

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
dissertação será disponibilizado
somente a partir de 27/02/2027

LETÍCIA GABRIELLA DE SOUZA RODRIGUES

**BIOMATERIAL PIROFOSFATO DE CÁLCIO INCORPORADO
EM SCAFFOLD DE ALGINATO COMO TERAPIA
PREVENTIVA PARA OSTEONECROSE**

**Araçatuba - SP
2025**

LETÍCIA GABRIELLA DE SOUZA RODRIGUES

**BIOMATERIAL PIROFOSFATO DE CÁLCIO INCORPORADO
EM SCAFFOLD DE ALGINATO COMO TERAPIA
PREVENTIVA PARA OSTEONECROSE**

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

Área de Concentração: Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. Francisley Ávila Souza.

**Araçatuba - SP
2025**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

R696b	Rodrigues, Letícia Gabriella de Souza. Biomaterial pirofosfato de cálcio incorporado em scaffold de alginato como terapia preventiva para osteonecrose / Letícia Gabriella de Souza Rodrigues. – Araçatuba, 2025 51 f. : il. ; tab. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba Orientador: Prof. Dr. Francisley Ávila Souza 1. Osteonecrose 2. Pirofosfato de cálcio 3. Materiais biocompatíveis 4. Alvéolo dental I. T. Black D7 CDD 617.64
-------	---

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Gostaria de dedicar este trabalho, primeiramente a Deus, por toda sua bondade e graça, por ter me sustentado, fortalecido e me conduzido até aqui. E também aos meus pais, José Carlos e Sonia, por sempre estarem comigo, nos momentos bons, e também nos momentos não tão bons assim, por todo apoio, cuidado e incentivo, este é um fruto do trabalho de vocês comigo, sou e serei eternamente grata por tudo sempre, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por toda sua bondade, e por ter me ajudado até aqui, sem a presença dele nada disso seria possível.

Agradeço também aos meus pais **Jose Carlos** e **Sonia**, por todo apoio e amor, durante todos esses anos, serei eternamente grata por tudo que fizeram e fazem por mim. Sou extremamente privilegiada por ter vocês como pais, amo vocês.

A minha irmã **Sabrina**, por ser sempre meu suporte, incentivadora, por me ajudar em tudo que eu sempre precisei, por ter nos dado grandes presentes, que são **Maria Eduarda** e **Valentina**, que nos alegram, e acrescentam tanto nas nossas vidas, um privilegio meu por poder ver vocês crescendo e se desenvolvendo, e também ao meu cunhado **Agrício**, por todo apoio sempre.

A minha avó **Luzia**, por sempre me instruir e por ser essa mulher forte, um verdadeiro suporte para a família. Também aos meus avós **Arayrdes** e **José Rodrigues**, por todo amor e carinho que sempre dedicaram a mim e a toda nossa família, obrigada por tudo.

Agradeço ao meu orientador Professor **Francisley Ávila Souza**, por ter me dado esta oportunidade de estar em seu grupo de pesquisa, desde a iniciação científica, essa porta que o senhor me abriu, me proporcionou várias oportunidades e realizações que eu jamais poderia imaginar. Agradeço ao senhor por sempre acreditar em mim e me incentivar, por ter tido uma enorme paciência comigo nos momentos difíceis que eu enfrentei em várias áreas na vida, nesses dois anos de mestrado, sendo sempre muito gentil, cordial e descontraído, muito obrigada pro tudo professor. Sou e serei eternamente grata ao senhor, por tudo que fez e faz por mim. Estendo também os agradecimentos a sua esposa **Heloisa**, pela sua educação e gentileza, e aos seus filhos, **Eduardo** e **Marina**, por sempre nos receberem tão bem em sua casa.

