

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/02/2028

Gabriela Carrara Simionato

**Efeitos do uso de uma membrana de quitosana enriquecida
com chá verde (*Camellia sinensis*) como terapia preventiva
à osteonecrose dos maxilares**

Araçatuba - SP
2026

Gabriela Carrara Simionato

**Efeitos do uso de uma membrana de quitosana
enriquecida com chá verde (*Camellia sinensis*) como
terapia adjuvante preventiva à osteonecrose dos maxilares**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do Grau de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Periodontia

Orientador: Profa. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme Fiorin

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S589e Simionato, Gabriela Carrara.
Efeitos do uso de uma membrana de quitosana enriquecida com chá verde (*Camellia sinensis*) como terapia adjuvante preventiva à osteonecrose dos maxilares / Gabriela Carrara Simionato. - Araçatuba, 2026
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Juliano Milanezi de Almeida
Coorientador: Prof. Luiz Guilherme Fiorin

1. Osteonecrose da arcada osseodentária associada a difosfonatos 2. Ácido zoledrônico 3. Difosfonatos 4. Chá I.T.

Black D6
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico este trabalho à Deus e aos meus pais, Marcos e Paula, por serem meu alicerce e porto-seguro.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, na pessoa de seu diretor Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem e vice-diretor, Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra pela oportunidade de aprendizado, crescimento pessoal e profissional.

À atual *Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO)*, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, *Prof^a. Titular Roberta Okamoto*, pela oportunidade de desenvolver o meu trabalho no PPGO.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)* - Código de Financiamento 001, pelo auxílio financeiro concedido durante o primeiro ano de desenvolvimento deste trabalho por meio do processo número 88887.958475/2024-00.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* pelo apoio financeiro disponibilizado durante meu segundo e último ano de mestrado, sob parecer de número 133362/2025-6.

Agradeço ao *Laboratório Multiusuário da FOA-UNESP* e à *FINEP* (FINEP/CT-INFRA - Convênio FINEP: 01.12.0530.00 – PROINFRA 01/2011) pela contribuição dos resultados a partir do uso do equipamento de Microtomografia Computadorizada SkyScan 1272.

Aos professores, integrantes e funcionários da *Seção de Pós-Graduação*, dos *Departamentos de Diagnóstico e Cirurgia*, em especial, Prof. Dr. Francisley Ávila Sousa e Profa. Dra. Daniela Brandini; e de *Ciências Básica*, em especial Prof. Edilson Ervolino e Profa. Dra. Roberta Okamoto, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, por todo auxílio, disponibilidade e atenção durante esses anos.

Às equipes da *Central de Distribuição de Materiais*, em especial Gabriela Rezende Cano e Jane Fátima, por sempre serem tão acolhedoras e especiais; da *Central de Esterelização*, especialmente Luciana Saad, Jucilene Souza e Rodrigo, por todas as trocas e atenção durante esses anos; e da *Biblioteca*, em nome da Diretora Técnica, Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti, por todo auxílio e apoio. Deixo aqui o meu muito obrigada a todos.

Aos *integrantes do NEPPI*, em especial aos meus parceiros de Pós-Graduação, *Otávio Augusto Pacheco Vitória*, meu braço direito em todos os momentos desde minha Iniciação Científica, sou grata em ter alguém como você em minha vida; *Ester Oliveira Santos*, que chegou para agregar ainda mais em minha vida acadêmica e pessoal, sou muito grata pelo nosso encontro; *Ruan Henrique Delmonica Barra e Elisa Mara de Abreu Furquim*, que sempre estiveram ao meu lado, muito obrigada por tudo. A todas as alunas de Iniciação Científica, em especial, *Giovana Firmo, Gabrielli Batturi, Gabrielle Sousa, Beatriz Piccolo, Layra Garcia, Isabela Roveres*, obrigada por serem tão especiais e dedicadas, o grupo agradece por ter vocês inseridas. Foi um presente auxiliá-las nesses anos.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida*, por confiar a mim o desenvolvimento deste trabalho de grande relevância para ciência. Você é fonte de inspiração em minha vida, não só acadêmica, mas pessoalmente. Tenho uma verdadeira admiração e carinho pelo senhor. Muito obrigada por sempre estar disposto a compartilhar seus conhecimentos e não poupar esforços para o crescimento de seu grupo. Agradeço todos os dias por ter um orientador como o senhor. Conte comigo sempre.

Ao meu coorientador, *Prof. Dr. Luiz Guilherme Fiorin*, pela dedicação, presença, paciência e disponibilidade. Grande parte desta conquista é sua também. Você contribuiu de forma única, essencial e significativa para minha formação científica e pessoal. Obrigada por ter sido e ser um grande e leal parceiro, aliado nessa jornada. Estaremos sempre juntos, conte comigo! Serei eternamente grata por todas as oportunidades a mim confiadas.

Ao *Prof. Dr. Edilson Ervolino*, expresso minha profunda gratidão e honra em tê-lo como parte da banca avaliadora neste momento tão importante da minha trajetória acadêmica, principalmente por ser referência no que diz respeito ao tema desta dissertação. Tenho grande admiração por sua excelência profissional e pela pessoa tão querida que é. Obrigada por todos os ensinamentos desde o primeiro ano de graduação, levarei-os com muito apreço ao longo de minha vida.

