calore, com quem compartilhei não apenas desafios acadêmicos, mas também conquistas, risadas e momentos inesquecíveis. Sua parceria, dedicação e amizade tornaram essa jornada muito mais leve e significativa. Obrigado por cada troca de aprendizado, pelo apoio nos dias difíceis, pela paciência nos atendimentos e por estar ao meu lado sempre. Este trabalho é a prova do nosso esforço conjunto, e tenho a certeza de que levarei para sempre o que construímos juntos, dentro e fora da faculdade. Sem você, eu não conseguiria.

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

Agradeço ao Professor Leonardo Perez Faverani, pelos mais de 3 anos de iniciação científica. Por acreditar em mim até quando eu mesma não acreditava. Obrigada pelo incentivo, pela calma, pela paciência e pelo carinho imenso que o Senhor tem com todos os alunos.

Ao Leonardo Alan Delanora, minha mais profunda gratidão por todas as oportunidades que me proporcionou ao longo desses anos. Seu apoio, paciência e ensinamentos foram fundamentais em cada etapa da minha jornada acadêmica. Desde os trabalhos apresentados em congressos até a construção do meu projeto de pesquisa, sua dedicação e incentivo fizeram toda a diferença. Obrigado por compartilhar seu conhecimento, acreditar no meu potencial e estar presente nos momentos mais desafiadores. Seu impacto na minha trajetória será lembrado para sempre.

À Professora Alessandra Aranega, minha profunda gratidão pelo imenso amor, paciência e dedicação que transmite em cada ensinamento. Sua calma, didática e paixão pelo que faz refletem diretamente no aprendizado de seus alunos, tornando cada aula um momento valioso. Sou imensamente grata pela oportunidade de ter sido sua monitora e, acima de tudo, por ter acreditado em mim.

À Professora Ana Paula Farnezi Bassi, por todos os ensinamentos durante não só a graduação, mas também no curso de atualização de cirurgia. Obrigada por aceitar ser minha banca e estar comigo nesse dia.

Ao João Gabriel Paulino Mazzon, meu maior encontro na faculdade. Te conhecer foi um verdadeiro presente de Deus. Sou imensamente grata por todos os momentos que compartilhamos ao longo da minha graduação. Obrigada pelo companheirismo, por nunca soltar a minha mão e por estar ao meu lado tanto nos momentos felizes quanto nos difíceis. Sua amizade é um tesouro que levarei comigo para sempre.

Aos meus amigos de Marília, minha mais sincera gratidão. Mesmo à distância, o carinho, o apoio e as palavras de incentivo sempre estiveram presentes, tornando essa caminhada mais leve. Saber que podia contar com vocês em cada etapa dessa jornada foi essencial e me deu forças para seguir em frente. Obrigada por nunca deixarem a distância diminuir nossa amizade e por estarem ao meu lado, torcendo por cada conquista. Levo vocês comigo, sempre!

Gostaria de dedicar um agradecimento especial aos meus amigos de Araçatuba, que me acompanharam ao longo dessa jornada. O apoio e a amizade de vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Agradeço pelo carinho, pelas risadas, e pela força que sempre me deram. Vocês têm um lugar especial no meu coração.

Aos Pacientes, agradeço por depositarem tanta confiança em meu trabalho mesmo sabendo de nossa inexperiência, sempre dispostos a colaborar e pacientes conosco, graças a vocês adquirimos experiências e sabedoria não só pela parte prática da odontologia, mas também a como lidar com o ser humano. A nossa maior satisfação está quando terminamos um trabalho e olhamos para o paciente e ele apresenta um sorriso aberto e feliz pelo resultado. Vocês foram fundamentais para que hoje tornássemos cirurgiões-dentistas. Muito obrigada.

"Não importa a velocidade, desde que você não pare."

Confúcio

Isabella Bacarin

MOTTA IBB, Aranega AM. **Análise da fisiopatologia da osteonecrose dos maxilares induzida por zoledronato em ratas adultas ovariectomizadas submetidas a extração dentária** (Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação). Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2025.

RESUMO

Os bisfosfonatos, como o zoledronato, inibem a reabsorção óssea e são amplamente utilizados no tratamento da osteoporose e de neoplasias. Contudo, seu uso está associado à osteonecrose dos maxilares (ONM-M), condição que pode causar necrose óssea, fraturas patológicas e dor intensa. Este estudo teve como objetivo analisar a fisiopatologia da ONM-M em ratas Wistar ovariectomizadas, com e sem o uso de zoledronato. Foram utilizadas 18 ratas, das quais 4 foram destinadas à medição do estrogênio sérico (estradiol) por ELISA após eutanásia. As 14 ratas restantes foram divididas em dois grupos experimentais: SAL (soro fisiológico) e ZOL (zoledronato 100µg/kg), com 7 animais cada, tratados a cada 3 dias por 7 semanas com as respectivas soluções. Na terceira semana, todos passaram por extração do segundo molar inferior, com osteotomia alveolar padronizada. Após eutanásia na sétima semana, os tecidos foram analisados por microtomografia e histologia. Os achados microtomográficos demonstraram que o grupo ZOL apresentou maior porcentagem de osso não vital, menor volume ósseo, maior porosidade ($p < 0,05$) e a análise histológica confirmaram os achados Micro CT evidenciando a desorganização trabecular, especialmente em casos compatíveis com o estágio 3 da ONM-M, demonstrando que o trauma cirúrgico potencializou a progressão da doença. Esses achados indicam que o modelo experimental utilizado pode ser eficaz na reprodução do estágio mais grave da ONM-M, contribuindo para futuros estudos.

Palavras-chave: osteonecrose; bisfosfonato; ovariectomia; Osteonecrose associada aos bisfosfonatos.

MOTTA IBB, Aranega AM. **Analysis of the pathophysiology of zoledronate-induced osteonecrosis of the jaws in ovariectomized adult rats subjected to tooth extraction** (Undergraduate Thesis). School of Dentistry of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba, 2025.

ABSTRACT

Bisphosphonates, such as zoledronate, inhibit bone resorption and are widely used in the treatment of osteoporosis and neoplasms. However, their use is associated with medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ), a condition that can cause bone necrosis, pathological fractures, and intense pain. This study aimed to analyze the pathophysiology of MRONJ in ovariectomized Wistar rats, with and without the use of zoledronate. A total of 18 rats were used, of which 4 were designated for the measurement of serum estrogen (estradiol) by ELISA after euthanasia. The remaining 14 rats were divided into two experimental groups: SAL (saline solution) and ZOL (zoledronate 100 µg/kg), with 7 animals in each group, treated every 3 days for 7 weeks with their respective solutions. In the third week, all animals underwent extraction of the lower second molar with standardized alveolar osteotomy. After euthanasia in the seventh week, the tissues were analyzed by micro-computed tomography and histology. Micro-CT findings showed that the ZOL group presented a higher percentage of non-vital bone, lower bone volume, and greater porosity ($p < 0.05$), and the histological analysis confirmed the Micro-CT results, revealing trabecular disorganization, especially in cases compatible with stage 3 MRONJ. This suggests that surgical trauma enhanced disease progression. These findings indicate that the experimental model used may be effective in reproducing the most severe stage of MRONJ, contributing to future studies.

Keywords: osteonecrosis; bisphosphonate; ovariectomy; bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho experimental dos animais em seus respectivos grupos

Figura 2: Protocolo de tratamento dos animais e seus respectivos processos experimentais de acordo com a semana até a eutanásia.

Figura 3: Remoção da ligadura dental no segundo molar esquerdo com resíduo alimentar (A). Luxação do dente com instrumentos manuais (B).

Figura 4: Extração cirúrgica do segundo molar esquerdo (A). Osteotomia com broca de carboneto número 4 para padronização do defeito (B).

Figura 5: Representações clínicas dos animais no grupo SAL ao final do período experimental. Imagem intraoral da região do defeito dentário/extração em A. Imagem extraoral da cabeça e pescoço em B.

Figura 6: Representações clínicas dos animais no grupo ZOL ao final do período experimental. Imagem intraoral da região do defeito dentário/extração em A e B. Imagem extraoral da cabeça e pescoço em B.

Figura 7: Representação microtomográfica do defeito ósseo pós-extração e das estruturas adjacentes em uma seção coronal dos grupos SAL.

Figura 8: Representação microtomográfica do defeito ósseo pós-extração e das estruturas adjacentes em uma seção coronal dos grupos ZOL.