Agradeço, em especial ao Professor **Idelmo Rangel Garcia Junior**, por todos os ensinamentos, e por ter me concedido a oportunidade de participar do serviço hospitalar, que sempre foi um desejo que eu tive, o senhor me possibilitou que isso acontecesse, fiquei muito feliz e impressionada em ver o tamanho do profissionalismo com que o serviço é conduzido, e como isso é essencial para a vida das pessoas, sempre uma alegria ir aos ambulatórios, e ver o depois dos pacientes, melhorando a

cada dia, e podendo retomar suas atividades normalmente, isso foi muito importante pra mim e me enriqueceu demais como profissional.

Agradeço também ao Professor **Albanir Borrasca Gabriel**, por ter aceito nosso prontamente nosso convite em ser minha banca, fiquei muito feliz com o seu aceite professor.

Agradeço também aos demais professores do Departamento, Professor **Leonardo Perez Faverani**, por toda sua atenção, carinho e bondade comigo e com os alunos. Também agradeço as Professoras **Daniela Ponzoni**, **Ana Paula Farnezi Bassi**, **Alessandra Marcondes Aranega**, e ao Professor **Oswaldo Magro Filho**, obrigada por todos os ensinamentos.

Também agradeço ao Professor **Fellippo Ramos Verri**, por ter me aceitado e me aberto as portas na Implantodontia, é imensurável o tanto que eu aprendi e aprendo com o senhor, profissionalmente e clinicamente, seus conhecimentos são admiráveis.

Agradeço também a Professora **Roberta Okamoto**, por toda sua gentileza e bondade, por sempre nos recepcionar tão bem em seu laboratório. E também ao Professor **Juliano Milanezi de Almeida**, por toda ajuda na nossa parte cirúrgica e nas análises.

Essa Dissertação é o fruto de um trabalho em conjunto de muitas pessoas, que colaboraram cada um de uma forma, para que isso se tornasse possível, e sou imensamente grata ao meu grupo de pesquisa, que participaram comigo na produção deste trabalho.

Agradeço ao meu amigo **Mateus Torres e Silva**, por todo apoio, ajuda e parceria, em tantos momentos da minha vida e da pesquisa, pela sua bondade e inteligência, tenho certeza que seu caminho será brilhante por onde for. Tem pessoas que Deus coloca no nosso caminho, que eu vejo como a prova do carinho e do cuidado de Deus conosco, você é uma dessas pessoas Matt, obrigada por tudo.

Agradeço a **Maísa Pereira da Silva**, por toda ajuda e cuidadosa comigo durante as fases dessa pesquisa, por ser uma pessoa inteligente e competente, em tantos momentos sua ajuda foi essencial, gratidão por tudo.

Agradeço a **Maria Eduarda de Freitas Santana Oliveira**, por toda ajuda e apoio no desenvolvimento dessa pesquisa sempre com muita eficiência, por me ajudar com os

animais, pelos nossos momentos de café e descontração, você sempre com novidades e um bom enredo, obrigada por tudo.

Agradeço a **Harrisson Mamani Valeriano**, por sua amizade e apoio em tantos momentos, contribuindo comigo, para o desenvolvimento da pesquisa e do meu lado clínico, sua parceria foi muito importante.

Agradeço imensamente **Henrique Hadad**, por toda ajuda e carinho, que sempre teve comigo desde a iniciação científica, por todos os ensinamentos, por sua competência e altíssima qualidade profissional, sou muito grata a você por ter tido bolsas durante a IC, sempre terei em minha mente boas recordações nossas cuidando dos animais com a Laís, durante a pandemia, gratidão por tudo.

Não teria como não agradecer também **Laís Kawamata de Jesus** por toda sua amizade, por esses anos, pela sua ajuda durante a pesquisa, pelos nossos ótimos momentos viajando juntas, pelos momentos de descontração e risadas, obrigados por tudo.

Agradeço também ao **Paulo Matheus Honda Tavares** e **Ana Flavia Piquera Santos** por toda ajuda e apoio, e ao Nelson Padilha da Silva por todas as palavras de apoio e incentivo.