Ao *Prof. Dr. Henrique Rinaldi Matheus*, uma das minhas principais inspirações dentro e fora da Periodontia. Agradeço imensamente pelo aceite em participar desta etapa acadêmica tão importante de minha trajetória. Além disso, agradeço por todo

auxílio e por todas as trocas valiosas que tivemos durante nossos anos de convivência, levei e continuarei levando-as para vida. Tenho muito orgulho e admiração por tudo que representa na comunidade científica nacional e internacional. Você é um exemplo a ser seguido.

Aos meus pais, *Paula e Marcos*, faltam-me palavras quando penso em vocês, pois são a razão de tudo. Meu porto-seguro, melhores amigos, mentores e inspirações da vida. Tudo sempre foi e sempre será por vocês. Passamos por muitos momentos difíceis de saúde que coincidiram com esses dois anos de Mestrado, e mais uma vez pude confirmar o quanto somos abençoados e fortes quando estamos juntos. Nós conseguimos, mãe e pai. E o mais importante: juntos e com saúde. Honro e agradeço sempre pela vida de vocês. Amo vocês mais do que palavras podem dizer.

Ao meu namorado *Rodrigo*, pelo amor, companheirismo e compreensão ímpar em cada etapa desse processo. Sua paciência, ajuda e incentivo constantes foram excepcionais para que eu mantivesse a força necessária e pudesse concluir esta dissertação. Você faz parte disso também! Amo muito tudo que estamos construindo e sei que seu caminho na área acadêmica será um sucesso, pois você já é um sucesso. Estendo este agradecimento à família Lopes Pereira, aos meus cunhados *Estêvão, Vinícius, Saulo e Tamires*, e aos meus sogros, *Mariana e Isaías*, por todo acolhimento, apoio e amor a mim cedidos. Vocês são minha família aqui em Araçatuba.

À minha segunda mãe, *Elenir*, por todo carinho, cuidado e dedicação. Você é um porto-seguro que me inspira e me fortalece em todos os momentos. Devo uma vida a você! Obrigada por cuidar tão bem de nossa família. Eu te amo com todo coração.

À minha grande e especial família Carrara Simionato, aos meus falecidos avôs *Rocambole e Alzira, Therezinha e Juracy*; tios *Carlos Eduardo e Cleide Carrara, João Paulo e Norma Carrara, Márcio e Zilda Simionato, Maura e Maude Simionato (em memória de minha tia Maude)*, tios postiços *Andreia e Mario Madi Genovez*; primas(os), *Julia, Beatriz, Luiza, Eduardo e Marina Carrara, Andreza, Juliana Simionato, Gustavo, Vitor, Augusto e Rogério Simionato* e agregados: agradeço o amor incondicional, os valores transmitidos, os conselhos que me deram força para

continuar, sempre vibrando cada conquista minha. Tenho muito orgulho de ser dessa família. Amo muito todos vocês.

Aos meus amigos, em especial, *Vitória Aguiar, Maria Eduarda Schneider, Leticia Braga, Giovanna Fortunato, Mileni Buzo, Guilherme Assumpção, Natália Izumi, César Fuziy, Vitor Cavalini, Pedro Faneco e Rodrigo Camargo*, amigos de faculdade que levarei para vida e sem o apoio de vocês nesses anos eu não teria conseguido; *Gabriela Rochitte, Joana Sanches, Maria Eduarda Menegueti, Laura Menegueti, Verena Ayub, Gabriel Boesso, Ana Carolina Pessoa, Jéssica Laís e Clara, Ana Clara Morato, Rodrigo Madi*, meu muito obrigada por serem meus amigos da vida, desde que me entendo por gente. A vida é muito mais leve e especial por estarem presentes. Amo vocês.

Aos *pacientes* que tive o privilégio de atender durante as clínicas da Pós-Graduação de Periodontia, pela confiança e aprendizado adquirido ao longo dos atendimentos.

Aos *ratos* utilizados, respeitosamente, neste trabalho, cedidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo número 356-2024 (Anexo A), cuja participação foi essencial para a concretização deste estudo.

A *todos* que contribuíram, de maneira direta e indiretamente, para que este capítulo da minha trajetória pudesse acontecer: muito obrigada.

***“A vida é uma oportunidade,
aproveite-a. A vida é beleza,
admire-a. A vida é um sonho,
realize-o.”***

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Simionato GC. Efeitos do uso de uma membrana de quitosana enriquecida com chá verde (*Camellia sinensis*) como terapia adjuvante preventiva à osteonecrose dos maxilares. 2026. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

