



MIRELA CAROLINE SILVA

**Avaliação da aplicação de terapia fotodinâmica
antimicrobiana (aPDT) e óleo ozonizado na prevenção
da osteonecrose dos maxilares em ratas senescentes
tratadas com Zoledronato**

Araçatuba

2023

MIRELA CAROLINE SILVA

**Avaliação da aplicação de terapia fotodinâmica
antimicrobiana (aPDT) e óleo ozonizado na prevenção
da osteonecrose dos maxilares em ratas senescentes
tratadas com Zoledronato**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho –
UNESP”, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Cirurgia e Traumatologia
Bucomaxilofacial.
Orientador: Prof. Assoc. Leonardo
Perez Faverani

Araçatuba

2023

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Silva, Mirela Caroline.

S586a Avaliação da aplicação de terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e óleo ozonizado na prevenção da osteonecrose dos maxilares em ratas senescentes tratadas com Zoledronato

/ Mirela Caroline Silva. – Araçatuba, 2023

44 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Leonardo Perez Faverani

1. Osteonecrose 2. Ozônio 3. Fotoquimioterapia
I. T.

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

*A Deus e a toda minha família, por serem
meus alicerces em cada passo de minha
jornada e por tanto me apoiarem e
ensinarem.*

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador, **Prof. Assoc. Leonardo Perez Faverani**, por ser além de orientador, um amigo na caminhada da CTBMF. Por todas as oportunidades, convivência e por todo carinho sempre. O senhor é uma grande referência dentro da área e, para mim, não poderia ser diferente. Certamente a convivência e a parceria com o senhor ao longo destes anos foi/é um grande privilégio para mim.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001.

A **Deus**, meu Companheiro, meu Amigo, meu Pai. Quem plantou em mim um sonho que, à princípio parecia impossível, mas teve o carinho e Amor de me preparar. Por me acolher nos momentos difíceis e sonhar comigo cada passo da minha história. Por ser Ele.

À **Nossa Senhora Aparecida**, minha Mãezinha, quem tanto cuida de mim; por toda intercessão, por todo amor e ajuda nos momentos de dificuldade.

A **meus pais**, Walquiria e Marcos Silva, por me apoiarem infinitamente em todos os caminhos que eu trilho, por me auxiliarem de uma forma única e por serem meus alicerces. Sem vocês nada seria possível.

À **minha avó**, Tereza O. de Souza, minha base além da vida. Por toda intercessão junto a Deus e todos seus anjos em meu caminho, por representar a força e amor desde o início.

À **minha irmã**, Andressa, meu maior presente. Por me ajudar nos momentos mais difíceis e me apoiar.

A **meus avós paternos**, Nilva e José Silva, por serem inspirações na minha vida, por sempre torcerem por mim nessa caminhada e estarem comigo.

À **minha tia**, Regiane Simili, pelo apoio e cuidado comigo desde criança. Por todo auxílio e por ser inspiração em minha caminhada.

A **meus tios e tias**, Janete, Adriano e Laiane Silva, por todo apoio e torcida em cada momento. São reais inspirações para minha vida.

A **minhas tias-avós**, Lourdes Nasche, Vera Lima e Sueli Oliveira, pessoas maravilhosas que sempre me apoiaram e torceram por mim.

As **minhas amigas** que estão comigo desde o início da graduação, Bia Sanchez, Ana Carolina Ribeiro, Stéfani Ferriolli, por representarem parte da minha família em Araçatuba, me apoiarem neste desafio que foi o Mestrado e por se fazerem sempre presente.

A **Fernanda Camilo e Ana Maira Baggio**, por serem a outra parte da minha família em Araçatuba, pelos 7 anos de convívio no apartamento 145. Obrigada por tornar cada momento de desafio mais leve, pelo auxílio em cada fase desses dois anos e por permanecerem sempre ali.

A meus amigos da pós-graduação, **João Matheus Fonseca e Santos, Stefany Barbosa**, meus companheiros que estiveram comigo em cada etapa deste trabalho, por toda ajuda e convivência.

Ao graduando, **Gustavo Ribeiro**, o qual também estive comigo em cada momento deste trabalho. Tenho muito orgulho de nossa parceria, saiba que sempre poderá contar comigo.

A todos os professores da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP), que contribuíram para essa formação. Em especial, à **Profa. Assoc. Ana Paula Farnezi Bassi**, minha orientadora de IC, por todo auxílio também durante toda caminhada do Mestrado. A senhora é uma das minhas maiores referências dentro da CTBMF, sou muito grata por toda convivência e ensinamentos ao longo destes anos.

A todos professores que foram imprescindíveis para este trabalho, em especial, **Prof. Assoc. Edilson Ervolino e Profa. Assoc. Cecilia Luiz Pereira Stabile**, por concordarem em fazer parte da minha banca e auxiliarem de modo tão precioso na execução e finalização deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma com esse título.

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços
repetidos dia após dia”*

Robert Collier

SILVA, MC. Avaliação da aplicação de terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e óleo ozonizado na prevenção da osteonecrose dos maxilares em ratas senescentes tratadas com Zoledronato. 2023. 44 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (MRONJ) é uma condição que apresenta patogênese ainda não totalmente esclarecida e, por isso, sem um protocolo de tratamento bem consagrado. Nesse sentido, terapias locais adjuvantes como a ozonioterapia e a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) podem apresentar o potencial de otimizar o reparo tecidual e assim, apresentar resultados promissores na prevenção dessas lesões. O objetivo desse projeto foi avaliar o potencial do sinergismo na aplicação das duas terapias na prevenção de MRONJ em ratas senis tratadas com Zoledronato. Para tanto, 50 ratas senis (18 meses) foram divididas em 5 grupos experimentais (n=7). Grupo VEI os animais foram submetidos a aplicações de solução de cloreto de sódio 0,9% e grupo ZOL aplicação de Zoledronato 100µg/kg, ambos via intraperitoneal a cada 3 dias durante 7 semanas, sem terapia local; grupo ZOL+aPDT recebeu aplicação de Zoledronato seguindo o mesmo protocolo e terapia de aPDT aplicada no alvéolo nos períodos de 0, 2 e 4 dias pós operatórios, sendo inicialmente aplicado azul de metileno (100µg/ml) com tempo de pré irradiação de 60 segundos e, em seguida, irradiação com laser de baixa potência utilizando um dispositivo a laser InGaAlP com spot de tamanho de 0,0283 cm², obedecendo aos seguintes parâmetros: 35 Mw; 2,1 J/ponto de 60s; 74,2 J/cm²; 1,23 W/cm²; o grupo ZOL+OZN que recebeu aplicação de Zoledronato e terapia local de óleo de girassol ozonizado (600 mEq/kg) em concentração de 0,3 mg/kg, durante 2 minutos nos períodos de 0, 2 e 4 dias pós operatório e, por fim, o grupo ZOL+aPDT+OZN que recebeu aplicação de Zoledronato e as terapias de aPDT e ozonioterapia seguindo os mesmos protocolos. A eutanásia foi realizada na sétima semana de experimento, 28 dias após a exodontia do primeiro molar inferior. Na histometria, as terapias associadas apresentaram maiores regiões de tecido ósseo neoformado em comparação aos grupos ZOL e ZOL+OZN (p<0,05), seguido do grupo ZOL+aPDT em comparação aos grupos VEI e ZOL. Todos os grupos que receberam as terapias, associadas ou não, apresentaram menores regiões de tecido ósseo não vital comparadas ao grupo ZOL (p<0,05). Qualitativamente, a histologia evidenciou osteócitos na matriz extracelular de tecido ósseo em formação. Dessa forma, pode-se concluir que as terapias apresentaram efeitos sinérgicos na prevenção de MRONJ.

Palavras-chave: Osteonecrose; Ozônio; Fotoquimioterapia.