Agradeço imensamente as nossas alunas de iniciação científica **Brittinie Tifany Johnson, Lilian Maria Matos Paulino, Julia Pietro Bao, Beatriz Costa Lau, Beatriz Ramos de Medeiros, Maria Fernanda Bessi Falcone, Ana Laura Gavaldão Santana Moreira e Anna Luisa Ferreira Perri**, pela ajuda e por cuidarem dos nossos animais com tanto carinho.

Agradeço as minhas amigas de pós-graduação **Izabela Fornari Delamura e Melissa Koto Murai e Martina Andreia Lage Nunes**, por serem minha rede de apoio e incentivo durante a pós graduação, apesar de terem momentos difíceis, em que desanimávamos, uma ia apoiando a outra, e assim conseguimos finalizar essa etapa, obrigada por tudo.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa do Diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba **Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem** e do vice-Diretor **Prof. Luciano Tavares Ângelo Cintra**.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pelo carinho e atenção sempre oferecidos.

Aos colegas da Pós-Graduação de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia, em especial a **Luana Ferreira Oliveira, Izabella Sol, Caroline Liberato Marchioli, Tatiany Aparecida de Castro, Arthur Henrique Alécio Viotto, Juliana de Aguiar Silveira Meira, Ynara Maria Gomes, Matheus Ragghianti, Camila Cerantula Moura.**

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia **Paulo Roberto Gratão, Marco Aurélio de Oliveira Ianner e Renato Gomes de Oliveira**, por todos ensinamentos, ajuda e conversas sobre todos os assuntos extra faculdade. Aos **animais**, “*in memorian*”, que sacrificaram suas vidas em prol da ciência.

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, pelo apoio financeiro concedido durante meus dois anos de mestrado (Processo 130496/2023-5).

*“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas
e silenciosas metamorfoses.”*

Rubem Alves

RESUMO

Rodrigues LGS. Biomaterial pirofosfato de cálcio incorporado em scaffold de alginato como terapia preventiva para osteonecrose [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2025.

Têm sido crescentes os casos de Osteonecrose dos ossos maxilares relatados pela literatura. O objetivo deste projeto foi avaliar o efeito do Pirofosfato de Cálcio incorporados em scaffolds de alginato de sódio, como terapia preventiva sobre a OMIM, durante o processo de reparo alveolar em ratos. Foram utilizados 32 ratos wistar que foram tratados com 04 aplicações de 0,035 mg/kg de ácido zoledrônico (ZOE) por via caudal com intervalos de 15 dias entre as aplicações e posteriormente tiveram seus molares inferiores esquerdos removidos. Após a exodontia, os animais seguiram com o tratamento com ZOE no mesmo protocolo até a eutanásia. Os animais foram divididos em três grupos (n=8) de acordo com o tratamento do alvéolo dental: GZOL (Zoledronato), Grupo Pirofosfato de Cálcio incorporado em Scaffold de Alginato (GPS), Grupo Scaffold de Alginato (GSA). Vinte e oito dias após o procedimento cirúrgico ocorreu à eutanásia dos animais e os alvéolos foram submetidos às análises 1) Clínica: todas as peças foram fotografadas e classificadas por um score; 2) Análise Radiográfica: foi feita a avaliação através de escala de cinza. 3) Análise Histológica Qualitativa em tecidos desmineralizados e quantitativa por meio da mensuração de: área de tecido ósseo íntegro, tecidos moles (tecido epitelial, conjuntivo, vasos sanguíneos e lacunas ósseas) 4) análise por coloração de Picro sirius Red (PSR), para mensuração de fibras colágenas maduras e imaturas. A análise clínica constatou que houve dificuldade no reparo tecidual, nos grupos tratados com ZOL; Já a radiográfica demonstrou a manutenção do volume alveolar, na região onde o dente foi extraído; e a análise histológica qualitativa evidenciou a baixa presença de infiltrado inflamatório, além de ter ocorrido a formação de uma região de tecido conjuntivo, nos grupos de tratamento, e não houve a indução do reparo ósseo, a histometria demonstrou maior presença de tecido ósseo neoformado em GPS, em PSR houve a maior presença de fibras colágenas verdes (imaturas) em todos os grupos. Conclui-se que ocorreu a indução da OMIM, e que não houve a formação de tecido osso na região, dos grupos de terapia preventiva.