A osteonecrose dos maxilares induzidas por medicamentos (MRONJ) é uma complicação associada ao uso de fármacos antirreabsortivos, apresentando maior prevalência em mulheres idosas sob tratamento oncológico. Compostos naturais têm sido estudados por seu potencial de prevenção. O objetivo do presente estudo foi avaliar a porcentagem de tecido ósseo não vital, reparo alveolar e fechamento da ferida, investigando os efeitos do uso de membranas de quitosana pura (MQt) e de quitosana enriquecida com chá verde (MQtCV) como terapia adjuvante preventiva à MRONJ, em alvéolos pós-exodontia de ratas fêmeas com fatores de risco associados. Foram utilizadas 90 ratas distribuídas em nove grupos experimentais, conforme a combinação dos seguintes fatores: cirurgia, ovariectomias bilaterais simulada (SHAM) ou convencional (OVX), tratamento medicamentoso via intraperitoneal de solução salina (SS, 0,9%) ou de zoledronato (ZOL, 100 µg/kg) e abordagem local do alvéolo (mantenimento de coágulo (CG), implementação de membrana de quitosana pura (MQt), ou de membrana de quitosana enriquecida com chá verde (MQtCV), constituindo os seguintes grupos: SHAM-SS-CG, SHAM-SS-MQt, SHAM-SS-MQtCV, OVX-SS-CG, OVX-SS-MQt, OVX-SS-MQtCV, OVX-ZOL-CG, OVX-ZOL-MQt e OVX-ZOL-MQtCV. Um dia que antecedeu ao início do tratamento medicamentoso com SS ou ZOL, todos os animais foram submetidos à periodontite induzida por ligadura (LIP) no primeiro molar inferior esquerdo, seguido no dia 21, pela exodontia (EX) e intervenção alveolar, e após 28 dias da EX, à eutanásia. As amostras foram encaminhadas para as análises clínica, histopatológica, histométrica, histoquímica pela coloração de Picrosirius red e de microtomografia computadorizada. Os dados foram analisados estatisticamente usando o Bioestat 5.3 ($p < 0,05$). Na presença do ZOL, os animais apresentaram atraso e comprometimento significativo do fechamento da ferida supra-alveolar, com características compatíveis com MRONJ, além um elevado volume ósseo (BV/TV) associado à maior porcentagem de tecido ósseo não vital (PONV), intenso infiltrado inflamatório que se estendeu por todo o tecido conjuntivo. Entretanto, nos grupos em que foram adicionadas as membranas, em

particular, o grupo OVX-ZOL-MQtCV, o reparo tecidual se deu de forma parcial, demonstrando efeito discreto na modulação dos danos provocados pelo ZOL. Concluiu-se que o uso das membranas de quitosana pura (MQt) e de quitosana enriquecida com chá verde (MQtCV) como terapia adjuvante preventiva promoveu efeitos discretos e pontuais sobre o reparo alveolar e o fechamento da ferida supra-alveolar em ratas ovariectomizadas, porém não sendo suficiente para impedir a formação de tecido ósseo não vital associada à MRONJ.

Palavras-chave: osteonecrose associada a bisfosfonatos; ácido zoledrônico; chá verde; bisfosfonatos.

ABSTRACT

SIMIONATO GC. Effects of the use of a chitosan membrane enriched with green tea (*Camellia sinensis*) as a preventive adjuvant therapy to osteonecrosis of the jaws. 2026. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

Medication-induced osteonecrosis of the jaws (MRONJ) is a complication associated with the use of antiresorptive drugs, with a higher prevalence in elderly women undergoing cancer treatment. Natural compounds have been studied for their potential for prevention. The aim of the present study was to evaluate the percentage of non-vital bone tissue, alveolar repair and wound closure, investigating the effects of the use of pure chitosan (MQt) and green tea-enriched chitosan (MQtCV) membranes as preventive adjuvant therapy to RONJM, in post-extraction alveoli of female rats with associated risk factors. A total of 90 rats were distributed into nine experimental groups, according to the combination of the following factors: surgery, simulated bilateral ovariectomies (SHAM) or conventional ovariectomies (OVX), intraperitoneal drug treatment of saline solution (SS, 0.9%) or zoledronate (ZOL, 100 µg/kg) and local approach to the alveolus (clot maintenance (CG), implementation of pure chitosan membrane (MQt), or green tea-enriched chitosan membrane (MQtCV), constituting the following groups: SHAM-SS-CG, SHAM-SS-MQt, SHAM-SS-MQtCV, OVX-SS-CG, OVX-SS-MQt, OVX-SS-MQtCV, OVX-ZOL-CG, OVX-ZOL-MQt and OVX-ZOL-MQtCV. One day prior to the start of drug treatment with SS or ZOL, all animals were submitted to ligation-induced periodontitis (IPL) in the left mandibular first molar, followed on day 21 by tooth extraction (EX) and alveolar intervention, and 28 days after EX, euthanasia. The samples were sent for clinical, histopathological, histometric, histochemical analysis by Picrosirius red staining and microcomputed tomography. The data were statistically analyzed using Bioestat 5.3 ($p < 0.05$). In the presence of ZOL, the animals showed significant delay and impairment in the closure of the supraalveolar wound, with characteristics compatible with RONJM, in addition to a high bone volume (BV/VT) associated with a higher percentage of non-vital bone tissue (PONV), an intense inflammatory infiltrate that extended throughout the connective tissue. However, in the groups in which the membranes were added the OVX-ZOL-MQtCV group, tissue repair was partial, demonstrating a slight effect on the modulation of the damage caused by the ZOL. It was concluded that the use of pure chitosan

(MQt) and green tea-enriched chitosan (MQtCV) membranes as preventive adjuvant therapy promoted discrete and punctual effects on alveolar repair and supraalveolar wound closure in ovariectomized rats but was not sufficient to prevent the formation of non-vital bone tissue associated with MRONJ.