SILVA, MC. Evaluation of the application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) and ozonized oil in the prevention of osteonecrosis of the jaws in senescent female rats treated with Zoledronate. 2023. 44 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Medication-induced osteonecrosis of the jaws (MRONJ) is a condition whose pathogenesis is still not fully understood and, therefore, without a well-established treatment protocol. In this sense, adjuvant local therapies such as ozone therapy and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) may have the potential to optimize tissue repair and thus show promising results in the prevention of these injuries. The objective of this project was to evaluate the potential of synergism in the application of the two therapies in the prevention of MRONJ in senile female rats treated with Zoledronate. For this purpose, 50 senile female rats (18 months old) were divided into 5 experimental groups (n=7). In the VEI group, the animals were submitted to applications of 0.9% sodium chloride solution and in the ZOL group, application of Zoledronate 100µg/kg, both intraperitoneally every 3 days for 7 weeks, without local therapy; the ZOL+aPDT group received Zoledronate application following the same protocol and aPDT therapy applied in the alveolus in the periods of 0, 2 and 4 days postoperatively, initially applying methylene blue (100µg/ml) with a pre-irradiation time of 60 seconds and then low power laser irradiation using an InGaAlP laser device with a spot size of 0.0283 cm², obeying the following parameters: 35 Mw; 2.1 J/60s point; 74.2 J/cm²; 1.23 W/cm²; the ZOL+OZN group that received application of Zoledronate and local therapy of ozonized sunflower oil (600 mEq/kg) at a concentration of 0.3 mg/kg, for 2 minutes in the periods of 0, 2 and 4 days postoperatively and, finally, the ZOL+aPDT+OZN group that received Zoledronate application and the aPDT and ozone therapy therapies following the same protocols. Euthanasia was performed in the sev

enth week of the experiment, 28 days after extraction of the lower first molar. In histometry, the associated therapies showed larger regions of newly formed bone tissue compared to the ZOL and ZOL+OZN groups (p<0.05), followed by the ZOL+aPDT group compared to the VEI and ZOL groups. All groups that received the therapies, associated or not, had smaller regions of non-vital bone tissue compared to the ZOL group (p<0.05). Qualitatively, histology showed osteocytes in the extracellular matrix of bone tissue in formation. Thus, it can be concluded that the therapies had synergistic effects in the prevention of MRONJ.

Keywords: Osteonecrosis; Ozone; Photochemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – (A) Instalação da ligadura de algodão no 1º molar inferior esquerdo. (B) Periodontite induzida pela ligadura de algodão em posição na 3ª semana após inserção. 18
- FIGURA 2 – Procedimento de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. (A) Luxação do dente. (B) Alvéolo logo após a extração. 19
- FIGURA 3 – (A) Aplicação de azul de metileno 100ug/ml por 60 segundos prévios, como fotossensibilizador. (B) Aplicação do laser de baixa potência InGaAlP de 600nm perpendicular à área de aplicação. 20
- FIGURA 4 – (A e B) Aplicação do óleo de girassol ozonizado em cureta de Molt em alvéolo após exodontia. 21
- 22
- FIGURA 5 – Linha do tempo evidenciando a ordem cronológica dos principais eventos do desenho experimental em animais. 23
- FIGURA 6 – Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. (a – e) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI (a), ZOL (b), ZOL-aPDT (c), ZOL-OZN (d), ZOL-aPDT-OZN (e). Abreviações e símbolos: asteriscos, biofilme com restos necróticos e bactérias; tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo; tonv, tecido ósseo não vital. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E). 28
- FIGURA 7 – Aspecto histológico do tecido ósseo situado nas adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. (a – e) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI (a), ZOL (b), ZOL-aPDT (c), ZOL-Ozn (d), ZOL-aPDT-Ozn (e). Abreviações e símbolos: asteriscos, biofilme com restos necróticos e bactérias; setas pretas, lacunas contendo osteócitos; setas vermelhas, lacunas vazias ou contendo remanescentes 29

celulares. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

FIGURA 8 - Porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF) no sítio 30
de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos:
Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey.
Símbolos: a, diferença estatisticamente significativa em relação ao
grupo VEI; b, diferença estatisticamente significativa em relação ao
grupo ZOL; c, diferença estatisticamente significativa em relação ao
grupo ZOL-aPDT; d, diferença estatisticamente significativa em relação
ao grupo ZOL-OZN.

FIGURA 9 – Porcentagem de tecido ósseo não vital (TONV) nas 31
adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia.
Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-
teste de Tukey. Símbolos: a, diferença estatisticamente significativa em
relação ao grupo VEI; b, diferença estatisticamente significativa em
relação ao grupo ZOL; c, diferença estatisticamente significativa em
relação ao grupo ZOL-aPDT; d, diferença estatisticamente significativa
em relação ao grupo ZOL-OZN.

LISTA DE SIGLAS

AAOMS	American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons
aPDT	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
CVEI	Grupo controle Salina
CZOL	Grupo controle Zoledronato
IP	Índice de peróxido.
mEq/kg	Miliequivalente por quilo
MRONJ	Osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos
OZN	Ozônio
PVPI	Iodopovidona
TONF	Tecido ósseo neoformado
TONV	Tecido ósseo não vital
ZOL	Zoledronato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO.....	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4 RESULTADOS	24
5 DISCUSSÃO	28
REFERÊNCIAS.....	32
ANEXOS	35

1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (MRONJ) é uma condição definida pela “American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons” (AAOMS) como a presença de tecido ósseo exposto na região maxilofacial por um período de mais de oito semanas em pacientes submetidos a terapias utilizando antirreabsortivos e antiangiogênicos e sem histórico de radioterapia na região de cabeça e pescoço e doenças metastáticas (1-3). O Zoledronato constitui um dos principais medicamentos envolvidos nessa condição e é o mais potente dos bifosfonatos, utilizado para tratamento de osteoporose e osteopenias, doença de Paget e para prevenção de metástases ósseas (1, 3, 4).

A ação dos bifosfonatos se baseia em sua intensa afinidade à hidroxiapatita e atuação específica a inibição da via do mevalonato nos osteoclastos, resultando na inibição do início do processo de remodelação óssea. Secundariamente, ocorre uma citotoxicidade nos tecidos moles através da interferência na migração de fibroblastos e ação antiangiogênica, o que leva a um atraso no processo de reparo e aumento na suscetibilidade às infecções, pela deficiência na resposta imune local (1, 5-7).

O fator de risco mais associado a MRONJ foi relatado por McGowan et al. (2017) como sendo a extração dentária, porém sabe-se que qualquer procedimento odontológico que requeira uma demanda metabólica óssea maior pode preceder o início de MRONJ (5, 8, 9). Fatores secundários como a presença de comorbidades sistêmicas associadas a dificuldade de reparo tecidual, como a diabetes mellitus e demais alterações metabólicas, podem desempenhar um importante papel para o início da doença (9, 10). Nesse sentido ainda, a senescência também se mostra um fator importante a ser considerado quanto ao metabolismo ósseo, justamente pelo comprometimento fisiológico do tecido, queda na homeostase e quadro natural de osteopenia e osteoporose, o que torna relevante a utilização dessa metodologia no experimento animal proposto por esta pesquisa (10-12).

Por apresentar uma etiopatogenia multifatorial, o que dificulta o tratamento das lesões patológicas, o manejo de MRONJ torna-se um desafio. As abordagens de tratamento descritas na literatura se baseiam no estadiamento

da doença e vão desde um tratamento conservador em estágios menos avançados a procedimentos cirúrgicos invasivos. Ervolino et al. (2019) e Monteiro et al. (2021) mostraram resultados preliminares relevantes no tocante a terapias adjuvantes à MRONJ com finalidade de contenção da MRONJ e favorecer o reparo dos tecidos moles (2, 13, 14).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) consiste na aplicação de um fotossensibilizador o qual é absorvido seletivamente por células microbianas que são altamente sensíveis à excitação por um determinado comprimento de onda de luz. O uso de faz com que os níveis de espécies reativas ao oxigênio aumentem, o que torna o ambiente altamente citotóxico à organismos microbianos. Além da ação antimicrobiana, o uso de laser de baixa potência promove fotobiomodulação na resposta inflamatória tecidual, permite angiogênese e aumento da atividade celular (2, 13, 15).