Palavras-chave: osteonecrose; pirofosfato de cálcio; biomaterial; alvéolo dental.

ABSTRACT

Rodrigues LGS. Calcium pyrophosphate biomaterial incorporated into alginate scaffold as preventive therapy for osteonecrosis [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2025.

There has been an increasing number of cases of osteonecrosis of the maxillary bones reported in the literature. The objective of this project was to evaluate the effect of calcium pyrophosphate incorporated into sodium alginate scaffolds as a preventive therapy on IMO during the alveolar repair process in rats. A total of 32 wistar rats were treated with 04 applications of 0.035 mg/kg of zoledronic acid (ZOE) caudally with 15-day intervals between applications and later had their left lower molars removed. After tooth extraction, the animals continued with ZOE treatment in the same protocol until euthanasia. The animals were divided into three groups (n=8) according to the treatment of the dental alveolus: GZOL (Zoledronate), Calcium Pyrophosphate Group incorporated in Alginate Scaffold (GPS), Alginate Scaffold Group (GSA). Twenty-eight days after the surgical procedure, the animals were euthanized and the alveoli were submitted to analysis 1) Clinic: all pieces were photographed and classified by a score; 2) Radiographic Analysis: evaluation was carried out using gray scale. 3) Qualitative Histological Analysis in demineralized and quantitative tissues through measurement of: area of intact bone tissue, soft tissues (epithelial tissue, connective tissue, blood vessels and bone gaps) 4) analysis by Picro sirius Red (PSR) staining, to measure mature and immature collagen fibers. The clinical analysis found that there was difficulty in tissue repair in the groups treated with ZOL; The radiograph demonstrated the maintenance of alveolar volume in the region where the tooth was extracted; and qualitative histological analysis showed the low presence of inflammatory infiltrate, in addition to the formation of a connective tissue region in the treatment groups, and there was no induction of bone repair, histometry demonstrated a greater presence of newly formed bone tissue in GPS, in PSR there was a greater presence of green (immature) collagen fibers in all groups. It is concluded that the induction of OMIM occurred, and that there was no formation of bone tissue in the region, in the preventive therapy groups.

Keywords: osteonecrosis; calcium pyrophosphate; biomaterial, tooth socket.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de distribuição dos animais em grupos, de acordo com a terapia preventiva induzida e análise dos grupos por cortes desmineralizados.	21
Figura 2 - Sequência de fotos referentes ao procedimento de extração do primeiro molar inferior do lado esquerdo	24
Figura 4 - Primeiro molar inferior do lado esquerdo após extração	25
Figura 5 - Fluxograma do tempo de trabalho do grupo de análise descalcificado.	25
Figura 6 - Fotos Clínicas representativas dos grupos experimentais	29
Figura 7 - Gráficos representativos da classificação dos scores obtidos em cada grupo experimental	29
Figura 8 - Imagens da Análise Radiográfica	30
Figura 9 - Análise Radiográfica grupo controle, ZOL, GPS e GSA	31
Figura 10 - Fotomicrografias representativas do grupo ZOL	32
Figura 11 - Fotomicrografias representativas do grupo GPS	33
Figura 12 - Fotomicrografias representativas do grupo GSA	33
Figura 13 - Fotomicrografias representativas do grupo GSA	34
Figura 14 - Fotomicrografias representativas do grupo ZOL	38
Figura 15 - Fotomicrografias representativas do grupo GPS	40
Figura 16 – Gráfico da área de neoformação óssea (NBA)	41
Figura 17 - Gráfico da área de tecido conjuntivo	32
Figura 18 - Gráfico da dinâmica óssea	33
Figura 19 - Gráfico da dinâmica óssea	33
Figura 20 - Fotomicrografias de coloração picrosirius red	34
Figura 21 - Gráfico representativo da % de fibras colágenas vermelhas	38
Figura 22 - Gráfico representativo da % de fibras colágenas verdes	40
Figura 23 - Gráfico representativo da dinâmica das fibras colagenas	41