Keywords: bisphosphonate-associated osteonecrosis; zoledronic acid; green tea; bisphosphonates.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Design experimental. (A) Linha do tempo ilustrando os 18 procedimentos experimentais realizados durante o estudo. (B) Ligadura instalada no primeiro molar inferior esquerdo para desenvolver periodontite induzida por ligadura; (C) Aspecto clínico de periodontite induzida por ligadura três semanas após instalação da ligadura; (D) Administração das medicações via intraperitoneal; (E) Aspecto clínico do alvéolo pós-exodontia; (F) Aspecto clínico do alvéolo com implementação da membrana de quitosana previamente ao fechamento da ferida.
- Figura 2 Aspecto final da confecção das membranas de (A) quitosana pura 20 (MQt) e de (B) quitosana enriquecida com chá verde (MQtCV).
- Figura 3 Fotomicrografia representativa das regiões de interesse (ROIs). A 25 ROI 1 está demarcada em rosa, correspondendo à região do alvéolo ocupado previamente pela raiz distal do primeiro molar inferior esquerdo; a ROI 2 está delimitada em laranja, correspondente à região do osso interseptal pré-existente, entre as raízes mesial e distal; e a ROI 3 demarcada em verde, correspondendo à região do fechamento da ferida supra-alveolar, no centro da lâmina própria da mucosa que recobre o local da exodontia.
- Figura 4 Avaliação clínica intraoral dos alvéolos pós-exodontia dos grupos 31 experimentais (1A) SHAM-SS-CG; (1B) SHAM-SS-MQt; (1C) SHAM-SS-MQtCV; (2A) OVX-SS-CG; (2B) OVX-SS-MQt; (2C) OVX-SS-MQtCV; (3A) OVX-ZOL-CG; (3B) OVX-ZOL-MQt; (3C) OVX-ZOL-MQtCV.
- Figura 5 Aspectos histopatológicos dos sítios de exodontia do primeiro molar 37 inferior esquerdo, aos 28 dias pós-operatório. (A.1, B.1, C.1) Fotomicrografias representativas dos alvéolos dos grupos (A.1) SHAM-SS-CG, (B.1) SHAM-SS-MQt e (C.1) SHAM-SS-MQtCV. (A.2, B.2, C.2) Fotomicrografias em maior aumento demonstrando características histológicas da região apical, referente à ROI 1. (A.3, B.3, C.3) Fotomicrografias em maior aumento referentes à ROI 2. (A.4, B.4, C.4) Fotomicrografias em maior aumento demonstrando

características histológicas do tecido conjuntivo da ferida supra-alveolar, referente à ROI 3. Teste estatístico: Kruskal-Wallis e pós-teste Student-Newman-Keuls. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 400x. Barras de escala: 100 µm.

Figura 6 Aspectos histopatológicos dos sítios de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo, aos 28 dias pós-operatório. (A.1, B.1, C.1) Fotomicrografias representativas dos alvéolos dos grupos (A.1) OVX-SS-CG, (B.1) OVX-SS-MQt e (C.1) OVX-SS-MQtCV. (A.2, B.2, C.2) Fotomicrografias em maior aumento demonstrando características histológicas da região apical, referente à ROI 1. (A.3, B.3, C.3) Fotomicrografias em maior aumento referentes à ROI 2. (A.4, B.4, C.4) Fotomicrografias em maior aumento demonstrando características histológicas do tecido conjuntivo da ferida supra-alveolar, referente à ROI 3. Teste estatístico: Kruskal-Wallis e pós-teste Student-Newman-Keuls. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 400x. Barras de escala: 100 µm. 38

Figura 7 Aspectos histopatológicos dos sítios de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo, aos 28 dias pós-operatório. (A.1, B.1, C.1) Fotomicrografias representativas dos alvéolos dos grupos (A.1) OVX-ZOL-CG, (B.1) OVX-ZOL-MQt e (C.1) OVX-ZOL-MQtCV. (A.2, B.2, C.2) Fotomicrografias em maior aumento demonstrando características histológicas da região apical, referente à ROI 1. (A.3, B.3, C.3) Fotomicrografias em maior aumento referentes à ROI 2. (A.4, B.4, C.4) Fotomicrografias em maior aumento demonstrando características histológicas do tecido conjuntivo da ferida supra-alveolar, referente à ROI 3. Símbolos: setas pretas indicando lacunas vazias ou ocupadas por restos necróticos de osteócitos. Teste estatístico: Kruskal-Wallis e pós-teste Student-Newman-Keuls. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 400x. Barras de escala: 100 µm. 39

Figura 8 Avaliação quantitativa da porcentagem total de osso neoformado (PTON) e da porcentagem de osso não vital (PONV). (A) Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da PTON de cada grupo experimental. Teste 41

estatístico: ANOVA e pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Símbolo: *, diferença estatística com SHAM-SS-CG ($p \leq 0,05$). (B) Médias e desvios padrões ($M \pm DP$) da PONV de cada grupo experimental. Teste estatístico: ANOVA e pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Símbolos: *, diferença estatística com SHAM-SS-CG; #, diferença estatística com SHAM-SS-MQt; \$, diferença estatística com OVX-ZOL-MQtCV ($p \leq 0,05$). (C-K) Fotomicrografias mostrando as características histológicas do alvéolo dos grupos (C) SHAM-SS-CG, (D) SHAM-SS-MQt, (E) SHAM-SS-MQtCV, (F) OVX-ZOL-CG, (G) OVX-ZOL-MQt, (H) OVX-ZOL-MQtCV, (I) OVX-SS-CG, (J) OVX-SS-MQt, (K) OVX-SS-MQtCV. Coloração: H&E. Barras de escala: (C-K) 70 μ m.