Figura 9: Representação microscópica da diferença na manutenção do tecido ósseo vital nos grupos SAL (esquerda) e ZOL (direita), onde as setas pretas indicam osteoblastos/osteócitos vitais, os asteriscos pretos indicam vasos sanguíneos viáveis e as setas laranjas mostram osteócitos e restos celulares sem vitalidade – Coloração: HE. Aumento original: 100x. Barras de escala: 100 µm.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Representação gráfica com médias e desvio padrão dos parâmetros ósseos (Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N, Bv, Bv.Tv e Po.Tot). Onde " α " representa uma diferença estatisticamente significativa entre SAL e ZOL.

Gráfico 2: Gráficos representando as médias e o desvio padrão das análises: Percentual de tecido ósseo não vital (TONV) e Percentual de tecido ósseo vital (TOV). Onde " α " representa uma diferença estatisticamente significativa entre SAL e ZOL.

LISTA DE SIGLAS

AMI I Área microscópica de interesse 1
BF's Bisfosfonatos
Bv Volume ósseo
Bv.Tv Percentual de volume ósseo
CEUA Comitê de Ética no Uso de Animais
COBEA Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético
FOA Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g Grama
H&E Hematoxilina e eosina
mg Miligramas
mg/Kg Miligramas por quilograma
MicroCT Microtomografia
mL Mililitros
mm² Milímetros quadrados
ONM-N Osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de bisfosfonatos
Po.Tot Percentual de porosidade total
SAL Solução salina
Tb.N Número de trabéculas ósseas
Tb.Sp Separação do osso trabecular
Tb.Th Espessura do osso trabecular
TONV Tecido ósseo não vital
TOT Tecido ósseo total
TOV Tecido ósseo vital
UNESP Universidade Estadual Paulista
ZOL Zoledronato
µg/kg Microgramas por quilograma
µm Micrômetro

SUMÁRIO

Introdução	14
Objetivo	18
Materiais e Métodos	19
Resultados	28
Discussão	33
Conclusão	37
Referências	38
Anexo	43

A osteonecrose dos maxilares associada ao uso de medicamentos (ONM-M) é uma condição clínica relativamente rara, mas potencialmente grave e debilitante, decorrente dos efeitos colaterais de determinados fármacos, como os bisfosfonatos, medicamentos anti-angiogênicos e antirreabsortivos (Ruggiero et al., 2022). Os bisfosfonatos (BFs) são fármacos idealizados para o tratamento de várias doenças ósseas, tais como osteoporose, neoplasias malignas que primariamente são do tecido ósseo, ou aquelas que apresentam metástase óssea, hipercalcemia maligna e mielomas múltiplos (Brozoski et al., 2012). São utilizados para aumentar a massa óssea, melhorar a resistência e diminuir o risco de fraturas (Gong et al., 2017).

Atuando como fármacos antirreabsortivos, os BF's são análogos ao pirofosfato endógeno e seu principal efeito ocorre sobre os osteoclastos, reduzindo a reabsorção óssea de forma dose-dependente, devido à inibição das vias de recrutamento dessas células, que são responsáveis por mediar esse processo (Dorigan et al., 2021). Desse modo, acelera a apoptose osteoclástica e o resultado é a diminuição da taxa remodeladora. Além disso, a literatura descreve uma expressiva atividade antiangiogênica, que reduz o suprimento vascular. Como consequência, o tecido ósseo recebe um menor transporte sanguíneo e, portanto, menos oxigenação, o que pode levar ao seu colapso (Monte; Furtado, 2023).

Embora sejam eficazes no controle e prevenção das doenças citadas, os BFs possuem um efeito colateral marcante, a necrose óssea dos maxilares, denominado por osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (ONM-M) (Brozoski et al., 2012; Ruggiero et al., 2022). Mais precisamente, a osteonecrose dos maxilares causada por medicamentos, também conhecida como Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ), apresenta características fundamentais em pacientes de risco ou já identificados com ONM-M, conforme estabelecido pela Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial (AAOMS). Esses pacientes estão em uso ou possuem histórico de

uso de medicamentos antirreabsortivos ou antiangiogênicos, não possuem histórico de radioterapia na região maxilofacial e apresentam exposição óssea nos maxilares sem reparos por mais de oito semanas (Otto et al., 2021). Os pacientes em uso de bisfosfonatos podem ser classificados como “em risco” para osteonecrose dos maxilares. Caso a doença se desenvolva, sua progressão ocorre em estágios, iniciando pelo estágio de risco, no qual o paciente faz uso de bisfosfonatos, mas ainda não apresenta sinais clínicos de osteonecrose. Em seguida, pode evoluir para o estágio 0, onde não há exposição óssea visível, e posteriormente para os estágios 1, 2 e 3, sendo este último caracterizado por fraturas patológicas da mandíbula e acometimento de cavidades anatômicas, como a base da mandíbula (Monte; Furtado, 2023). Ademais, sinais e sintomas clínicos podem estar associados com dor, mobilidade dentária, edema, eritema e ulceração. Pode haver queixas de dificuldade mastigatória, além de parestesias, levando a uma frequente diminuição da qualidade de vida (Otto et al., 2021).

Entre os principais fatores desencadeantes da ONM-M, destaca-se a realização de procedimentos odontológicos invasivos, especialmente extrações dentárias (Ruggiero et al., 2022). O trauma cirúrgico associado à extração pode atuar como um fator precipitante para a instalação da osteonecrose, especialmente quando há uma remodelação óssea comprometida devido ao uso prévio de bisfosfonatos (Ruggiero et al., 2022; Brozski et al., 2012). Além disso, o uso de brocas cirúrgicas e a realização de plastia alveolar, frequentemente necessárias para remoção de restos radiculares e regularização do alvéolo, podem ampliar a exposição óssea, favorecendo a instalação da doença. A ausência de uma adequada reparação tecidual nesses pacientes aumenta ainda mais o risco de infecção e progressão para estágios mais graves da ONM-M (Ruggiero et al., 2022; Otto et al., 2021).

A osteoporose, uma das principais doenças tratadas com bisfosfonatos, é definida como "uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa óssea e comprometimento da microarquitetura do tecido ósseo, com consequente aumento da fragilidade óssea e suscetibilidade a fraturas.", tem uma maior incidência em mulheres e em idade avançada (Oliveira et al., 2023).

A ONM-M se mostra também mais comum no sexo feminino já que o medicamento é amplamente usado no tratamento de doenças do metabolismo ósseo, mais recorrentes depois da menopausa (Otto et al., 2021). O aumento da expectativa de vida da população global tem levado a um crescimento significativo da população idosa, o que exige uma adaptação contínua dos sistemas de saúde. Nesse contexto, a longevidade das mulheres após a menopausa se destaca como um fator importante, marcando o fim da fase reprodutiva feminina e é definido pela interrupção permanente dos ciclos menstruais (Almeida et al., 2022). A menopausa ocorre devido à falência ovariana, que promove uma diminuição acentuada de hormônios sexuais, principalmente estrogênio e progesterona. Essa deficiência hormonal é de grande importância, uma vez que a diminuição da quantidade de estrogênio, em particular, desempenha um papel central no aumento das taxas de metabolismo ósseo, causando um desequilíbrio em que a reabsorção óssea supera a formação. Esse processo aumenta drasticamente os riscos de condições como osteopenia e osteoporose (Karaguzel; Holick, 2010).

Diante dessa relação entre deficiência hormonal e comprometimento ósseo, a escolha de um modelo animal osteopênico apropriado é crucial para a avaliação de novos tratamentos, prevenção e oportunidades de intervenção na osteopenia. Os ratos senis e ovariectomizados são modelos comuns, porém diferem, demonstrando vantagens e desvantagens importantes. Os ratos senis replicam o envelhecimento fisiológico e perda progressiva de massa óssea, causada por diversos fatores relacionados à idade (Adami Andreollo et al., 2012; Da silva et al., 2023). Já os ratos ovariectomizados simulam a menopausa e suas consequências, pois a remoção dos ovários provoca deficiência de estrogênio, resultando em perda óssea acelerada. Esse modelo permite investigar os efeitos específicos da falta de hormônios, sendo ideal para estudos relacionados à osteonecrose em mulheres na pós-menopausa. Após a remoção ou ligadura dos ovários nas ratas, em aproximadamente 30 dias, os níveis de estrogênio são significativamente reduzidos (Calciolari et al., 2017). Essa queda hormonal gera um desequilíbrio no metabolismo ósseo, caracterizado pela redução da atividade dos osteoblastos e o aumento da função osteoclástica. Consequentemente, ocorre uma intensificação na reabsorção óssea, resultando em perda acelerada

de massa óssea trabecular e no surgimento da osteopenia (Da silva et al., 2023).