LISTA DE TABELAS

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

34

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

35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 METODOLOGIA	19
3.1 Animais	19
3.2 Aplicação do Ácido Zoledrônico	20
3.3 Aplicação de Soro Fisiológico	20
3.4 Extração Dentária	20
3.5 Grupos Experimentais	21
3.6 Eutanásia	23
3.7 Análise Clínica	23
3.8 Análise Radiográfica	24
3.9 Análise Histológica Qualitativa e Quantitativa	24
3.10 Análise por Birrefringência	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Análise Clínica	27
4.2 Análise Radiográfica	28
4.3 Estudo Experimental In Vivo (Tecidos Desmineralizados)	30
4.4 Análise Histológica Qualitativa	33
4.5 Análise Histométrica	41
4.6 Análise por coloração Picrosirius Red	46
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	500
ANEXOS	56

1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMIM), tem sido cada vez mais prevalente desde 2003.^{1,2} A OMIM pode ser definida como tecido ósseo exposto na cavidade oral, por um período maior que oito semanas em pacientes tratados com antirreabsortivos, associados ou não a agentes antigigênicos e imunomoduladores, sem histórico de radiação prévia.³

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

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

Pelo fato de não haver um protocolo estabelecido e bem definido para tratamento para a OMIM, várias terapias, como antibioticoterapia ou medidas cirúrgicas conservadoras tem sido propostas com a finalidade de tratar e controlar evolução dessa condição. Os tratamentos propostos para OMIM podem ser de longa duração e por vezes deixar sequelas no paciente ou ainda apresentar insucesso.¹³ A taxa de sucesso em tratamentos cirúrgicos é maior quando comparado com os tratamentos realizados somente com antibioticoterapia,¹⁴ contudo, o tratamento pode ser desafiador e afetar adversamente a qualidade de vida do paciente.¹⁵ As terapias

alternativas para tratamento e prevenção da OMIM tem sido alvo de delineamento de pesquisas, e os resultados destes estudos vem demonstrando bons resultados.

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

Dentre os biomateriais, merece destaque as biocerâmicas sintéticas, que são livres de proteínas ou outros componentes orgânicos residuais, possuem mínima reação imunológica e baixa toxicidade sistêmica.²⁶ Nesse grupo, encontram-se os derivados de fosfato de cálcio, muito utilizados em aplicações médicas por sua similaridade química com a composição inorgânica dos tecidos duros e serem bioativos.²⁷ Dentre esses derivados têm-se os pirofosfatos de cálcio (CPP) obtidos pela condensação das estruturas hidrogenofosfatos em ambientes químicos ricos em íons PO_4^{3-} .²⁸ É considerado o menor polifosfato linear e apresenta três formas polimórficas: α , β e γ CPP, obtidas sob alta temperatura de sinterização. A fase cristalina β -CPP demonstra resposta biológica favorável para formação de novos tecidos ósseos, bem como a propriedade de biodegradação intermediária a biocerâmicas mais tradicionais (HA e β TCP). Devido a isso e por se tratar de um material pouco estudado na literatura, torna-se um composto alternativo em potencial como substituto ósseo.²⁹

Em regeneração tecidual o pirofosfato de cálcio é um biomaterial com alta potencialidade de emprego e que nos dias atuais apresenta uma subutilização na área de odontológica.³⁰ Pode ser considerado uma sobra proveniente do processo de síntetização do β -TCP, e como este apresenta também alta biocompatibilidade e estimula a proliferação de células ósseas.³¹ Contudo, ainda não existem estudos publicados que correlacionem o uso deste biomaterial na prevenção da OMIM. Neste sentido, a engenharia de tecidos tem desenvolvido métodos que propiciam um

melhoramento na geometria, porosidade e composição desses biomateriais o que tem os tornado cada vez mais eficientes e promissores, fato comprovado pelo desenvolvimento deste biomaterial que foi sintetizado e isolado em trabalho prévio no Instituto de Química de Araraquara.³²