O ozônio (O_3) se apresenta na natureza como uma molécula gasosa com estrutura cíclica, que clinicamente, além da forma gasosa, pode ser utilizado dissolvido em soluções ou em forma de óleo. A suspensão oleosa do ozônio tem sido foco no que se diz respeito a cicatrização de feridas devido sua atuação na geração de fatores de crescimento e ação antioxidante local, auxiliando na promoção do reparo tecidual (12, 16-19). Xiao et al. (2017) observou que a terapia com óleo ozonizado acelerou o processo de reparo alveolar através da regulação das funções dos fibroblastos pelo aumento de genes críticos, incluindo o colágeno tipo I. O que corroborou com o estudo realizado por Monteiro et al. (2021) que avaliou o uso do óleo ozonizado na prevenção das lesões em MRONJ e encontrou resultados positivos na análise histológica do tecido ósseo.

O aPDT já tem sido aplicado na clínica odontológica para tratamento adjuvante de diversas condições, porém necessita de maior aprofundamento no tocante a aplicação em lesões de MRONJ (2, 13). Enquanto que a ozonioterapia local tem apresentado estudos pré-clínicos com bons resultados na prevenção e tratamento dessas lesões (16). Diante disso, se torna bastante relevante o estudo em modelo animal de ambas a terapias, como forma de avaliar sua aplicabilidade local separadamente e em associação, em busca de resultados eficientes quanto a reparação óssea e de tecido mole.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo avaliar o potencial de sinergismo na aplicação local do aPDT e óleo de girassol ozonizado em alvéolos de ratas senescentes tratadas com Zoledronato, em função do reparo ósseo alveolar pós-exodontia do primeiro molar inferior.

A hipótese nula do trabalho foi que as terapias testadas não apresentariam diferenças significativas no reparo ósseo comparadas aos grupos controles.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Essa pesquisa seguiu todos os preceitos e princípios éticos para 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, e obteve parecer favorável através do processo nº 0469-2021.

Foram utilizados 35 animais ($n=7$) (*Rattus norvegicus albinus Wistar*) senis, fêmeas, com aproximadamente 18 meses, com peso corporal variando entre 300 a 350 gramas, de uma linhagem do Biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição.

Para a determinação do número amostral, o cálculo do Poder do Teste seria realizado utilizando o programa estatístico SigmaPlot 12.0 (Exakt graph and Data analysis, San Jose, CA, USA). Para a utilização dos dados da literatura, tais como diferenças das medias e desvio padrão, uma busca nas principais bases de dados disponíveis (PUBMED, Scoups, Embase, Web of Science e Scielo) foi realizada, por meio de trabalhos de experimentação animal que envolvesse a aplicação local de aPDT e/ou óleo ozonizado através da padronização das palavras-chaves “Osteonecrose; Ozônio; Fotoquimioterapia”, porém não foram encontrados os dados necessários para o teste, inviabilizando a realização do mesmo. Sendo assim, o número de animais por grupo experimental foi baseado nos trabalhos de Ervolino et al. (2019), Xiao et al. (2017) e Lim et al. (2019) que apresentam a metodologia no qual esse projeto se baseou, ficando assim o valor de $n=7$ por grupo experimental.

Os animais ($n=7$) foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais, sendo:

- Grupo VEI: receberam 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (solução salina) intraperitoneal, a cada 3 dias, por 7 semanas, simulando os procedimentos com o Zoledronato (controle negativo);

- Grupo ZOL: aplicação de Zoledronato 100µg/kg, a cada 3 dias por 7 semanas (controle positivo);

- Grupo ZOL+aPDT: aplicação de Zoledronato no mesmo protocolo e de aPDT com aplicação de azul de metileno (100µg/ml) e pré-irradiação de 60 segundos no alvéolo, em seguida irradiação com laser de baixa potência nos períodos de 0, 2 e 4 dias pós-operatórios.

- Grupo ZOL+Ozn: Aplicação de Zoledronato e a terapia local com óleo de girassol ozonizado (30 ml – 600 mEq/kg) em concentração de 0,3 mg/kg, durante 2 minutos, período em que o animal estará imobilizado, também aos 0, 2 e 4 dias pós cirúrgico;

- Grupo ZOL+aPDT+Ozn: aplicação de Zoledronato, terapia de aPDT e terapia com ozônio usando os protocolos já citados.

As doses do plano medicamentoso foram baseadas em terapias oncológicas em humanos, adaptadas para animais (2, 13, 20).

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração balanceada contendo 1,4% Ca e 0,8% P (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante toda pesquisa experimental e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos, que apresentou jejum hídrico.

3.2 Delineamento do procedimento cirúrgico

Todos os procedimentos experimentais que poderiam desenvolver dor ou desconforto para os animais foram realizados sob anestesia geral pela combinação de 50mg/kg de Quetamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil), e cloridrato de mepivacaína (0,3 ml/kg, Scandicaíne 2% com adrenalina

1:100.000, Septodont França) como anestesia local e hemostasia da área operada (2, 13, 20).

3.2.1 Pré operatório

Cronologicamente, a intervenção iniciou no dia **-1** após ambientalização com a indução de periodontite experimental através da colocação de uma ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo de cada animal (2, 21-23) (Figura 1).

Figura 1 - (A) Instalação da ligadura de algodão no 1º molar inferior esquerdo. (B) Periodontite induzida pela ligadura de algodão em posição na 3ª semana após inserção.



Fonte: Autor (2021).

3.2.2 Período de indução da Osteonecrose

No dia **0** iniciou-se a aplicação de Zoledronato através do protocolo de 100µg/kg diluídos em 0,45 ml de solução salina, por via intraperitoneal, em uma seringa SLIP INSULINA de 1ml, descartável com agulha de calibre 13mm x 0,38mm, a cada 3 dias por 7 semanas, até a eutanásia. Os grupos que

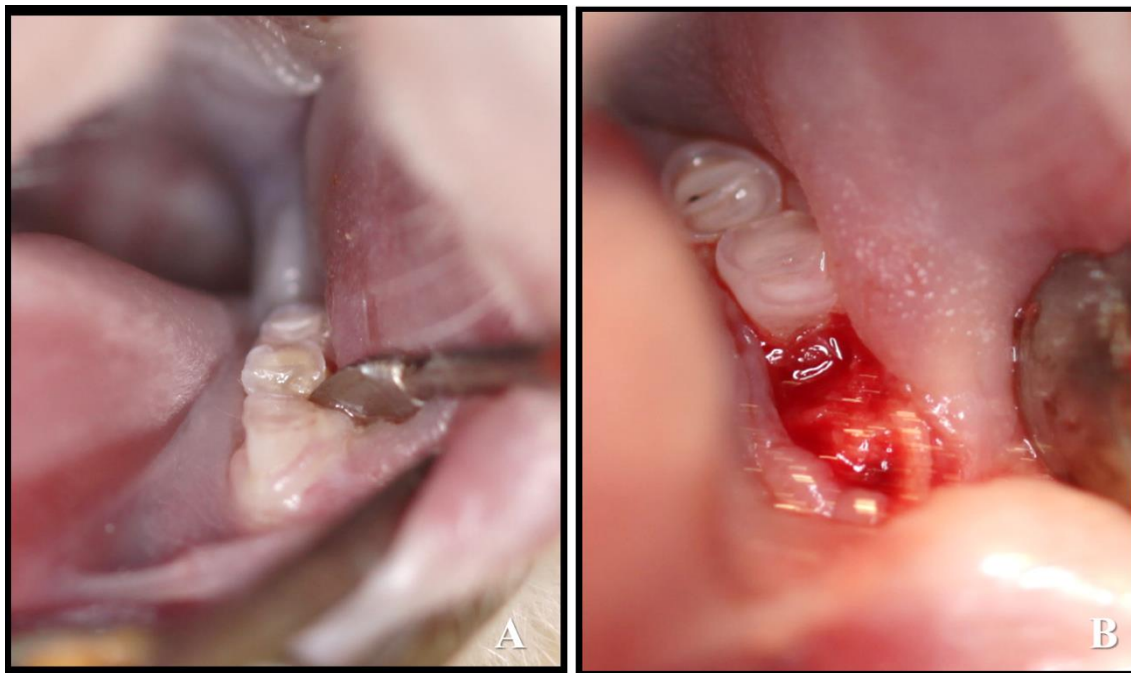
receberam o Zoledronato incluem o grupo **ZOL** (apenas aplicação do Zoledronato), **ZOL+aPDT** (aplicação de Zoledronato e aPDT), **ZOL+Ozn** (aplicação de Zoledronato e óleo de girassol ozonizado) e **ZOL+aPDT+Ozn** (aplicação de Zoledronato, aPDT e óleo de girassol ozonizado).