Portanto, compreender os mecanismos envolvidos na osteonecrose dos maxilares e sua relação com a deficiência de estrogênio nos ossos torna-se fundamental para compreender seus aspectos fisiopatológicos. O uso de ratos ovariectomizados como ferramenta de estudo contribui significativamente na investigação das alterações ósseas induzidas pelo bisfosfonato. Além disso, a inclusão de procedimentos como a extração dentária e a plastia alveolar nesses modelos experimentais possibilita uma melhor reprodução das condições clínicas da ONM-M, auxiliando na compreensão de sua patogênese e contribuindo para futuras estratégias de manejo da doença (Da silva et al., 2023; McGowan et al, 2018).

O objetivo deste estudo foi analisar, em um modelo experimental de ratas adultas ovariectomizadas, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na osteonecrose dos maxilares induzida pelo zoledronato, utilizando um protocolo de extração dentária somado com o uso de instrumentais rotatórios para simular o cotidiano clínico dos cirurgiões-dentistas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Página 19

Delineamento experimental

Comitê de ética

Essa pesquisa seguiu todos os preceitos e princípios éticos para a experimentação animal, regulamentados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os protocolos experimentais foram enviados para o Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp.

Animais

O projeto envolveu 18 ratos (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), com 12 meses de idade e peso entre 280-350g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) - UNESP. Durante todo o experimento, os animais foram alojados em gaiolas plásticas específicas, em um ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e submetidos a um ciclo de iluminação de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Eles receberam alimentação sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. - Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) ao longo do experimento e tiveram acesso irrestrito a comida e água, exceto nas 12 horas que antecederam os procedimentos cirúrgicos.

Os ratos foram divididos em 2 grupos experimentais (SAL e ZOL), com 7 ratos em cada grupo, conforme mostrado na figura 1. O Grupo 1 (**SAL**) recebeu 0,45 ml de solução salina a 0,9% por via intraperitoneal a cada 3 dias, durante 7 semanas, simulando o protocolo do zoledronato e atuando como controle negativo. O Grupo 2 (**ZOL**) foi tratado com zoledronato na dose de 100 µg/kg a cada 3 dias, por 7 semanas, servindo como controle positivo. As doses e o plano

de tratamento foram adaptados para os ratos com base no protocolo atual de terapia oncológica para humanos (Statkiewicz C et al., 2018; Toro LF et al., 2019; Ervolino et al., 2019)

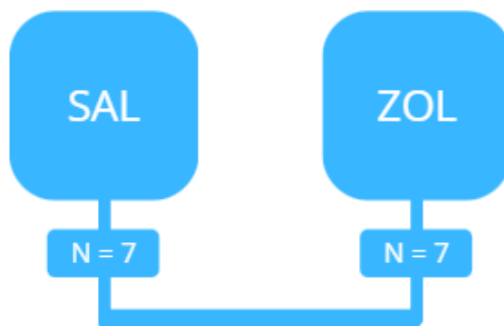


Figura 1: Desenho experimental dos animais em seus respectivos grupos

Anestesia

Todos os procedimentos (ovariectomia, ligadura de algodão, extração dentária e eutanásia) que poderiam causar qualquer desconforto ou dor foram realizados sob anestesia geral, utilizando Cetamina (70 mg/kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e Xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil), administradas por via intraperitoneal (Statkiewicz et al., 2018; Toro et al., 2019; Ervolino et al., 2019).

Ovariectomia

Todos os ratos do estudo foram submetidos a um procedimento cirúrgico para remoção dos ovários, com o objetivo de tornar as condições ósseas dos animais semelhantes às encontradas em mulheres adultas pós-menopáusicas com osteopatia. O protocolo para o procedimento de ovariectomia foi seguido conforme descrito por Polo et al. (Polo et al., 2020).

Após a ovariectomia, os ratos foram mantidos no biotério com acesso irrestrito a alimento e água por mais 90 dias, período correspondente ao desenvolvimento da osteoporose em ratos, de acordo com a FDA americana (Polo et al., 2020). Para a medição do estrogênio sérico (Estradiol - ng/mL), 4

animais foram sedados e eutanasiados por decapitação utilizando uma guilhotina para a coleta de sangue, que foi então processado pelo método ELISA. Os mesmos parâmetros descritos por Polo et al. (Polo et al., 2020) foram adotados para as medições. O kit utilizado foi o ELISA para ratos (Wuhan Fine Biotech CO., Wuhan, China, Cat. No. ER1507).

Os resultados da dosagem de estrogênio após a ovariectomia apresentaram os seguintes valores: média de estradiol: 7,66 ng/mL; desvio padrão: 2,48. Esses valores foram comparados aos de animais sem qualquer procedimento de esterilização em estudos anteriores do próprio grupo de pesquisa, e uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre o grupo ovariectomizado e o grupo controle ($p < 0,001$).

Ligadura dental

Cronologicamente, conforme mostrado na Figura 2, a intervenção intraoral começou no dia -1 com a instalação de uma ligadura de fio de algodão (Algodão trançado #24, Corrente Coats®, SP, Brasil) ao redor do 2º molar inferior esquerdo dos animais. O objetivo dessa ligadura foi facilitar a futura extração do dente, considerando a progressão da doença periodontal, que resulta na diminuição do osso intra e inter-radicular do dente afetado, minimizando o risco de fraturas radiculares apicais. Além disso, a doença periodontal é um fator de risco que pode contribuir para o desenvolvimento da osteonecrose (Statkievicz et al., 2018; Ervolino et al., 2019).

PROTOCOLO DE TRATAMENTO

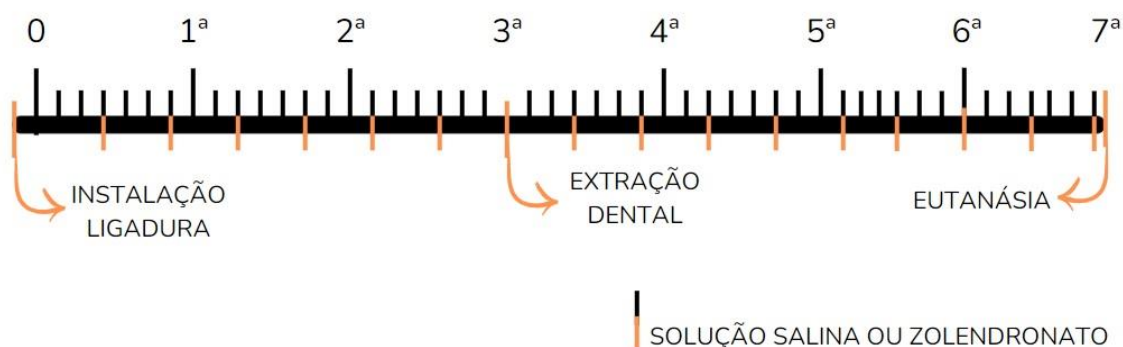


Figura 2: Protocolo de tratamento dos animais e seus respectivos processos experimentais de acordo com a semana até a eutanásia.

Período de indução da Osteonecrose

No dia 0, teve início o protocolo de indução da osteonecrose. Os ratos expostos ao medicamento, correspondente ao grupo ZOL receberam zoledronato na dose de 100 µg/kg, diluído em 0,45 ml de solução salina, por via intraperitoneal, utilizando uma seringa descartável de 1 ml BD SLIP INSULIN SERINGA com agulha de 13 mm x 0,38 mm, a cada 3 dias, durante 7 semanas, até a eutanásia. Os animais não expostos ao medicamento, correspondentes ao grupo SAL receberam 0,45 ml de solução salina, também por via intraperitoneal, utilizando o mesmo modelo de seringa e agulha, para simular o estresse do manuseio dos animais no grupo de teste (Erdemci et al., 2013; Kan et al., 2015; Ervolino et al., 2019)

Período de antibioticoterapia

Na terceira semana de indução, três dias antes da extração do molar, os animais iniciaram a terapia antibiótica profilática. O antibiótico utilizado foi Penicilina G Potássica, administrado por via intraperitoneal (Cristacillin® (benzilpenicilina potássica) 1.000.000 UI, Novafarma Indústria Farmacêutica Ltda®, Anápolis-GO, Brasil) na dose de 0,1 ml/kg por dia, durante 7 dias. A

administração perdurou até quatro dias após a extração (Thumbigere et al., 2014; Pereira-Silva et al., 2024).