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

Também foi associado ao biomaterial Pirofosfato de Cálcio, os Scaffolds de Alginato manufacturados por processo de Liofilização³⁵⁻³⁷ já que estes também tem demonstrado resultados favoráveis em relação a proliferação celular, e na regeneração óssea, devido a sua macroarquitetura mais porosa, que permite a distribuição mais lenta dos produtos que são a eles associados.^{38,39}

No presente estudo também foi utilizado scaffolds de alginato feitos por liofilização, isso se deve estudos previamente publicados na literatura que demonstram as propriedades dos scaffolds de fornecer um substrato adequado para fixação e proliferação celular, além de função diferenciada e migração celular, fatores esses que são de grande valia para o tecido ósseo,⁴⁰⁻⁴² já que também atuam na regeneração óssea e na cicatrização de feridas, isso além de propiciar a entrega de medicamentos com alta carga e eficiência em locais específicos,⁴³⁻⁴⁵ que no caso deste estudo será utilizado em alvéolos pós exodonticos.

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

6 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS

1. Wang Q, Liu J, Qi S, Liao X, Liu D, Pan J. Clinical analysis of medication related osteonecrosis of the jaws: a growing severe complication in China. *J Dent Sci.* 2018;13(3):190-7. doi: 10.1016/j.jds.2017.12.003.
2. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(9):1115-7. doi: 10.1016/s0278-2391(03)00720-1.
3. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw: 2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72(10):1938-56. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.031.
4. Hagiwara M, Delea TE, Cong Z, Chung K. Utilization of intravenous bisphosphonates in patients with bone metastases secondary to breast, lung, or prostate cancer. *Support Care Cancer.* 2014;22(1):103-13. doi: 10.1007/s00520-013-1951-z.
5. Zhang J, Wang R, Zhao YL, Sun XH, Zhao HX, Tan L, et al. Efficacy of intravenous zoledronic acid in the prevention and treatment of osteoporosis: a meta-analysis. *Asian Pac J Trop Med.* 2012;5(9):743-8. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60118-7.
6. Petrovic M, Jelovac DB, Antic S, Antunovic M, Lukic N, Sabani M, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaws: two center retrospective cohort studies. *Biomed Res Int.* 2019;2019:8345309. doi: 10.1155/2019/8345309.
7. Bamias A, Kastiris E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol.* 2005;23(34):8580-7. doi: 10.1200/JCO.2005.02.8670.
8. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011;49(1):2-19. doi: 10.1016/j.bone.2011.04.022.
9. Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008;19(6):733-59. doi: 10.1007/s00198-007-0540-8.

10. Frith JC, Mönkkönen J, Auriola S, Mönkkönen H, Rogers MJ. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum.* 2001;44(9):2201-10. doi: 10.1002/1529-0131(200109)44:9<2201::aid-art374>3.0.co;2-e.
11. Reszka AA, Rodan GA. Nitrogen-containing bisphosphonate mechanism of action. *Mini Rev Med Chem.* 2004;4(7):711-9.
12. Jain V, Seith A, Manchanda S, Pillai R, Sharma DN, Mathur VP. Effect of intravenous administration of zoledronic acid on jaw bone density in cases having skeletal metastasis: a prospective clinical study. *J Indian Prosthodont Soc.* 2019;19(3):203-9. doi: 10.4103/jips.jips_368_18.
13. Statkiewicz C, Toro LF, Mello-Neto JM, Sá DP, Casatti CA, Issa JPM, et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2018;184:7-17. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.05.004.
14. Rupel K, Ottaviani G, Gobbo M, Contardo L, Tirelli G, Vescovi P, et al. A systematic review of therapeutical approaches in bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Oncol.* 2014;50(11):1049-57. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.08.016.
15. Johnson King O, Halai T, Eyeson J. Case report of atypical osteonecrosis of the jaws: a clinical dilemma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2019;57(4):371-3. doi: 10.1016/j.bjoms.2019.03.013.
16. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone.* 2019;120:101-13. doi: 10.1016/j.bone.2018.10.014.
17. Toro LF, Mello-Neto JM, Santos FFVD, 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. *Sci Rep.* 2019;9(1):22. doi: 10.1038/s41598-018-37063-y.