Os animais do grupo **VEI** que não foram expostos ao medicamento receberam 0,45 ml de solução salina também por via intraperitoneal, com o mesmo modelo de seringa, para mimetizar o estresse do manejo dos animais do grupo teste (2, 24, 25).

3.2.3 Exodontia

Sob sedação (Quetamina associada a Xilazina, como descrito anteriormente), após 3 semanas do início da medicação, as ratas foram posicionadas na mesa de operação; removida a ligadura de algodão e, após a antisepsia bucal com PVPI 10% (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), foi realizada a sindesmotomia dos tecidos adjacentes ao dente, luxação e, por fim, extração do primeiro molar inferior esquerdo, utilizando materiais cirúrgicos odontológicos adaptados aos animais. Todas as ratas, de todos os grupos experimentais, foram submetidas a esse procedimento (2) (Figura 2).

Figura 2 – Procedimento de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. (A) Luxação do dente. (B) Alvéolo logo após a extração.

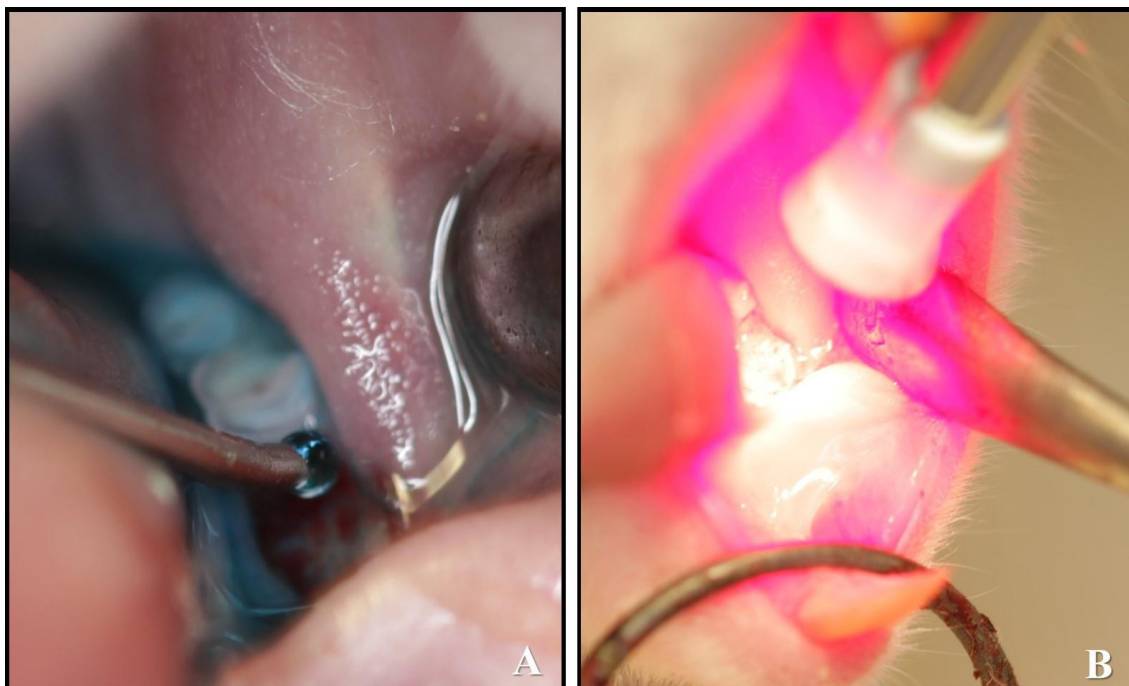


Fonte: Autor (2021).

3.2.4 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

Após a exodontia, as ratas pertencentes aos grupos **ZOL+aPDT** e **ZOL+aPDT+Ozn** passaram por sessões de aPDT no local de extração nos períodos de 0 (pós operatório imediato), 2 e 4 dias pós operatórios através da utilização de azul de metileno (100ug/ml) como substância fotossensibilizadora que foi mantida no local de extração durante 60 segundos e posteriormente, com o posicionamento da ponta do laser em um único ponto no centro do local de extração, paralela ao longo eixo do dente e em contato com a área. Para a irradiação a laser de baixa potência foi utilizado um dispositivo a laser InGaAlP (600nm; Thera Lase®, DMC Equipamentos Ltda®, SP, Brasil) com spot de tamanho de 0,0283 cm², obedecendo aos seguintes parâmetros: potência de 35 mW; operação contínua; ponto de energia de 2,1 J/ ponto de 60s, densidade energia de 74,2 J/cm²; intensidade de potência de 1,23 W/cm² (13) (Figura 3).

Figura 3 – (A) Aplicação de azul de metileno 100ug/ml por 60 segundos prévios, como fotossensibilizador. (B) Aplicação do laser de baixa potência InGaAlP de 600nm perpendicular à área de aplicação.



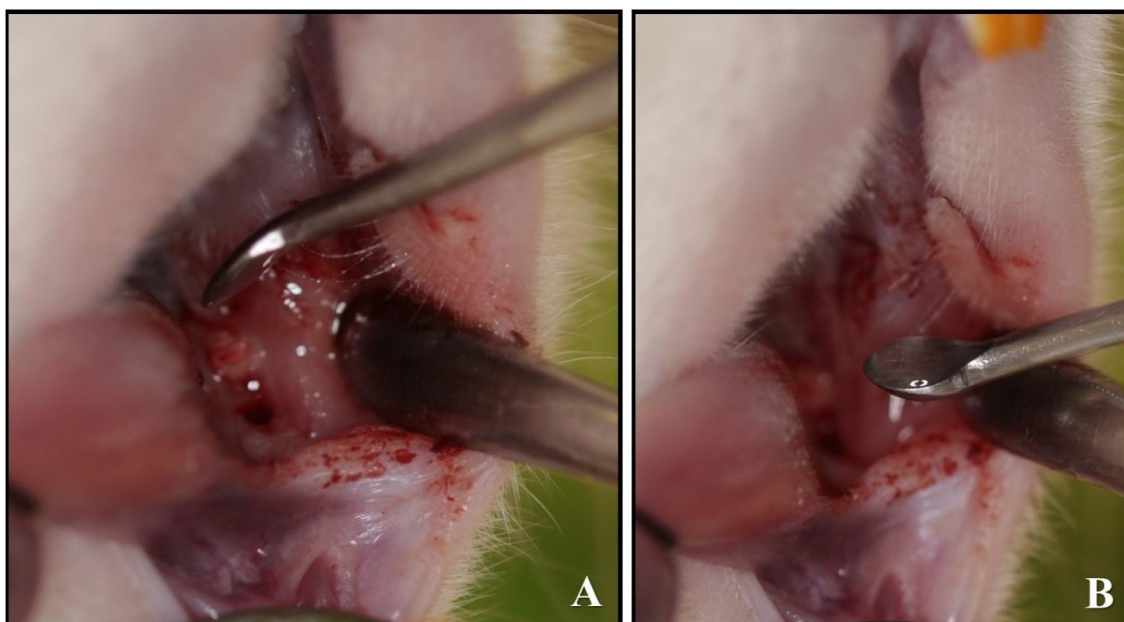
Fonte: Autor (2021).

3.2.5 Ozonioterapia

Além disso, as ratas pertencentes aos grupos **ZOL+Ozn** e **ZOL+aPDT+Ozn** foram submetidas a ozonioterapia através da aplicação de óleo de girassol ozonizado ((30 ml – 600 mEq/kg) da empresa “Philozon” (Industria e Comércio de Geradores de Ozônio – Balneário Camboriú - SC)) na região de alvéolo correspondente ao primeiro molar inferior, em concentração de 0,3mg/kg em uma seringa descartável de 1 ml com agulha de calibre 13mm x 0,38mm. A aplicação teve duração de 2 minutos cada, com contenção do animal, nos períodos de 0 (pós operatório imediato), 2 e 4 dias (17, 19, 24) (Figura 4).