Figura 9 Nível de maturação das fibras colágenas nos diferentes grupos 43 experimentais aos 28 dias pós-operatório da ferida supra-alveolar, na ROI 3. (I) Porcentagem de fibras colágenas vermelhas e verdes, representando o grau de maturação das fibras colágenas no tecido conjuntivo da membrana mucosa que recobre o local da exodontia, expressa em média \pm desvio padrão. (II) A-I: Fotomicrografias representativas do nível de maturação das fibras de colágeno nos grupos experimentais: (A) SHAM-SS-CG; (B) SHAM-SS-MQt; (C) SHAM-SS-MQtCV; (D) OVX-SS-CG; (E) OVX-SS-MQt; (F) OVX-SS-MQtCV; (G) OVX-ZOL-CG; (H) OVX-ZOL-MQt; e (I) OVX-ZOL-MQtCV. Teste estatístico: ANOVA e pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa. Coloração: Picrosirius Red (PSR) em microscopia de luz polarizada. Ampliação original: 250x. Barras de escala: 100 μ m.

Figura 10 Análise qualitativa com imagens representativas dos 46 microtomografia computadorizada (MicroCT) do alvéolo pós-exodontia do primeiro molar inferior esquerdo, demonstrando cicatrizações completa, parcial, incompleta ou exposição óssea. (A) SHAM-SS-CG; (B) SHAM-SS-MQt; (C) SHAM-SS-MQtCV; (D) OVX-SS-CG; (E) OVX-SS-MQt; (F) OVX-SS-MQtCV; (G) OVX-ZOL-CG; (H) OVX-ZOL-MQt; (I) OVX-ZOL-MQtCV.

Figura 11 Análise quantitativa por microtomografia computadorizada (micro- 47
CT) na ROI 2. (a) Gráfico mostrando as porcentagens médias de volume ósseo em todos os grupos, obtidas por meio de análise de microtomografia computadorizada. (b) Gráfico do número médio de trabéculas. (c) Gráfico representando a separação trabecular/mm em todos os grupos. (d) Gráfico das porcentagens médias de porosidade total para todos os grupos. Teste estatístico: ANOVA um critério e pós-teste de Tukey (comparações múltiplas) ($p \leq 0,05$). Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa em relação a SHAM-SS-CG; #, diferença estatisticamente significativa em relação a SHAM-SS-MQt; \$, diferença estatisticamente significativa em relação a SHAM-SS-MQtCV; &, diferença estatisticamente significativa em relação a OVX-SS-CG; +, diferença estatisticamente significativa em relação a OVX-SS-MQt; @, diferença estatisticamente significativa em relação a OVX-SS-MQtCV; ϕ , diferença estatisticamente significativa em relação a OVX-ZOL-MQt.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Escores e distribuição das amostras de acordo com a análise clínica 30 da região de exodontia e áreas adjacentes nos grupos SHAM-SS-CG, SHAM-SS-MQt, SHAM-SS-MQtCVV, OVX-SS-CG, OVX-SS-MQt, OVX-SS-MQtCV, OVX-ZOL-CG, OVX-ZOL-MQt, OVX-ZOL-MQtCV aos 28 dias pós-operatórios. Teste estatístico: Kruskal-Wallis e pós-teste Student-Newman-Keuls. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa em relação a SHAM-SS-CG; #, diferença estatisticamente significativa em relação a SHAM-SS-MQt ($p \leq 0,05$).
- Tabela 2 Escores e distribuição das amostras de acordo com os parâmetros 33 histopatológicos quanto aos níveis de inflamação do local da exodontia e áreas adjacentes em todos os grupos experimentais, aos 28 dias pós-operatórios. Teste estatístico: Kruskal-Wallis e pós-teste Student-Newman-Keuls. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa em relação a SHAM-SS-CG; #, diferença estatisticamente significativa em relação a SHAM-SS-MQt ($p \leq 0,05$).
- Tabela 3 Escores e distribuição das amostras de acordo com os parâmetros 35 histopatológicos quanto ao padrão estrutural da região da ferida supra-alveolar em todos os grupos experimentais, aos 28 dias pós-operatórios. Teste estatístico: Kruskal-Wallis e pós-teste Student-Newman-Keuls. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa em relação a SHAM-SS-CG; #, diferença estatisticamente significativa em relação a SHAM-SS-MQt ($p \leq 0,05$).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOMS	Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial
aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
BFs	Bisfosfonatos
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CG	Coágulo
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CV	Chá Verde (<i>Camellia sinensis</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EX	Exodontia
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
GTE	Extrato de chá verde seco
HE	Hematoxilina-Eosina
MRONJ	Osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos
MQt	Membrana de quitosana pura
MQtCV	Membrana de quitosana enriquecida com chá verde
OVX	Ovariectomia
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PE	Periodontite experimental
PSR	Picrosirius Red
PTON	Porcentagem total da área de tecido ósseo neoformado
PONV	Porcentagem de tecido ósseo não vital
PPGO	Programa de Pós-Graduação em Odontologia
SHAM	Simulação da ovariectomia
SS	Solução Salina
UNESP	Universidade Estadual Paulista
Qt	Quitosana
ZOL	Zoledronato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Animais.....	16
3.2 Cálculo amostral e randomização	16
3.3 Delineamento experimental e linha do tempo	17
3.4 Protocolo de confecção das membranas (MQt e MQtCV).....	18
3.5 Protocolos experimentais	20
3.5.1 Anestesia.....	20
3.5.2 Ovariectomia bilateral e simulação.....	20
3.5.3 Ciclo estral.....	21
3.5.4 Periodontite induzida por ligadura	21
3.5.5 Exodontia e implementação das membranas (MQt e MQtCV).....	21
3.6 Tratamento sistêmico	22
3.7 Eutanásia e obtenção das amostras	22
3.8 Processamento histológico com desmineralização	22
3.9 Processamento histológico sem desmineralização	23
3.10 Análise dos dados e padronização das regiões de interesse.....	23
3.10.1 Análise do exame clínico intraoral.....	25
3.10.2 Análise histopatológica do local da exodontia, tecidos adjacentes e da região da ferida supra-alveolar.....	26
3.10.3 Análise histométrica das porcentagens de tecido ósseo neoformado (PTON) e tecido ósseo não vital (PONV)	26
3.10.4 Análise histoquímica.....	26
3.10.5 Análise de microtomografia computadorizada (Micro-CT).....	27
3.11 Desfechos primário e secundário	27
3.12 Análise estatística dos dados	27
4 RESULTADOS	29
4.1 Análise do exame clínico intraoral.....	29
4.2 Análise histopatológica do local da exodontia, tecidos adjacentes e da região da ferida supra-alveolar.....	32
4.3 Análise histométrica das PTON e PONV.....	39