Extrações

Três semanas após o início da aplicação de ZOL e SAL, os ratos foram anestesiados com Cetamina e Xilazina, posicionados na mesa operatória. Foi realizada a antisepsia da cavidade oral com PVPI 10% (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), seguida de sindesmotomia dos tecidos ao redor do dente, luxação (Figura 3) e extração do segundo molar inferior esquerdo. Em seguida, foi feita a plastia do alvéolo para remover quaisquer raízes residuais e padronizar o tamanho do defeito, utilizando uma broca cirúrgica esférica número 4, acoplada a uma peça de baixa rotação, sem irrigação automática, apenas com gotejamento de solução salina intra-alveolar, administradas com uma seringa de 5 ml e agulha 22G (Figura 4). Todos os grupos de ratos (SAL e ZOL) foram submetidos a esse procedimento (Statkievicz et al., 2018).

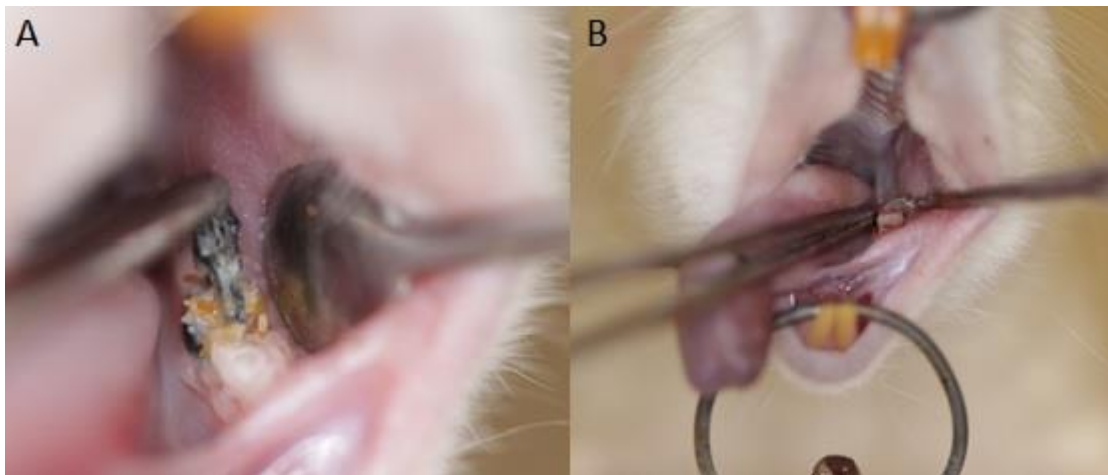


Figura 3: Remoção da ligadura dental no segundo molar esquerdo com resíduo alimentar (A). Luxação do dente com instrumentos manuais (B).

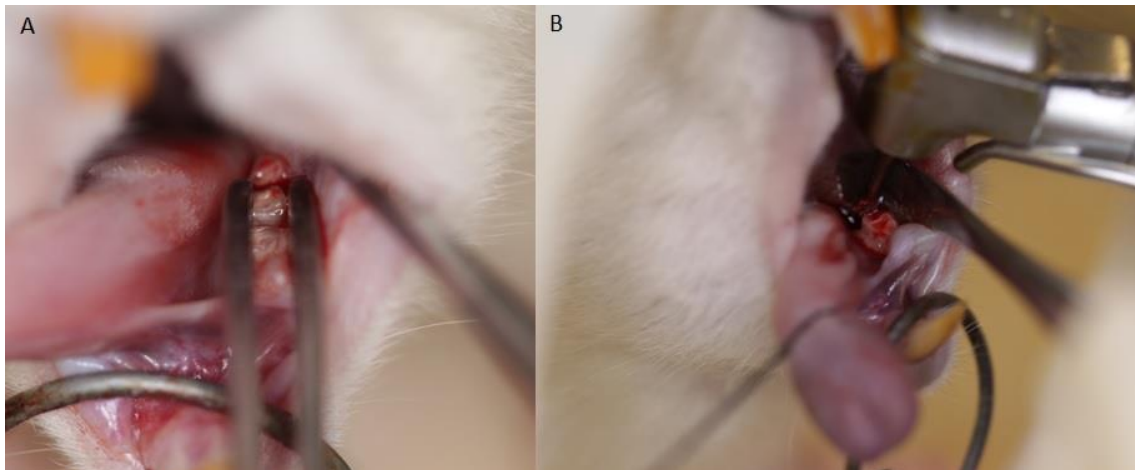


Figura 4: Extração cirúrgica do segundo molar esquerdo (A). Osteotomia com broca de carboneto número 4 para padronização do defeito (B).

Eutanásia

Os grupos foram eutanasiados 28 dias após a extração dentária (totalizando 7 semanas, Figura 2). A eutanásia teve o seguinte protocolo para todos os grupos: os ratos foram anestesiados e eutanasiados por perfusão cardíaca com 100 ml de solução salina acrescida de 0,1% de heparina e 800 ml de formaldeído a 4% (Sigma Chemical®, St. Louis, MO, EUA) em tampão fosfato-salino (PBS - Sigma Chemical®) 0.1 M, 4 °C, pH 7.4. As hemimandíbulas (lado esquerdo) foram cuidadosamente dissecadas e pós-fixadas por 24 horas em paraformaldeído a 4% (Ervolino et al., 2019; Toro et al., 2019; Pereira-Silva et al., 2024).

Análises dos Resultados

Análises e processamento dos tecidos calcificados

Microtomografia computadorizada (MicroCT)

Para a análise tridimensional estrutural do tecido ósseo, as mandíbulas dos animais foram removidas do fixador e lavadas por 12 horas em água corrente, a fim de remover qualquer resíduo do fixador. Sequencialmente foram armazenadas em álcool 70% para transporte até o local de análise,

primeiramente submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 8 µm de espessura (90Kv e 111µA), com filtro de Alumínio e passo de rotação de 0,05 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras serão armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0) (Pereira-Silva et al., 2024; Mackay et al., 2017). No software DataViewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser - CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida a área radiográfica de interesse (ARI), a qual será delimitada por uma área de 6 mm³ que inclui a área do alvéolo dentário previamente ocupada pelas raízes mesial e distal do segundo molar inferior esquerdo e tecidos adjacentes, que após a cirurgia é denominada de "defeito" devido à osteotomia e padronização. O software CTAn analisou e mediu a imagem de acordo com as escalas de cinza. Após o ajuste e remoção dos tons de cinza da área correspondente do alvéolo, o limiar utilizado para análise foi de 15-85 tons de cinza, permitiu obter o volume de osso presente/formado dentro e ao redor do defeito (Pereira-Silva et al., 2024; Mackay et al., 2017).

Os parâmetros analisados foram referentes à quantidade do tecido ósseo (BV=volume ósseo; BV.TV= porcentagem do volume ósseo) e qualidade do tecido ósseo (Tb.Th= espessura do trabeculado ósseo, Tb.SP= separação das trabéculas ósseas, Tb.N= número das trabéculas e (Po. tot) = porcentagem de porosidade total) (Pereira-Silva et al., 2024; Mackay et al., 2017).

Análise e processamento dos tecidos descalcificados

Após análise por MicroCT, as amostras foram retornadas ao fixador para completar mais 72 horas de fixação. Em seguida, foram submetidas a novo banho de água corrente por 12 horas e descalcificadas em ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA) 10% por 8 semanas. Após a descalcificação, a região correspondente ao defeito de extração e estruturas adjacentes foram separadas. As amostras foram então submetidas a uma sequência de desidratação em álcoois de 70% a 100%. Após esta etapa, foram diafanizadas com xileno e incluídas em parafina, permitindo a obtenção de cortes de 6 µm de espessura e a confecção de lâminas. Cortes histológicos da porção do alvéolo dentário e tecidos adjacentes foram coletados no sentido lingual para vestibular e preparados para análise. As lâminas pares, obtidas após microtomia, foram submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (HE) (Statkievicz et al., 2018; Ervolino et al., 2019).

Análise Microscópica e Área Microscópica de Interesse (AMI)

Para a análise histométrica, foram avaliadas três secções histológicas localizadas nas porções vestibular, média e lingual do sítio de extração dentária. A área de interesse AMI foi definida como uma região de 6 mm x 6 mm que inclui a porção do sítio de extração dentária anteriormente ocupada pelas raízes mesial e distal do segundo molar inferior esquerdo e os tecidos adjacentes. O limite distal foi estabelecido por uma linha paralela à dentina coronária e à superfície radicular do terceiro molar inferior esquerdo, estendendo-se na mesma linha até o primeiro molar inferior esquerdo. O limite coronário foi definido por uma linha paralela ao limite da margem cemento-gengival do terceiro molar inferior esquerdo, estendendo-se 6 mm apicalmente (Toro et al., 2019).