Para comprovação do índice de peróxido no óleo utilizado, a empresa emitiu um laudo de análise de óleo ozonizado, comprovando que o produto utilizado apresentava 600 mEq/kg. No grupo **ZOL+aPDT+Ozn** realizou-se aplicação, primeiramente, do aPDT no protocolo citado, seguido da ozonioterapia com óleo de girassol ozonizado, para que a densidade do óleo não atrapalhasse a aplicação do fotossensibilizador.

Figura 4 – (A e B) Aplicação do óleo de girassol ozonizado em cureta de Molt em alveólo após exodontia.



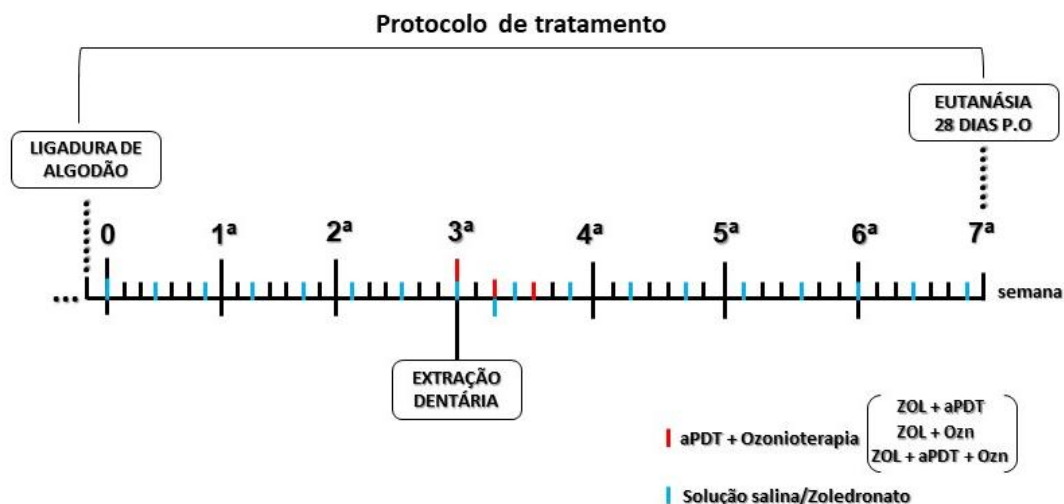
Fonte: Autor (2021).

3.2.6 Eutanásia

Os grupos foram submetidos a eutanásia após 28 dias do procedimento de extração dos dentes dos grupos, totalizando 7 semanas (Figura 5).

Na eutanásia foi aplicado um protocolo em que as ratas foram anestesiadas e submetidas à eutanásia por perfusão cardíaca, por meio da combinação de 100 ml de solução salina e 0,1% de heparina e 800ml de formaldeído 4% (Sigma Chemical®, St. Louis, MO, USA) em tampão fosfato-salino (PBS – Sigma Chemical®) 0.1 M, 4°C, pH 7.4. Posteriormente, as hemimandíbulas foram cuidadosamente dissecadas e pós-fixadas por 24 horas em paraformaldeído 4% (20).

Figura 5 – Linha do tempo evidenciando a ordem cronológica dos principais eventos do desenho experimental em animais.



Fonte: Autor (2021).

3.3 Análise e processamento dos tecidos descalcificados

As hemimandíbulas foram removidas e seguiram para o fixador por 72 horas e, após isso, foram submetidas a um banho de água corrente por 12 horas e partiram para a descalcificação em ácido etilenodiamino tetra-acético 10% (EDTA) por 6-8 semanas. Após a descalcificação, a região correspondente ao alvéolo e estruturas adjacentes da extração foram separadas. Assim, as peças seguiram para a desidratação numa sequência de álcoois (70 a 100%). Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 4 µm de espessura e a confecção das lâminas. Foram coletadas, de lingual para vestibular, as secções histológicas da porção do alvéolo dental e tecidos adjacentes analisados. A primeira e a última lâmina foram de cada grupo foram destinadas a coloração em hematoxilina e eosina (HE) (2, 13).

3.3.1 Análise histomorfométrica das amostras

Esta análise foi baseada no estudo de Guiati (2022). Para análises da porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF) e porcentagem de tecido ósseo não vital (TONV) foram capturadas imagens de quatro regiões do alvéolo, utilizando uma câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) acoplada ao

microscópico óptico (Axiolab, Carl Zeiss) e conectada a um microcomputador. Dentre as regiões: (1) sítio de extração anteriormente ocupado pela raiz mesial do primeiro molar inferior; (2) sítio de extração anteriormente ocupado pela raiz distal do primeiro molar inferior; (3) tecido ósseo situado no septo interradicular e (4) tecido ósseo situado na área desdentada localizada imediatamente a frente do primeiro molar inferior.

As regiões 1 e 2 foram empregadas para avaliação de TONF no interior dos alvéolos dentais. Para isso, dois retângulos foram posicionados no centro do sítio de extração na mesial e outro na distal do primeiro molar inferior. A base maior dos retângulos acompanhava o longo eixo das raízes e tinham como limite apical a base dos alvéolos dentais.

As regiões 3 e 4 foram empregadas para avaliação de TONV nas regiões adjacentes ao sítio de extração dentária. Para isso, dois retângulos foram posicionados no centro do septo interradicular, com a base maior acompanhando o longo eixo das raízes dentais; e, o outro, no tecido ósseo situado na área desdentada logo a frente do sítio de extração, anteriormente ocupado pela raiz mesial do primeiro molar inferior, sendo que a base maior do retângulo acompanhava a crista óssea alveolar. Cada retângulo apresentava 710µm de altura e 530µm de largura, perfazendo uma área de 0.38mm². Como no sítio de extração dental e adjacências foram avaliadas em quatro regiões, a área total avaliada no presente estudo foi de 1,52mm² (26).

3.4 Análise estatística

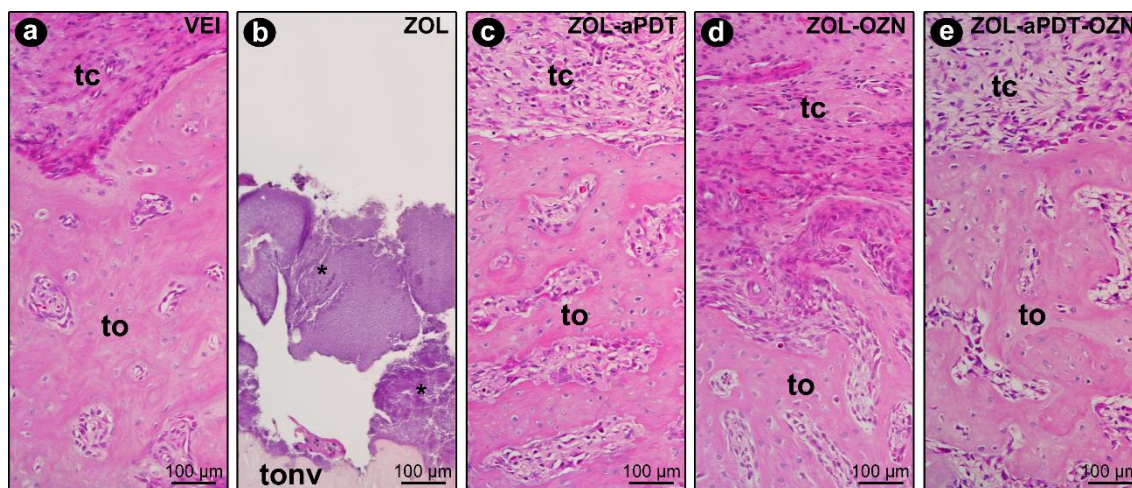
Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos que foram obtidos através da histometria (AON, TONV) foi abordada a diferença entre os grupos experimentais (VEI; ZOL; ZOL+aPDT; ZOL+Ozn; ZOL+aPDT+Ozn). Todos os dados foram submetidos à curva de normalidade teste de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Para todos os testes, o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). O programa estatístico utilizado foi o SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Histologia

A análise histológica evidenciou tecido necrótico, como esperado, no grupo ZOL em regiões adjacentes e no interior do alvéolo remanescente, inclusive com áreas contendo bactérias. Já os grupos em que foram realizadas as terapias de aPDT e ozonioterapia, tanto isoladamente quanto associados, apresentaram-se com regiões significativas de tecido ósseo vital e poucas áreas necróticas. Pode-se observar no sítio de extração dentária e nas regiões adjacentes áreas de tecido ósseo vital lacunas de osteócitos ocupadas e trabéculas ósseas neoformadas densas e tecido conjuntivo. Na análise qualitativa intergrupos, o grupo ZOL+aPDT+OZN apresentou regiões mais extensas de tecido ósseo vital, seguida dos grupos ZOL+aPDT e ZOL+OZN (Figuras 6 e 7).