4.4 Análise histoquímica	42
4.5 Análise de microtomografia computadorizada (Micro-CT).....	44
4.5.1 Análise qualitativa do alvéolo	44
4.5.2 Porcentagem do volume ósseo (BV/TV)	44
4.5.3 Número trabecular (Tb.N).....	44
4.5.4 Separação trabecular (Tb.Sp)	45
4.5.5 Porosidade total (Po.tot).....	45
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXOS	62

1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (MRONJ) é um efeito adverso do uso dos Bisfosfonatos (BFs), medicamentos da classe dos antirreabsortivos¹. A MRONJ, em uma recente definição de Ruggiero *et al.* (2022)², pela Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial (AAOMS), foi relatada como sendo a “presença de osso exposto na região maxilofacial por período superior a oito semanas, em pacientes submetidos a tratamento anterior ou atual com drogas antirreabsortivas e sem história prévia de radioterapia nos maxilares”. Os BFs são importantes medicamentos antirreabsortivos para o tratamento de distúrbios ósseos como osteoporose, doença de Paget e osteogênese imperfeita, quando receitado como dosagem osteoporótica, bem como para o controle de dores ósseas, mieloma múltiplo, inibição da progressão de metástases ósseas e modulação de hipercalcemia, usado em concentrações mais elevadas, como complemento para terapia antineoplásica^{2,3,4}. A prevalência dos casos de MRONJ se encontra grande parte, associada ao BF zoledronato (ZOL), principalmente pelo fato do seu uso, estar associado à terapia antineoplásica^{1,4}.

O grupo mais acometido por esta condição são mulheres em idade avançada submetidas à terapia adjuvante com BPs via intravenosa para tratamento antineoplásico^{5,6}, que apresentem doenças sistêmicas associadas, como Diabetes Mellito. O osso gnático mais acometido pela MRONJ é a mandíbula, mais especificamente nas regiões de pré-molares e molares. No que se diz respeito aos fatores de riscos locais, as extrações dentárias e distúrbios de natureza inflamatória-infecciosa crônica, como a periodontite, encontram-se como as principais desencadeadoras⁷. Uma vez que sua etiopatogenia ainda não é completamente elucidada, seu tratamento se torna limitado, reforçando a importância e o crescente interesse por terapias preventivas^{5,8}.

Dentre os fatores etiopatológicos para o desenvolvimento da MRONJ, foram identificados a supressão dos osteoclastos reabsortivos, provocando microfraturas ósseas acumuladas, favorecendo a presença abundante de áreas de tecido ósseo não vital; os efeitos antiangiogênicos potente dos BFs resultando em necrose avascular; os efeitos citotóxicos, resultando na diminuição da capacidade de reparo de tecidos moles e duros; o aumento da susceptibilidade à infecção do tecido ósseo;

e disfunção da resposta imune local^{5,9,10}. Diante disso, o seu tratamento, baseado na prevenção do desencadeamento da doença, não apresenta ainda um protocolo padrão ouro estipulado. Diferentes terapias clínicas podem ser utilizadas, como o uso de antibioticoterapia profilática em pacientes com histórico de uso prolongado de BFs, principalmente quando o paciente necessita de algum procedimento odontológico invasivo¹¹; uso de enxaguatório bucal com gluconato de clorexidina 0,12%, remoção cirúrgica de lesão e/ou uso de medicamentos¹² e terapias alternativas como terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)¹³; porém nenhuma medida pode ser considerada totalmente eficaz para prevenção da MRONJ, sendo assim pesquisas pré-clínicas, baseado em modelos experimentais padronizados e semelhantes ao grupo de risco, são necessários para avaliação de terapias curativas/preventivas.