18. Hadad H, Jesus LK, Santos AFP, Matheus HR, Rodrigues LGS, Poli PP, et al. Beta tricalcium phosphate, either alone or in combination with antimicrobial photodynamic therapy or doxycycline, prevents medication-related osteonecrosis of the jaw. *Sci Rep.* 2022;12(1):16510. doi: 10.1038/s41598-022-20128-4.
19. Silva JR, Balbas MCM, Corrêa CÂ, Zanela M, Okamoto R, Pereira RDS, et al. The role of bone grafts in preventing medication-related osteonecrosis of the jaw: histomorphometric, immunohistochemical, and clinical evaluation in animal model. *Craniomaxillofac Trauma Reconstr.* 2022;15(4):304-11. doi: 10.1177/19433875211048367.
20. Schmidt LE, Hadad H, Vasconcelos IR, Colombo LT, Silva RC, Santos AFP, et al. Critical defect healing assessment in rat calvaria filled with injectable calcium phosphate cement. *J Funct Biomater.* 2019;10(2):21. doi: 10.3390/jfb10020021.
21. Soares MQS, Van Dessel J, Jacobs R, Santos PSS, Cestari TM, Garlet GP, et al. Zoledronic acid induces site-specific structural changes and decreases vascular area in the alveolar bone. *J Oral Maxillofac Surg.* 2018;76(9):1893-901. doi: 10.1016/j.joms.2018.03.007.
22. Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Aracatuba.* 1973;2(2):153-69.
23. Kim JW, Alfafara AMD, Kim HY, Kim SY, Kim SJ. Effects of pH alteration on the pathogenesis of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Bone.* 2019;122:45-51. doi: 10.1016/j.bone.2019.02.007.
24. Tanaka Y, Aung KT, Ono M, Mikai A, Dang AT, Hara ES, et al. Suppression of bone necrosis around tooth extraction socket in a MRONJ-like mouse model by E-rhBMP-2 containing artificial bone graft administration. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):12823. doi: 10.3390/ijms222312823.
25. Funayama N, Yagyuu T, Imada M, Ueyama Y, Nakagawa Y, Kirita T. Impact of beta-tricalcium phosphate on preventing tooth extraction-triggered bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. *Sci Rep.* 2023;13(1):16032. Published 2023 Sep 25. doi:10.1038/s41598-023-43315-3.
26. Debone R, Pelizaro TAG, Rodriguez-Chanfrau JE, Almirall A, Serna L, Veranes-Pantoja Y. Calcium phosphates nanoparticles : the effect of freeze-drying on particle

size reduction. *Mater Chem Phys.* 2020;239. doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.122004.

27. Lee KS, Han HS, Kim YC, Han JHL, Seung RH, Lee HS, et al. Evaluation of porous β -calcium pyrophosphate as bioresorbable bone graft substitute material, *Mater Res Innov.* 2015;19(2):86-90. doi: 10.1179/1433075X14Y.0000000215.

28. Windarti T, Haris A, Astuti Y, Darmawan A. Synthesis of β -calcium pyrophosphate by sol-gel method. *Mater Sci Eng.* 2017;172:012058. doi: 10.1088/1757-899X/172/1/012058.

29. Rosini S, Rosini S, Bertoldi I, Frediani B. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(17):3309-17.

30. Safronova T, Kiselev A, Selezneva I, Shatalova T, Lukina Y, Filippov Y, et al. Bioceramics based on β -calcium pyrophosphate. *Materials.* 2022;15(9):3105. doi: 10.3390/ma15093105.

31. Pinto GC. Biofabricação 3D: obtenção de scaffolds de blendas biodegradáveis contendo fosfatos de cálcio para medicina regenerativa de tecidos [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2023.