Análise Histológica

Após a confecção e secagem das lâminas, estas foram armazenadas em local seco dentro de porta-lâminas selados. No prazo de 48 horas, foram digitalizadas no laboratório de microscopia CAMILOD - UofT Canadá, utilizando o scanner "Axio Scan Z.1 - ZEISS Carl Zeiss Microscopy GmbH - Alemanha" e o aplicativo Zen 3.8 (Blue edition) - ZEISS Carl Zeiss Microscopy GmbH - Alemanha para aquisição de imagens.

A análise histométrica do tecido ósseo foi realizada utilizando o software ZEISS (ZEISS ZEN 3.8 - Carl Zeiss Microscopy GmbH) com a ferramenta "Active

contour" - "Region" - "Graphics". Com essa ferramenta, foi possível avaliar as regiões ósseas em tempo real com objetivas de 5x a 40x, sem a necessidade de captura de imagens estáticas, contornando as áreas de tecido ósseo não vital (TONV), as áreas de tecido ósseo vital (TOV) e a soma das áreas (tecido ósseo total - TOT). Após a demarcação da área desejada, o software exibiu o valor da área em μm^2 , sendo estes transferidos para uma planilha Excel para posterior análise.

Os valores de TOV, TONV e TOT foram estabelecidos e expressos em μm^2 como média $\pm$ desvio padrão em cada grupo experimental. TONV representa uma região onde 5 ou mais lacunas osteocitárias vizinhas estavam vazias ou continham remanescentes de osteócitos (Statkievicz et al., 2018; Toro; Ervolino et al 2019), TOV representa osso saudável com a presença de osteócitos corados dentro das lacunas, e TOT é a soma dos dois valores anteriores.

Análise Estatística

Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos obtidos por histometria (TOV, TONV, TOT) e morfometria tridimensional por microtomografia (BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N), a diferença entre os grupos experimentais (SAL; ZOL) foi analisada.

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. O nível de significância foi estabelecido em 0,05 para todos os testes. Todos os valores foram analisados pelo teste t-test de um fator para valores paramétricos e pelo teste de Mann Whitney (Rank Sum Test) para valores não paramétricos.

O programa estatístico utilizado foi o SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, Califórnia, EUA).

Observações clínicas

Ao analisar as observações clínicas, constatou-se que nenhum animal do grupo SAL não apresentou fístulas extraorais, como pode ser observado na Figura 5. Diferentemente, os animais do grupo ZOL apresentaram extensa exposição óssea extraoral semelhante as manifestações do estágio 3 da doença. Nos animais dos grupos SAL, foi possível notar uma característica mais fisiológica dos tecidos adjacentes ao defeito, com pequenas ou mínimas alterações na dentição dos animais, representadas na Figura 5 pelas letras A e B. Nos grupos ZOL, no entanto, observou-se uma característica mais flogística, com inflamação recorrente dos tecidos moles adjacentes e alterações dentárias, como perda do primeiro molar adjacente e alteração no crescimento dos incisivos centrais inferiores. Além disso, alguns espécimes do grupo ZOL apresentaram exsudato purulento na região do defeito e tecido adjacente, como mostrado na Figura 6 pelas letras A e B.

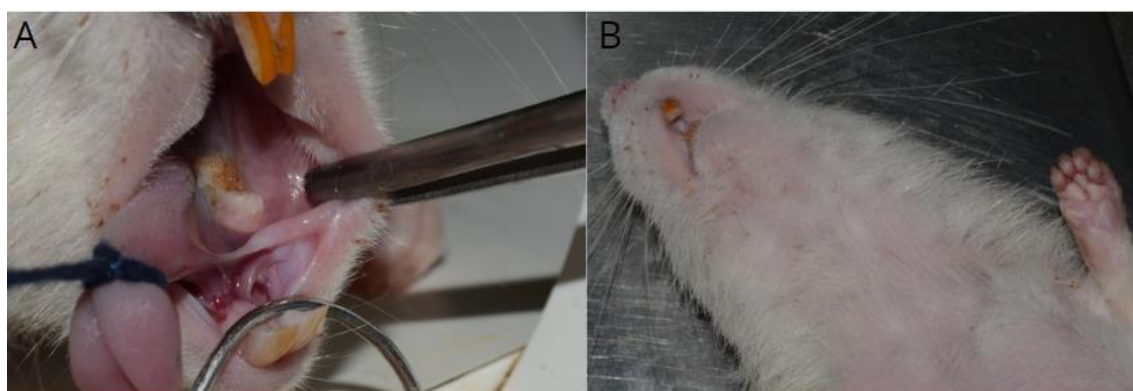


Figura 5: Representações clínicas dos animais no grupo SAL ao final do período experimental. Imagem intraoral da região do defeito dentário/extração em A. Imagem extraoral da cabeça e pescoço em B.



Figura 6: Representações clínicas dos animais no grupo ZOL ao final do período experimental. Imagem intraoral da região do defeito dentário/extração em A e B. Imagem extraoral da cabeça e pescoço em B.

Microtomografia computadorizada (MicroCT)

No parâmetro, Po.Tot – percentual de porosidade total, o grupo ZOL apresentou os maiores valores com diferença estatisticamente em relação ao grupo SAL ($p < 0,05$). No parâmetro BV – volume ósseo, o grupo ZOL apresentou o pior desempenho, com os menores valores encontrados, apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo SAL ($p < 0,05$). Quanto aos parâmetros Tb.Th = espessura das trabéculas ósseas, Tb.Sp = separação das trabéculas ósseas, os grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). No parâmetro Tb.N = número de trabéculas, o grupo ZOL apresentou redução do número de trabéculas em comparação ao grupo SAL, com diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$). No último parâmetro Bv.Tv – percentual de volume ósseo, os valores seguiram a mesma tendência do BV. As reconstruções representativas e gráficos estatísticos são mostrados na Figura 5.

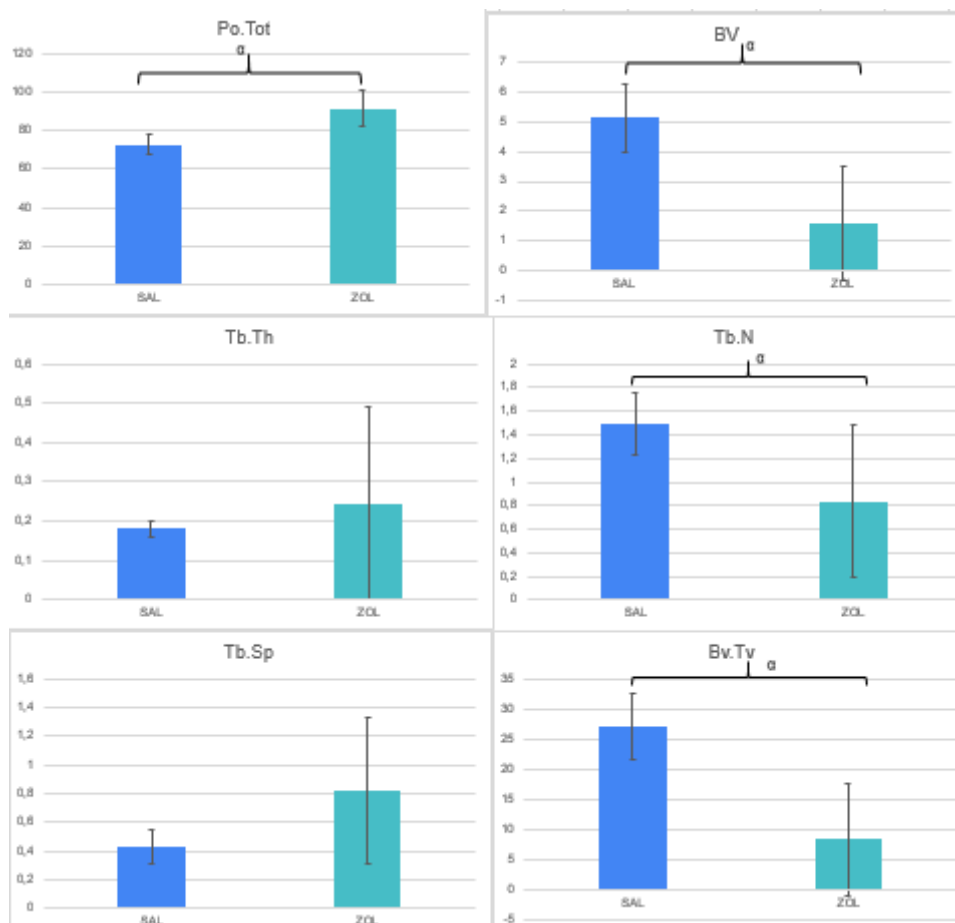


Gráfico 1: Representação gráfica com médias e desvio padrão dos parâmetros ósseos (Po.Tot, BV Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e Bv.Tv). Onde "α" representa uma diferença estatisticamente significativa entre SAL e ZOL.