A busca por terapias alternativas baseadas em plantas e chás para a prevenção e a resolução de patologias orais vem ganhando destaque no âmbito odontológico nas últimas décadas, devido ao seu ótimo custo-benefício e disponibilidade¹⁴. Cultivado atualmente em mais de 30 países e com origem histórica na China¹⁵, o chá apresenta amplo alcance global, sendo consumido por mais de 3 bilhões de pessoas¹⁶ e está entre as bebidas não alcoólicas mais consumidas mundialmente, sendo dividida em seis grupos principais: chá verde, chá preto, chá branco, chá amarelo, chá Oolong e chá escuro¹⁵. O chá verde (*Camellia sinensis*) (CV) é composto por Polifenóis¹⁷, que compreendem as catequinas e os flavonóides¹⁸. As catequinas do CV, principalmente a epigallocatequina-3-galato (EGCG), que é o polifenol mais abundante na catequina, apresenta propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, antiaterogênicas e antibacterianas¹⁹⁻²¹. Conforme retratado por de Almeida *et al.* (2019)²², a presença do CV reduziu a inflamação, a atividade osteoclástica e a perda óssea alveolar na periodontite experimental, em ratas, podendo estar associado ao tratamento natural da periodontite²³.

Biomateriais poliméricos de origem natural têm sido amplamente investigados na área da saúde devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de interação favorável com tecidos biológicos²⁴. Entre esses materiais, a quitosana (Qt) destaca-se como um polissacarídeo obtido a partir da modificação química da quitina²⁵, substância abundante em fontes marinhas, como crustáceos, moluscos e algas²⁶, o que traduz seu fácil acesso, baixo custo e simples fabricação^{27,28}. A transformação da quitina em Qt resulta em um material com propriedades físico-

químicas mais adequadas para aplicações biomédicas, devido a sua maior solubilidade em meios levemente ácidos e ao seu comportamento bioativo favorável²⁹.

No âmbito da regeneração tecidual na odontologia, membranas biológicas exercem função essencial ao atuarem como barreiras seletivas, restringindo a invasão de tecidos moles e favorecendo a migração e a diferenciação de células envolvidas na formação óssea³⁰⁻³³. A Qt apresenta características que a torna potencialmente atrativa para esse fim, devido à sua baixa toxicidade, caráter policatiônico³⁴ e capacidade de estabelecer interações eletrostáticas com componentes celulares e da matriz extracelular, contribuindo para a adesão celular^{35,36} e o controle microbiológico local³⁷.

Além disso, a versatilidade estrutural da Qt permite sua conformação em diferentes sistemas, como membranas, microesferas, hidrogéis ou matrizes porosas, possibilitando sua aplicação em ambientes biológicos distintos³⁸. A formação de estruturas porosas favorece o crescimento celular tridimensional, a deposição de matriz orgânica e a regeneração tecidual. No entanto, materiais constituídos exclusivamente por Qt podem apresentar limitações mecânicas e funcionais, especialmente em condições úmidas³⁹. Nesse contexto, modificações como associação da Qt com outros compostos bioativos têm sido exploradas com o objetivo de potencializar seu desempenho.

A incorporação de agentes naturais com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, como o CV, surge como uma alternativa promissora para ampliar a funcionalidade desses biomateriais, favorecendo o reparo tecidual e o controle de infecções locais⁴⁰. Assim, o desenvolvimento de membranas à base de Qt associadas a compostos bioativos, como CV, representa uma abordagem relevante e inovadora para aplicações em regeneração óssea e terapias adjuvantes preventivas de lesões como MRONJ.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que o uso das membranas de quitosana pura (MQt) e de quitosana enriquecida com chá verde (MQtCV) como terapia adjuvante preventiva promoveu efeitos discretos e pontuais sobre o reparo alveolar e o fechamento da ferida supra-alveolar em ratas ovariectomizadas, porém não sendo suficiente para impedir a formação de tecido ósseo não vital associada à MRONJ. Esses achados indicam que, no modelo experimental realizado, as membranas não foram suficientes para anular completamente os efeitos deletérios do modelo, sugerindo um potencial terapêutico limitado, que depende da interação com a condição sistêmica e reforça a necessidade de novos estudos para melhor elucidar sua eficácia preventiva.

REFERÊNCIAS

1. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Sep;61(9):1115-7. doi: 10.1016/s0278-2391(03)00720-1. PMID: 12966493.
2. Ruggiero SL, Dodson TB, Aghaloo T, Carlson ER, Ward BB, Kademani D. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2022;80(5):920-43. doi: 10.1016/j.joms.2022.02.008.
3. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(9):1032-45. doi: 10.4065/83.9.1032
4. Brozoski MA, Traina AA, Deboni MC, Marques MM, Naclério-Homem MG. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52(2):265-70.
5. 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.
6. McGowan K, McGowan T, Ivanovski S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. *Oral Dis.* 2018;24(4):527-36. doi: 10.1111/odi.12708.
7. Otto S, Schreyer C, Hafner S, Mast G, Ehrenfeld M, Stürzenbaum S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40(4):303-9. doi: 10.1016/j.jcms.2011.05.003.
8. Toro LF, de Mello-Neto JM, Santos FFVD, Ferreira LC, Statkiewicz C, Cintra LTÂ, Issa JPM, Dornelles RCM, de Almeida JM, Nagata MJH, Garcia VG, Theodoro LH, Casatti CA, Ervolino E. Application of Autologous Platelet-Rich Plasma on Tooth Extraction Site Prevents Occurrence of Medication-Related