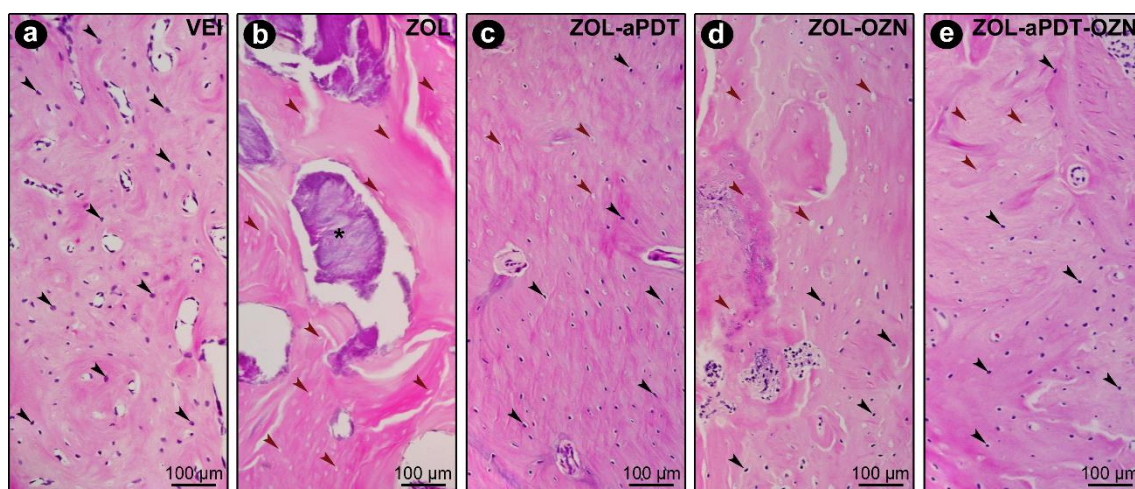
Figura 6: Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. (a – e) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI (a), ZOL (b), ZOL-aPDT (c), ZOL-OZN (d), ZOL-aPDT-OZN (e). Abreviações e símbolos: asteriscos, biofilme com restos necróticos e bactérias; tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo; tonv, tecido ósseo não vital. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).



Fonte: Autor (2021).

Figura 7: Aspecto histológico do tecido ósseo situado nas adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. (a – e) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI (a), ZOL (b), ZOL-aPDT (c), ZOL-OZN (d), ZOL-aPDT-OZN (e). Abreviações e símbolos: asteriscos, biofilme

com restos necróticos e bactérias; setas pretas, lacunas contendo osteócitos; setas vermelhas, lacunas vazias ou contendo remanescentes celulares. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 μ m. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

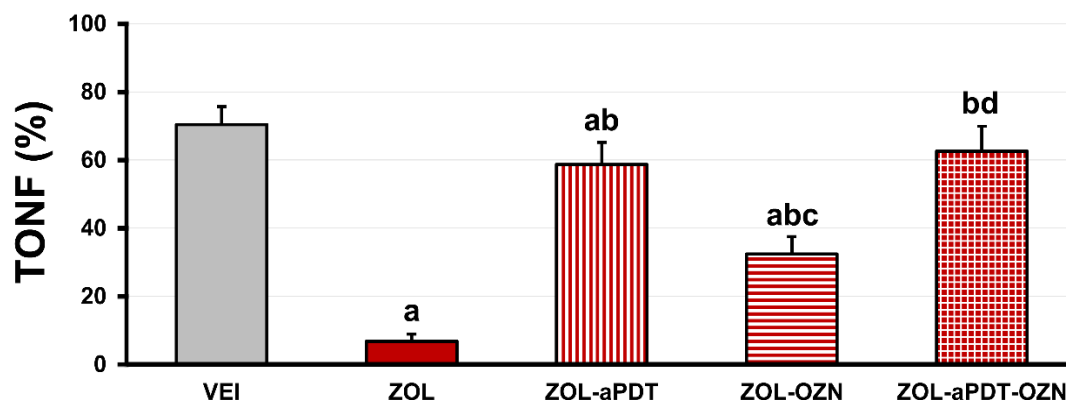


Fonte: Autor (2021).

4.3 Histometria

Em relação à porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF), pode-se observar o maior valor para VEI ($p < 0,05$) em comparação aos grupos ZOL, ZOL+aPDT e ZOL+OZN; seguido do grupo ZOL+aPDT+OZN ($p < 0,05$) em comparação aos grupos ZOL e ZOL+OZN. Seguido ainda do grupo ZOL+aPDT ($p < 0,05$) em comparação aos grupos controles; e ZOL+OZN ($p < 0,05$) em comparação aos grupos controle e ao grupo ZOL+aPDT (Figura 8).

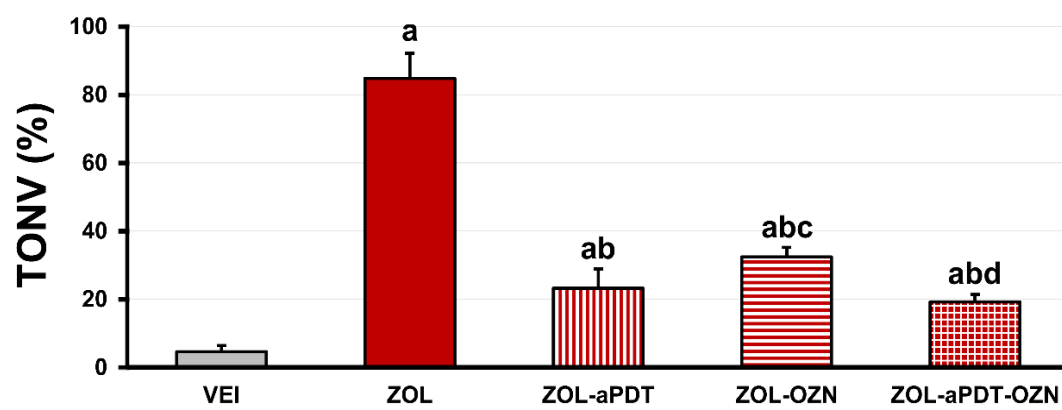
Figura 8: Porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF) no sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolos: *a*, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; *b*, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; *c*, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-aPDT; *d*, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-OZN.



Fonte: Autor (2021).

Quanto a porcentagem de tecido ósseo não vital (TONV) o grupo ZOL apresentou o maior valor na comparação com as terapias realizadas (ZOL+aPDT, ZOL+Ozn e ZOL+aPDT+Ozn) ($p < 0,05$); seguido do grupo ZOL+OZN ($p < 0,05$) em comparação aos grupos controle e ao grupo ZOL+aPDT. Enquanto que os grupos ZOL+aPDT e ZOL+aPDT+OZN apresentaram, depois do grupo VEI; respectivamente, os menores valores de TONV (Figura 9).

Figura 9: Porcentagem de tecido ósseo não vital (TONV) nas adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolos: a, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; b, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; c, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-aPDT; d, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-OZN.



Fonte: Autor (2021).

5 DISCUSSÃO

A ocorrência de MRONJ tem tido um aumento nos últimos anos devido à alta taxa de prescrição de antirreabsortivos (2, 18). Estes apresentam aplicações por via intravenosa ou oral e, segundo a AAOMS (2022), em casos de uso de bifosfonatos para tratamento de osteoporose, o risco de desenvolvimento de MRONJ é de 0,02 a 0,05%, respectivamente. Enquanto que para aplicações oncológicas, o risco aumenta para 1,3 a 1,8% em três anos de uso da terapia (2, 3, 18) .