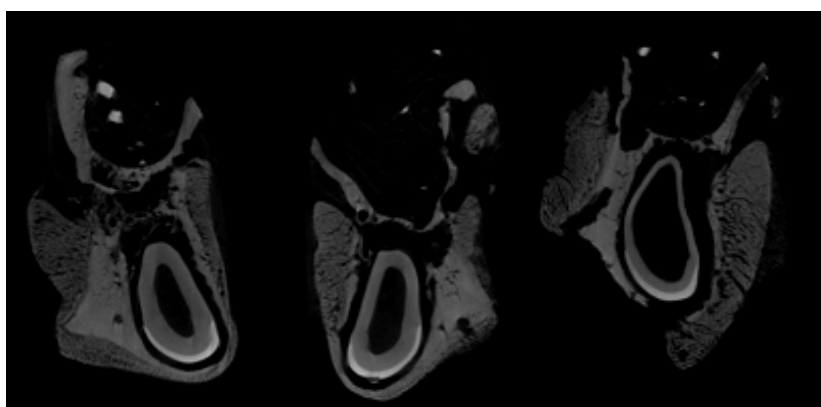


Figura 7: Representação microtomográfica do defeito ósseo pós-extração e das estruturas adjacentes em uma seção coronal dos grupos SAL.

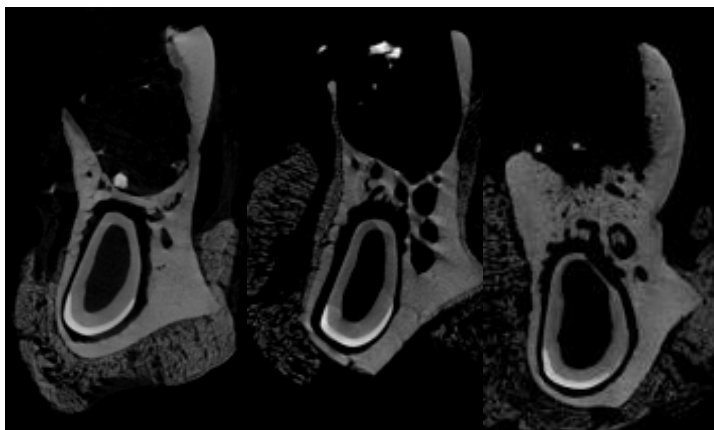


Figura 8: Representação microtomográfica do defeito ósseo pós-extração e das estruturas adjacentes em uma seção coronal dos grupos ZOL.

Histologia

Percentual de tecido ósseo vital

A análise do percentual de osso vital não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos SAL e ZOL ($p > 0,05$).

Percentual de tecido ósseo não vital

Quanto ao percentual de tecido ósseo não vital, o grupo ZOL apresentou valores significativamente elevados em comparação ao grupo SAL ($p < 0,05$), conforme demonstrado no gráfico 2.

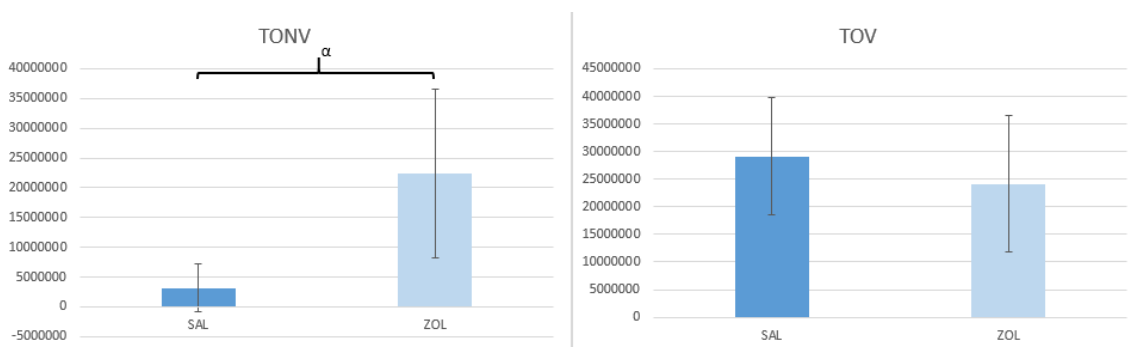


Gráfico 2: Gráficos representando as médias e o desvio padrão das análises: Percentual de tecido ósseo não vital (TONV) e Percentual de tecido ósseo vital (TOV). Onde " α " representa uma diferença estatisticamente significativa entre SAL e ZOL.

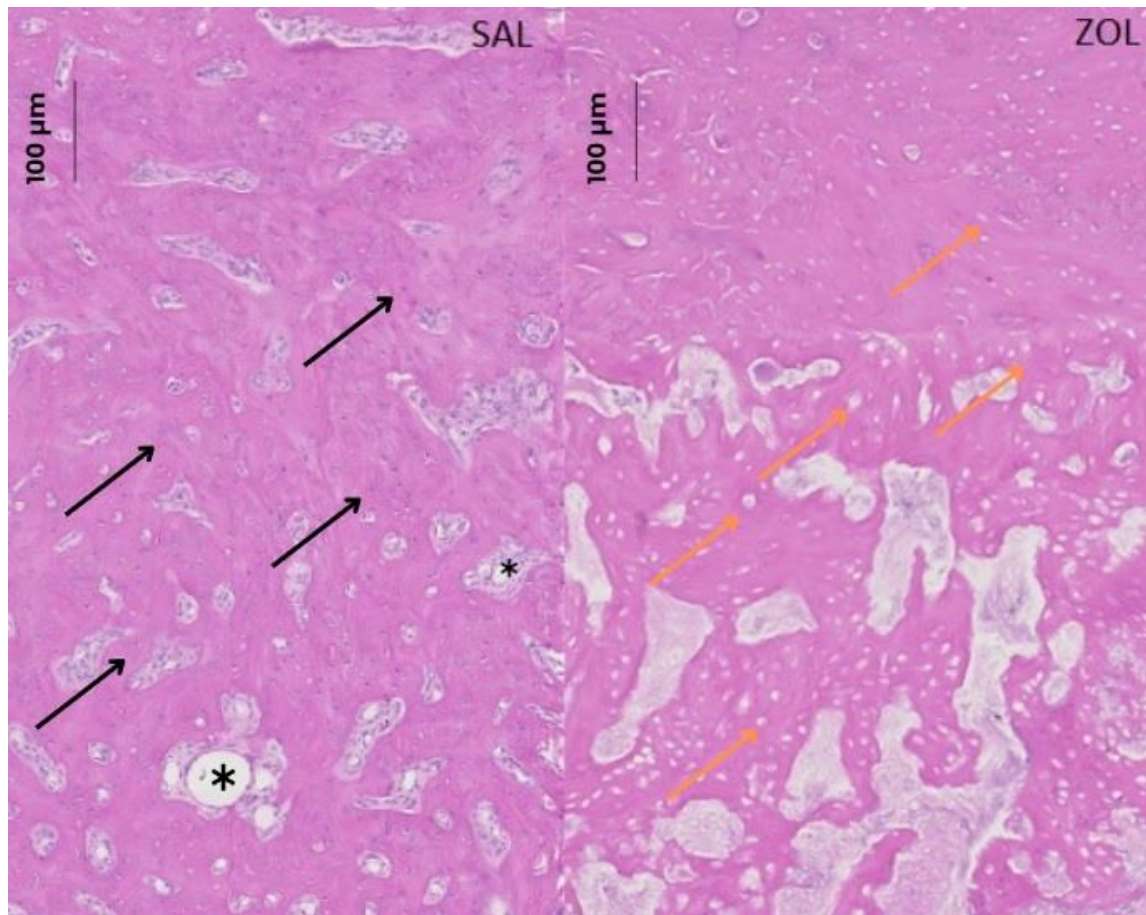


Figura 9: Representação microscópica da diferença na manutenção do tecido ósseo vital nos grupos SAL (esquerda) e ZOL (direita), onde as setas pretas indicam osteoblastos/osteócitos vitais, os asteriscos pretos indicam vasos sanguíneos viáveis e a setas laranjas mostram osteócitos e restos celulares sem vitalidade – Coloração: HE. Aumento original: 100x. Barras de escala: 100 µm.