32. Grover LM, Wright AJ, Gbureck U, Bolarinwa A, Song J, Liu Y, et al. The effect of amorphous pyrophosphate on calcium phosphate cement resorption and bone generation. *Biomaterials.* 2013;34(28):6631-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.001.

33. Svensson S, Palmer M, Svensson J, Johansson A, Engqvist H, Omar O, et al. Monocytes and pyrophosphate promote mesenchymal stem cell viability and early osteogenic differentiation. *J Mater Sci Mater Med.* 2022;33(1):11. doi: 10.1007/s10856-021-06639-y.

34. Curra C, Cardoso CL, Ferreira Júnior O, Curi MM, Matsumoto MA, Cavenago BC, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw. Introduction of a new modified experimental model. *Acta Cir Bras.* 2016;31(5):308-13. doi: 10.1590/S0102-8650201600500000003.

35. Bi Y, Gao Y, Ehirchiou D, et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am J Pathol.* 2010;177(1):280-290. doi: 10.2353/ajpath.2010.090592.
36. Sarkarat F, Kalantar Motamedi MH, Jahanbani J, Sepehri D, Kahali R, et al. Platelet-rich plasma in treatment of zoledronic acid-induced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Trauma Mon.* 2014;19(2):e17196. doi: 10.5812/traumamon.17196.
37. Yang H, Pan H, Yu F, Chen K, Shang G, Xu Y. A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5):5161-7.
38. Basso FG, Soares DG, Pansani TN, Turrioni AP, Scheffel DL, Hebling J, et al. Response of a co-culture model of epithelial cells and gingival fibroblasts to zoledronic acid. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):e122. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0122.
39. Hemmi T, Yusa K, Ishikawa S, Takano H, Fukuda M, Iino M. Synergistic effect of zoledronate and compressive force suppresses proliferation and differentiation of human gingival fibroblasts. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2024;62(1):63-70. doi: 10.1016/j.bjoms.2023.10.018.
40. Grimm S, Mundethu A, Symmank J, Hennig C, Walter C, Reichardt E, et al. Compressive force strengthened the pro-inflammatory effect of zoledronic acid on $\text{IL-1}\beta$ stimulated human periodontal fibroblasts. *Clin Oral Investig.* 2021;25(6):3453-61. doi: 10.1007/s00784-020-03667-w.
41. García-García P, Reyes R, Pérez-Herrero E, Arnau MR, Évora C, Delgado A. Alginate-hydrogel versus alginate-solid system. Efficacy in bone regeneration in osteoporosis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020;115:111009. doi: 10.1016/j.msec.2020.111009.
42. Lee GS, Park JH, Shin US, Kim HW. Direct deposited porous scaffolds of calcium phosphate cement with alginate for drug delivery and bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2011;7:3178–3186. doi: 10.1016/j.actbio.2011.04.008.
43. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2012;29(1):1-63. doi: 10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v29.i1.10.

44. Preethi Soundarya S, Haritha Menon A, Viji Chandran S, Selvamurugan N. Bone tissue engineering: scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. *Int J Biol Macromol*. 2018;119:1228-39.
 45. Zielińska A, Karczewski J, Eder P, Kolanowski T, Szalata M, Wielgus K, et al. Scaffolds for drug delivery and tissue engineering: the role of genetics. *J Control Release*. 2023;359:207-23.
 46. Lee GS, Park JH, Shin US, Kim HW. Direct deposited porous scaffolds of calcium phosphate cement with alginate for drug delivery and bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2011;7(8):3178-86. doi: 10.1016/j.actbio.2011.04.008.
- Svensson S, Palmer M, Svensson J, Johansson A, Engqvist H, Omar O, Thomsen P. Monocytes and pyrophosphate promote mesenchymal stem cell viability and early osteogenic differentiation. *J Mater Sci Mater Med*. 2022 15;33(1):11

ANEXOS

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEUA)



CERTIFICADO

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

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 27 de Junho de 2025.

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

CERTIFICATE

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

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 27, 2025.

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

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

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