Independente da indicação de uso, certamente a duração da terapia com antirreabsortivos é um fator de risco ao desenvolvimento de MRONJ, o que constitui mais um elemento a sua etiopatogenia multifatorial (27, 28). Neste sentido, com ênfase aos bifosfonatos, os quais apresentam meia vida em ordem de anos pela alta afinidade a hidroxiapatita, a interrupção na administração a curto prazo da medicação além de não ser benéfica ao paciente, pode não atenuar a sintomatologia justamente por sua farmacocinética (3, 16).

Por isso, a busca por terapias preventivas adjuvantes no manejo de MRONJ se torna tão importante, ainda mais em um modelo experimental que mimetiza a condição clínica predominante neste cenário. Além disso, é um fator importante neste manejo o conhecimento sobre condições sistêmicas que podem aumentar sua incidência, sempre levando em conta que estratégias terapêuticas preventivas são ideais (3, 16). Khan et al. (2015) enfoca o quanto a melhora da qualidade de vida é importante e que as buscas por estas terapias preventivas auxiliam na melhora do prognóstico clínico (29).

Já é bem elucidado que o ozônio apresenta alta capacidade antioxidante. Segundo Lim et al. (2019), ocorre a liberação de radicais livres de oxigênio, o que aumenta a capacidade fagocitária das células imunes e auxilia na cicatrização de feridas (18, 19). A liberação destes radicais se torna importante em um microambiente em condições de hipóxia, como nos casos de MRONJ, já que os tecidos com deficiência na oxigenação não conseguem atingir as demandas necessárias para que ocorra o processo de reparo. Além disso, também se sabe que ocorre um aumento na vascularização local pela indução

na produção de fatores de crescimento, algo que também está em déficit em pacientes que fazem uso de bifosfonatos (16).

A manutenção tecidual do alvéolo foi notada em nossas análises tanto na aplicação isolada de ozônio, mesmo que de forma inferior, quanto associado ao aPDT, sendo possível identificar extensas áreas com osteócitos nas lacunas e de tecido ósseo vital; o que faz com que a hipótese nula seja rejeitada. O encontrado corrobora com o estudo de Monteiro et al. (2021), o qual identificou regiões histológicas semelhantes, com resultados pré-clínicos promissores no uso de óleo ozonizado para prevenção de desenvolvimento de MRONJ (16). Ripamonti et al. (2011) ainda apresentou uma aplicabilidade clínica do ozônio em suspensão oleosa em casos de MRONJ com pequenas exposições ósseas não associada à intervenção cirúrgica, observando preliminarmente que a opção terapêutica desta suspensão é uma alternativa segura e simples para manejo das lesões, além de apresentar baixo custo e ser possível realizar uma autoaplicação (18).

Sua ação antimicrobiana e de prevenção de liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), advindas do estresse oxidativo, também são elucidadas por diversos estudos em literatura, porém ainda não se tem um protocolo de uso desta terapia com quantidade de peróxidos e aplicações suficientes para contemplar o máximo de sua efetividade (16, 17). Por isso, há uma dificuldade de comparação entre estes estudos, pois não há uma padronização nestas suspensões, mesmo que nosso estudo priorizou utilizar um óleo ozonizado certificado pela empresa, em que foi possível identificar as propriedades físico-químicas de produção do óleo. Foi observado, por exemplo, que doses altas de ~3000 mEq/kg retardaram a cicatrização de feridas cutâneas em modelo de camundongos (30, 31). Ainda que existam estas limitações, podemos observar em nossas análises um resultado biológico importante e promissor que pode nos oferecer uma base para futuros estudos clínicos.

O uso do laser de baixa potência apresenta uma aplicabilidade em diversas áreas da medicina devido seu efeito fotobiomodulatório e antimicrobiano, quando associado à pré-irradiação com os agentes fotossensíveis, além de melhorar as condições dolorosas e promover a

otimização no reparo tecidual (2, 13). Por este motivo, tem se tornado alvo de estudos para aplicação desta terapia em pacientes com MRONJ. Ervolino et al. (2019) mostrou, por meio de análise histológica e imuno-histoquímica, que a terapia com aPDT é capaz de levar a uma melhora significativa no processo de reparo alveolar e prevenir ocorrência de lesões de MRONJ em ratas senis (13).

A utilização de um fotossensibilizador associado ao laser de baixa potência permite com que haja uma prevenção na ocorrência de infecções pelo controle da microbiota local e auxilia no processo de reparo a nível de tecido mole, por estímulo da angiogênese (13, 15). Nos resultados do presente estudo, foi possível observar que o grupo que recebeu a terapia aPDT isoladamente já foi suficiente para prevenção de MRONJ, evidenciado pelo reparo tecidual com extensas áreas de tecido ósseo vital e osteócitos ativos.

Ainda não exista um pleno consenso sobre possíveis efeitos sistêmicos do aPDT em regiões neoplásicas, há recomendação que se contraindique seu uso nessas regiões, já que há um estímulo em nível celular para proliferação e formações de vasos sanguíneos (32). Em uma prerrogativa clínica, por conta dos resultados aqui apresentados, o ozônio poderia ser uma alternativa melhor e efetiva para prevenção de MRONJ nessas condições. Sendo que, em condições clínicas ideais, a aplicação somente do aPDT já se faz suficiente, mesmo que a associação de ambas terapias apresentou resultados promissores e sinérgicos no reparo tecidual. Por este motivo, o nosso grupo de pesquisa tem investigado, em pesquisas paralelas não publicadas ainda, diferentes concentrações de peróxidos em óleo de girassol ozonizado em ratas senis também tratadas com Zoledronato, sendo possível até mesmo associar o uso do aPDT a estas diferentes concentrações e, assim, nortear as aplicações clínicas.

Diante de ambas as terapias mostrarem um melhor reparo tecidual e preventivo de MRONJ isoladamente e, associadas, apresentarem um efeito sinérgico, a reconstrução alveolar, neste momento, se torna algo secundário, por conta da necessidade de conhecimento de outros fatores para completa cura da doença. Os próximos passos deste trabalho, com análises imunoistoquímicas e microtomográficas, contribuirá para os achados nestas análises preliminares, para o delineamento de pesquisas clínicas futuras.

Este estudo apresentou algumas limitações que precisam ser salientadas. Além de ser um estudo pré-clínico em que não é possível transcrever diretamente o que aconteceria com os humanos, a principal limitação é devido à dificuldade em se precisar o tempo de manutenção do óleo ozonizado no alvéolo para que ele possa exercer as funções propostas. Mesmo que o tempo de dois minutos foi utilizado para padronização dos grupos, que representa o tempo em que o animal ficou estabilizado com o óleo na aplicação, não se sabe efetivamente quanto tempo a solução permaneceu na região exercendo sua ação modulatória e antimicrobiana. E, mesmo que foram observados resultados favoráveis ao reparo, este pode ser um fator que não permita maior ação em nível de similaridade a aPDT na comparação isolada ou, até mesmo, na associação das terapias. Acreditamos que a engenharia tecidual possa analisar formulações mais densas do óleo ozonizado em estudos futuros e essa assertiva possa ser confirmada.

Diante do exposto, pode-se inferir que o uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e ozonioterapia em suspensão de óleo podem ser administradas para prevenção de MRONJ, em associação ou isoladamente, por atuarem de modo sinérgico e benéfico a esta condição, atuando na melhora da qualidade tecidual, permitindo a manutenção local e osteogênese.