DISCUSSÃO

Página 33

Diante da complexidade da osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos, compreender seus mecanismos fisiopatológicos é fundamental para entender a perda da capacidade de regeneração óssea (Aghaloo et al., 2015). O zoledronato, um dos bisfosfonatos mais potentes, interfere diretamente nesse processo ao inibir a atividade dos osteoclastos, células responsáveis pela remodelação óssea. Com isso, o tecido ósseo se torna mais vulnerável e menos capaz de se recuperar, especialmente em áreas submetidas a traumas, como extrações dentárias (Limonas et al., 2020). Neste estudo, foi possível observar que, nos casos mais avançados, caracterizados como estágio 3 da doença, o comprometimento ósseo foi ainda mais severo, resultando em extensas áreas de necrose, fraturas patológicas e até o envolvimento de estruturas vizinhas, como a base da mandíbula. Esses achados reforçam a gravidade da progressão da osteonecrose e os desafios que ela impõe (Vanpoecke et al., 2020).

O procedimento cirúrgico realizado nos animais, que envolveu a extração do segundo molar inferior e a plastia do alvéolo com o uso de broca, teve um papel central na indução da osteonecrose. A combinação do trauma cirúrgico com os efeitos deletérios do zoledronato na remodelação óssea criou um ambiente propício para a progressão acelerada da doença (Ruggiero et al., 2022; Brozoski et al., 2012). O uso da broca para a osteotomia padronizada do alvéolo também gerou um trauma ósseo extenso, cuja cicatrização foi severamente prejudicada pela ação do bisfosfonato. Assim, a associação entre o procedimento cirúrgico e o uso do zoledronato potencializou desenvolvimento da osteonecrose, contribuindo para a evolução do quadro para o estágio 3 da doença (Otto et al., 2021).

Para entender melhor esse processo, os modelos experimentais desempenham um papel essencial, permitindo investigar como a doença se desenvolve e quais fatores agravam sua progressão (Yang et al., 2015; Calciolari et al., 2017). Além disso, possibilitam uma visão mais detalhada dos mecanismos envolvidos, contribuindo para futuras abordagens na prevenção e no manejo da condição (Adami Andreollo et al., [s.d.]; Da silva et al., 2023). Para que os

resultados sejam aplicáveis à realidade clínica, é fundamental que o modelo animal escolhido tenha características semelhantes às do organismo humano (Chang et al., 2018).

Nesse contexto, os ratos são amplamente utilizados por apresentarem um metabolismo ósseo relativamente próximo ao nosso, além de serem de fácil manejo e baixo custo. Quando o objetivo é estudar a osteonecrose induzida por bisfosfonatos, o uso de ratas ovariectomizados se destaca por permitir a simulação da deficiência hormonal característica da pós-menopausa, uma condição fortemente associada ao desenvolvimento da doença (Tanaka et al., 2015). Já os ratos senis, apesar de representarem o envelhecimento natural, possuem um metabolismo ósseo diferente, o que pode influenciar a interpretação dos resultados (Da Silva et al., 2023). Essas diferenças mostram como é essencial analisar os dados com cautela antes de aplicá-los à prática clínica, garantindo que as conclusões realmente reflitam a realidade dos pacientes que enfrentam a osteonecrose dos maxilares.

Nos animais do grupo SAL, que não receberam o zoledronato, a cicatrização ocorreu de forma mais esperada, sem grandes complicações. Os tecidos ao redor dos defeitos ósseos permaneceram relativamente saudáveis, e não houve sinais evidentes de processos infecciosos. Em contrapartida, os animais do grupo ZOL apresentaram alterações expressivas, com extensa exposição óssea e presença de fístulas extraorais, sinais que indicam um comprometimento mais grave da região afetada (Chang et al., 2018). Além disso, a inflamação persistente nos tecidos moles e a presença de exsudato purulento sugerem que o osso afetado não só perdeu sua vitalidade, mas também se tornou um ambiente propício para infecções secundárias. Alterações dentárias, como a perda do primeiro molar adjacente e anomalias no crescimento dos incisivos, reforçando a ideia de que o estágio 3 da osteonecrose envolve um quadro de necrose óssea extensa, com envolvimento dos tecidos moles e complicações secundárias, como infecção, que agravam ainda mais a condição (Soutome et al., 2018; Barba-Recreo et al., 2014).

Os dados da microtomografia complementam essas observações, mostrando uma redução significativa na densidade óssea e uma estrutura mais

porosa e fragilizada nos animais expostos ao zoledronato. Estudos na literatura corroboram esses achados, indicando que a administração de bisfosfonatos, especialmente em doses elevadas, aumenta a rigidez óssea, mas, na presença de osteonecrose dos maxilares (MRONJ), o osso afetado torna-se mais suscetível a fraturas e apresenta redução na capacidade de reparo tecidual. (Kün-Darbois et al., 2018). O número de trabéculas foi reduzido nesse grupo, evidenciando a perda da integridade óssea e o impacto negativo na resistência mecânica do osso. Além disso, o percentual de volume ósseo (Bv.Tv) acompanhou essa tendência de redução, indicando que a quantidade de osso saudável foi severamente comprometida, em concordância com estudos que associam o uso prolongado de bisfosfonatos a um desequilíbrio na remodelação óssea (Vilarinho et al., 2017). Por outro lado, o percentual de porosidade total (Po.Tot) foi significativamente mais alto no grupo ZOL, refletindo a fragilidade estrutural do osso. O aumento da porosidade e a diminuição da densidade óssea, amplamente documentados na literatura, são marcadores de degeneração óssea avançada, observados no local da doença já instalada, e são compatíveis com o estágio 3 da osteonecrose. (Chang et al., 2018; Kün-Darbois et al., 2018).

As análises histológicas do tecido ósseo também confirmaram os achados de necrose óssea avançada no grupo ZOL. O percentual de osso não vital foi significativamente maior no grupo ZOL, em comparação ao grupo SAL. Esses dados corroboram a ideia de que, no estágio 3, a necrose óssea é extensiva, com um aumento significativo do tecido ósseo não vital (Yang et al., 2015). Embora o percentual de osso vital não tenha mostrado diferença significativa entre os grupos, a grande quantidade de osso não vital no grupo ZOL indica que a capacidade de regeneração óssea foi amplamente comprometida devido à presença de necrose. Isso é um reflexo das características do estágio 3 da osteonecrose, onde o osso afetado já se encontra em um estado avançado de degeneração. (Vanpoecke et al., 2020).

Os resultados clínicos, microtomográficos e histológicos convergem para indicar que os animais do grupo ZOL estão efetivamente no estágio 3 da osteonecrose dos maxilares, caracterizado pela extensa necrose óssea,

exposição óssea extraoral, infecção crônica e secundária, dor intensa e destruição óssea (Barba-Recreo et al., 2014). A perda óssea avançada, juntamente com o aumento da porosidade óssea, a presença de tecido ósseo não vital e a diminuição da capacidade de regeneração óssea, são características centrais desse estágio avançado da doença (Vanpoecke et al., 2020).

Embora este estudo seja uma contribuição importante para a compreensão da fisiopatologia da osteonecrose dos maxilares induzida por zoledronato, especialmente em seus estágios mais avançados, o estágio 3 ainda precisa de mais investigações. A progressão para esse estágio é marcada por uma destruição óssea significativa, fraturas patológicas e o comprometimento de estruturas importantes, o que torna seu tratamento clínico ainda mais complexo (Chang et al., 2018; Vanpoecke et al., 2020). A falta de pesquisas que explorem de forma detalhada a fisiopatologia da doença no estágio 3 em modelos experimentais destaca a necessidade urgente de novos estudos. Com isso, um entendimento mais profundo da osteonecrose avançada poderia abrir caminho para o desenvolvimento de tratamentos e estratégias preventivas mais eficazes, ajudando a minimizar seus impactos e a melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados.