REFERÊNCIAS

1. 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. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2014;72(10):1938-56.
2. Statkiewicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, de 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. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2018;184:7-17.
3. Ruggiero SL, Dodson TB, Aghaloo T, Carlson ER, Ward BB, Kademani D. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2022 Update. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2022.
4. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2004;62(5):527-34.
5. de-Freitas N-R, Lima L-B, de-Moura M-B, Veloso-Guedes C-d-C-F, Simamoto-Júnior P-C, de-Magalhães D. Bisphosphonate treatment and dental implants: A systematic review. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*. 2016;21(5):e644.
6. Marx RE, Cillo Jr JE, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2007;65(12):2397-410.
7. Mendes V, Dos Santos G, Calasans-Maia M, Granjeiro J, Moraschini V. Impact of bisphosphonate therapy on dental implant outcomes: An overview of systematic review evidence. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2019;48(3):373-81.
8. Aljohani S, Fliefel R, Ihbe J, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. What is the effect of anti-resorptive drugs (ARDs) on the development of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in osteoporosis patients: A systematic review. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2017;45(9):1493-502.
9. McGowan K, McGowan T, Ivanovski S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: A systematic review. *Oral Diseases*. 2018;24(4):527-36.
10. Gómez Font R, Martínez García ML, Olmos Martínez JM. Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments: update. 2008.
11. Otto S, Schnödt EM, Haidari S, Brunner TF, Aljohani S, Mosleh M, et al. Autofluorescence-guided surgery for the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): A retrospective single-center study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2021;131(5):519-26.
12. Toker H. The effects of allograft combined with ozone therapy on regeneration of calvarial defects in rats. *Cumhuriyet Dental Journal*. 2016;19(3):205-13.
13. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone*. 2019;120:101-13.

14. Heifetz-Li JJ, Abdelsamie S, Campbell CB, Roth S, Fielding AF, Mulligan JP. Systematic review of the use of pentoxifylline and tocopherol for the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2019;128(5):491-7. e2.
15. Momesso GAC, Lemos CAA, Santiago-Júnior JF, Faverani LP, Pellizzer EP. Laser surgery in management of medication-related osteonecrosis of the jaws: a meta-analysis. *Oral and maxillofacial surgery*. 2020;24(2):133-44.
16. Monteiro C, Vieira E, Emerick C, Azevedo R, Pascoal V, Homsí N, et al. Ozonated oil effect for prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in rats undergoing zoledronic acid therapy. *Clinical Oral Investigations*. 2021:1-7.
17. Xiao W, Tang H, Wu M, Liao Y, Li K, Li L, et al. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Bioscience reports*. 2017;37(6).
18. Ripamonti CI, Cislighi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O₃) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: Preliminary results of a phase I–II study. *Oral oncology*. 2011;47(3):185-90.
19. Lim Y, Lee H, Woodby B, Valacchi G. Ozonated oils and cutaneous wound healing. *Current Pharmaceutical Design*. 2019;25(20):2264-78.
20. Toro LF, de Mello-Neto JM, Dos Santos FFV, Ferreira LC, Statkiewicz 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. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-15.
21. Aghaloo T, Hazboun R, Tetradis S. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaws. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics*. 2015;27(4):489-96.
22. Song M, Alshaikh A, Kim T, Kim S, Dang M, Mehrazarin S, et al. Preexisting periapical inflammatory condition exacerbates tooth extraction–induced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw lesions in mice. *Journal of endodontics*. 2016;42(11):1641-6.
23. Thumbigere-Math V, Michalowicz BS, Hodges JS, Tsai ML, Swenson KK, Rockwell L, et al. Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of periodontology*. 2014;85(2):226-33.
24. Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M, Bassorgun I, Ozler M, Oter S, et al. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2014;43(6):777-83.
25. Kan B, Sencimen M, Bayar GR, Korkusuz P, Coskun AT, Korkmaz A, et al. Histomorphometric and microtomographic evaluation of the effects of hyperbaric oxygen and systemic ozone, used alone and in combination, on calvarial defect healing in rats. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2015;73(6):1231. e1-. e10.
26. Guiati IZ. Avaliação do emprego da curcumina associada ao diodo emissor de luz durante o reparo alveolar em ratas com alto risco para a osteonecrose dos maxilares. 2022.
27. Zavras AI, Zhu S. Bisphosphonates are associated with increased risk for jaw surgery in medical claims data: is it osteonecrosis? *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2006;64(6):917-23.

28. Fitzpatrick SG, Stavropoulos MF, Bowers LM, Neuman AN, Hinkson DW, Green JG, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws in 3 osteoporotic patients with history of oral bisphosphonate use treated with single yearly zoledronic acid infusion. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;70(2):325-30.
29. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2015;30(1):3-23.
30. Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Mediators of Inflammation 2010. Article ID.610418.
31. Valacchi G, De Luca C, Wertz PW. Lipid mediators in skin inflammation: updates and current views. *Hindawi*; 2010.
32. Ribeiro MS, Zezell DM. Laser de baixa intensidade. *A Odontologia e o laser São Paulo: Quintessense*. 2004.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal



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 **"Sinergismo na aplicação de óleo ozonizado e terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento de osteonecrose de maxilares em ratas senis tratadas com zoledronato"**, Processo FOA nº 0469-2021, 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 Setembro de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Setembro de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Outubro de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Synergism in the application of the ozonized oil and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of osteonecrosis of the jaws in senile rats treated with zoledronate"**, Protocol FOA nº 0469-2023, 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 September 24, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: September 30, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: October 30, 2023.

Prof. Associado 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

ANEXO B



JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY

Após a defesa a dissertação será formatada e enviada para publicação no
Periódico: Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology -
[https://www.elsevier.com/journals/journal-of-photochemistry-and-
photobiology-b-biology/1011-1344/guide-for-authors](https://www.elsevier.com/journals/journal-of-photochemistry-and-photobiology-b-biology/1011-1344/guide-for-authors)

ANEXO C - Laudo de análise de óleo ozonizado

 Philozon	LAUDO DE ANÁLISE DE ÓLEO OZONIZADO
---	---

PRODUTO: Óleo de Girassol Ozonizado	INCI: Ozonized Sunflower Seed Oil
LOTE FORNECEDOR: 1231151	DATA DE FABRICAÇÃO: 23/02/2022
LOTE PHILOZON: 5422C	DATA DE VALIDADE: 23/02/2023

1. ESPECIFICAÇÕES SENSORIAIS E FÍSICO-QUÍMICAS

PROPRIEDADES	LIMITE DE ACEITAÇÃO	METODOLOGIA	RESULTADO
ASPECTO (25 °C)	Líquido transparente a levemente opaco	Determinação da descrição (aspecto) Ensaio qualitativo - Farm. Bras. 5ª Ed., 2010, capítulo 4 generalidades, p. 54-55.	Líquido transparente
COLORAÇÃO	Amarelo palha a amarelo ouro	Determinação da cor de líquidos, Ensaio qualitativo - Farm. Bras. 5ª Ed., 2010, capítulo 5.2.12, p. 92-93.	Amarelo palha
ODOR	Característico	Determinação de odor. Ensaio qualitativo - Farm. Bras. 5ª Ed., 2010, capítulo 5.4.1.1, p. 193.	Característico
PUREZA	-	Laudo emitido pelo fornecedor.	Conforme
DENSIDADE (20 °C)	0,910 – 1,030	Conforme Farm. Bras. 5ª Ed., 2010, capítulo 5.2.4, p. 86.	0,975 g/cm³
VISCOSIDADE (25 °C)	650 – 920	Conforme Farm. Bras. 5ª Ed., 2010, capítulo 5.2.5, p. 90.	787 mPa.s
ÍNDICE DE PERÓXIDO	> 350	Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1.: Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 287	599,7 meq/1000g

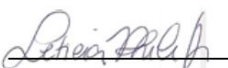
2. ACONDICIONAMENTO E ROTULAGEM

PRODUTO ACABADO	ACONDICIONAMENTO	ROTULAGEM (LxC)	RESULTADO
30 mL	Frasco Tarot (Vidro)	Etiqueta Adesiva (10x3,1 cm)	Conforme
500 mL	Garrafa Branca (PET)	Etiqueta Adesiva (7x4,5 cm)	Conforme
1000 mL	Garrafa Branca (PET)	Etiqueta Adesiva (7x4,5 cm)	Conforme

Insumo Cosmético

LAUDO EMITIDO POR:

Leticia Philippi - CRF-SC: 5084



Responsável Técnica

DATA DA EMISSÃO: 07/03/2022

FABRICANTE:

Philozon Indústria e Comércio de Geradores de Ozônio Ltda
Rua Amador Bueno da Ribeira, 258 - Bairro Nova Esperança
CEP: 88336-320 – Balneário Camboriú /SC
Fone (47) 3366-7000

RQ_333 Rev07

Documento emitido eletronicamente