CONCLUSÃO

Página 37

O zoledronato induziu a osteonecrose dos maxilares, levando ao estágio 3 da doença, caracterizado por exposição óssea, inflamação e infecção. A extração dentária e a osteotomia agravaram o quadro devido à remodelação óssea comprometida. Compreender a fisiopatologia da doença é essencial para melhorar estratégias preventivas e terapêuticas, destacando a necessidade de novos estudos.

REFERÊNCIAS

- Ruggiero, S. L.; Dodson, T. B.; Fantasia, J.; Goodday, R.; Aghaloo, T.; Mehrotra, B.; O’Ryan, F. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons’ position paper on medication-related osteonecrosis of the jaws—2022 update. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 80, n. 5, p. 745-757, 2022.
- Brozoski, M. A.; Traina, A. A.; Deboni, M. C. Z.; Naclério-Homem, M. G. Osteonecrose maxilar associada ao uso de bisfosfonatos. *Revista Brasileira de Reumatologia*, [s.l.], p. xx-xx, [2012].
- Gong, X.; Yu, W.; Yin, G.; Liu, W.; Wang, X.; Lu, H. Skeletal site-specific effects of zoledronate on in vivo bone remodeling and in vitro BMSCs osteogenic activity. *Scientific Reports*, v. 7, 31 jan. 2017.
- Dorigan, M. C.; Ferreira, L. C. R.; Nascimento, L. M. A osteonecrose dos maxilares induzida por bifosfonatos: uma revisão de literatura. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 16, p. e92101623466, 7 dez. 2021.
- Monte, F. M. M.; Furtado, M. A. M. Bisfosfonatos e osteonecrose maxilar: uma revisão narrativa da literatura. *Research, Society and Development*, v. 12, n. 4, p. e20812441166, 13 abr. 2023.
- Otto, S.; Panya, S.; Bedogni, A.; Westhofen, M.; Zrnc, T. A.; Schiegnitz, E.; Ehrenfeld, M. Infection as an important factor in medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). *Medicina (Lithuania)*, v. 57, n. 5, 2021.
- Oliveira, S. G.; De Souza, L. M.; Gonçalves, A. P.; Ferreira, T. Construindo saberes e fazeres mediante a promoção da saúde de mulheres idosas com osteoporose. *Texto & Contexto - Enfermagem*, v. 32, 2023.

Almeida, C. M. S.; Coelho, G. N.; Paiva, A. C. Qualidade de vida de mulheres pós-menopausa diagnosticadas com osteoporose. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 5, n. 3, p. 8593–8601, 4 maio 2022.

Karaguzel, G.; Holick, M. F. Diagnosis and treatment of osteopenia. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, dez. 2010.

Adami Andreollo, N.; Santos, E. F.; Araújo, M. R. P.; Lopes, L. R. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação?, março 2012.

Da Silva, W. P. P.; Souza, L. A.; Castro, M. R.; Andrade, C. R. Feasible low bone density condition for assessing bioactivity in ex-in vivo and in vivo studies. *Journal of Applied Oral Science*, v. 31, 2023.

Calciolari, E.; Donos, N.; Mardas, N. Osteoporotic animal models of bone healing: advantages and pitfalls. *Journal of Investigative Surgery*, 3 set. 2017.

McGowan, K.; McGowan, T.; Ivanovski, S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. *Oral Diseases*, v. 24, n. 4, p. 527-536, 1 maio 2018.

Statkievicz, C.; Toro, L. F.; De Mello-Neto, J. M.; De Sá, D. P.; Casatti, C. A.; Issa, J. P. M.; et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 184, p. 7-17, 2018.

Toro, L. F.; De Mello-Neto, J. M.; Santos, F.; Ferreira, L. C.; Statkievicz, C.; Cintra, L. T. A.; et al. Application of autologous platelet-rich plasma on tooth extraction site prevents occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws in rats. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 22, 2019.

Ervolino, E.; Statkievicz, C.; Toro, L. F.; De Mello-Neto, J. M.; Cavazana, T. P.; Issa, J. P. M.; 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*, v. 120, p. 101-113, 2019.

Polo, T. O. B.; Silva, W. P.; Momesso, G. A. C.; Lima-Neto, T. J.; Barbosa, S.; Cordeiro, J. M.; et al. Plasma electrolytic oxidation as a feasible surface treatment for biomedical applications: an in vivo study. *Scientific Reports*, v. 10, p. 10000, 2020.

Erdemci, F.; Gunaydin, Y.; Sencimen, M.; Bassorgun, I.; Ozler, M.; Oter, S.; Gulses, A.; Gunal, A.; Sezgin, S.; Bayar, G. R.; Dogan, N.; Gider, I. K. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 43, p. 777-783, 2014.

Kan, B.; Sencimen, M.; Bayar, G. R.; Korkusuz, P.; Coskun, A. T.; Korkmaz, A.; Bahador, E.; Zerener, T. Histomorphometric and microtomographic evaluation of the effects of hyperbaric oxygen and systemic ozone, used alone and in combination, on calvarial defect healing in rats. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 73, p. 1231.e1-1231.e10, 2015.

Thumbigere-Math, V.; Michalowicz, B. S.; Hodges, J. S.; Tsai, M. L.; Swenson, K. K.; Rockwell, L.; Gopalakrishnan, R. Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of Periodontology*, v. 85, p. 226-233, 2014.

Pereira-Silva, M.; Hadad, H.; Jesus, L. K.; Oliveira, M. E.; Almeida, J. M.; Nímia, H. H.; Magro Filho, O.; Okamoto, R.; Macedo, S. B.; Palmieri Junior, C. F.; Souza, F. Á. Ozone therapy effect in medication-related osteonecrosis of the jaw as prevention or treatment: microtomographic, confocal laser microscopy and histomorphometric analysis. *Clinical Oral Investigations*, v. 28, p. 151, 2024.

Mackay, J. W.; Murray, P. J.; Kasmai, B.; Johnson, G.; Donell, S. T.; Toms, A. P. Subchondral bone in osteoarthritis: association between MRI texture analysis and histomorphometry. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 25, p. 700-707, 2017.

Aghaloo, T.; Hazboun, R.; Tetradis, S. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaws. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, v. 27, n. 4, p. 489-496, nov. 2015.

Limones, A.; Aracil, L.; Morell, S.; Fernandez, A.; Mesa, F. Medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) in cancer patients treated with denosumab vs. zoledronic acid: a systematic review and meta-analysis. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, v. 25, n. 3, p. e326, 2020.

Vanpoecke, J.; Verstraete, L.; Smeets, M.; Ferri, J.; Nicot, R.; Politis, C. Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) stage III: Conservative and conservative surgical approaches versus an aggressive surgical intervention: A systematic review. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 48, n. 4, p. 435-443, 2020.

Chang, J.; Hakam, A. E.; McCauley, L. K. Compreensão atual da fisiopatologia da osteonecrose da mandíbula. *Current Osteoporosis Reports*, v. 16, p. 584–595, 2018.

Tanaka, J.; et al. An osteonecrosis model induced by oral bisphosphonate in ovariectomised rats. *Oral Diseases*, v. 21, n. 8, p. 969–976, 2015.

Soutome, S.; Hayashida, S.; Funahara, M.; Sakamoto, Y.; Kojima, Y.; Yanamoto, S.; Umeda, M. Factors affecting development of medication-related osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving high-dose bisphosphonate or denosumab therapy: is tooth extraction a risk factor? *PLoS One*, v. 13, n. 7, e0201343, 2018.

Barba-Recreo, P.; et al. Zoledronic acid – Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 42, n. 6, p. 744–750, 2014.

Kün-Darbois, J. D.; et al. Mineralização óssea e vascularização na osteonecrose da mandíbula relacionada a bifosfonatos: um estudo experimental em ratos. *Clinical Oral Investigations*, v. 22, p. 2997–3006, 2018.

Vilarinho, J. L. P.; et al. Early bony changes associated with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats: A longitudinal in vivo study. *Archives of Oral Biology*, v. 82, p. 79–85, 2017.

Yang, H.; et al. A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 8, n. 5, p. 5161–5167, 2015.

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da Ozonioterapia, com ênfase na dispersão por óleo ozonizado no tratamento da Osteonecrose induzida por Zoledronato em ratas senis**", Processo FOA nº 0071-2022, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Fevereiro de 2022.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 05 de Fevereiro de 2024.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 05 de Março de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of Ozone Therapy, with an emphasis on dispersion by ozonized oil in the treatment of Zoledronate-induced Osteonecrosis in senile rats**", Protocol FOA nº 0071-2022, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on February 24, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 05, 2024.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 05, 2024.

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

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