- Osteonecrosis of the Jaws in Rats. *Sci Rep.* 2019 Jan 10;9(1):22. doi: 10.1038/s41598-018-37063-y. PMID: 30631095; PMCID: PMC6328584.
9. AlRowis R, Aldawood A, AlOtaibi M, Alnasser E, AlSaif I, Aljaber A, Natto Z. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ): A Review of Pathophysiology, Risk Factors, Preventive Measures and Treatment Strategies. *Saudi Dent J.* 2022 Mar;34(3):202-210. doi: 10.1016/j.sdentj.2022.01.003. Epub 2022 Jan 19. PMID: 35935720; PMCID: PMC9346931.
 10. Rosella D, Papi P, Giardino R, Cicalini E, Piccoli L, Pompa G. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and practical guidelines. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016 Mar-Apr;6(2):97-104. doi: 10.4103/2231-0762.178742. PMID: 27114946; PMCID: PMC4820581.
 11. Hoefert S, Eufinger H. Relevance of a prolonged preoperative antibiotic regime in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69(2):362-80. doi: 10.1016/j.joms.2010.06.200.
 12. Hayashida S, Soutome S, Yanamoto S, Fujita S, Hasegawa T, Komori T, et al. Evaluation of the treatment strategies for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws (MRONJ) and the factors affecting treatment outcome: a multicenter retrospective study with propensity score matching analysis. *J Bone Miner Res.* 2017;32(10):2022-9. doi: 10.1002/jbmr.3191.
 13. Ervolino E, Olivo MB, Toro LF, Freire JOA, Ganzaroli VF, Guiati IZ, et al. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy mediated by butyl toluidine blue in preventing medication-related osteonecrosis of the jaws in rats. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022;40:103172. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.103172.
 14. Bin H, Huangqin C, Longquan S. The ethanol extract of *Osmanthus fragrans* attenuates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated inflammatory effect through the nuclear factor erythroid 2-related factor-mediated antioxidant signalling pathway. *Arch Oral Biol.* 2015;60(7):1030-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.02.026.
 15. Wang JR. A brief history of chinese tea and its spreading. *Sci Conserv Archaeol.* 2019;31:140-6. Xu LJ, Xia GB, Luo ZS, Liu SB. UHPLC analysis of major functional components in six types of chinese teas: constituent profile and origin consideration. *LWT.* 2019;102:52-7.

16. Radeva-Ilieva M, Stoeva S, Hvarchanova N, Georgiev KD. Green Tea: Current Knowledge and Issues. *Foods*. 2025 Feb 22;14(5):745. doi: 10.3390/foods14050745. PMID: 40077449; PMCID: PMC11899301.
17. Nishiumi S, Bessyo H, Kubo M, Aoki Y, Tanaka A, Yoshida K, et al. Green and black tea suppress hyperglycemia and insulin resistance by retaining the expression of glucose transporter 4 in muscle of high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *J Agric Food Chem*. 2010;58(24):12916-23. doi: 10.1021/jf102840w.
18. Du J, Bai L, Bai BZ. The major chemical constituents of tea. *Agric Technol*. 2003;23:53-5.
19. Zhao T, Li C, Wang S, Song X. Green Tea (*Camellia sinensis*): a review of its phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Molecules*. 2022;27(12):3909. doi: 10.3390/molecules27123909.
20. Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501(1):65-72. doi: 10.1016/j.abb.2010.06.013.
21. Yee YK, Koo MW. Anti-*Helicobacter pylori* activity of Chinese tea: in vitro study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000;14(5):635-8. doi: 10.1046/j.1365-2036.2000.00747.x
22. Almeida JM, Marques BM, Novaes VCN, Oliveira FLP, Matheus HR, Fiorin LG, et al. Influence of adjuvant therapy with green tea extract in the treatment of experimental periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2019;102:65-73. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.03.028.
23. Fournier-Larente J, Morin MP, Grenier D. Green tea catechins potentiate the effect of antibiotics and modulate adherence and gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol*. 2016;65:35-43. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.01.014.
24. Lamei E, Hasanzadeh M. Fabrication of chitosan nanofibrous scaffolds based on tannic acid and metal-organic frameworks for hemostatic wound dressing applications. *Int J Biol Macromol*. 2022;208:409-20. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.117.
25. Gruppuso M, Iorio F, Turco G, Marsich E, Porrelli D. Hyaluronic acid/lactose-modified chitosan electrospun wound dressings: crosslinking and stability criticalities. *Carbohydr Polym*. 2022;288:119375. doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119375.

26. Pellis A, Guebitz GM, Nyanhongo GS. Chitosan: Sources, Processing and modification techniques. *Gels*. 2022;8(7):393. doi: 10.3390/gels8070393.
27. Desai N, Rana D, Salave S, Gupta R, Patel P, Karunakaran B, et al. Chitosan: a potential biopolymer in drug delivery and biomedical applications. *Pharmaceutics*. 2023;15(4):1313. doi: 10.3390/pharmaceutics15041313.
28. Joz Majidi H, Mirzaee A, Jafari SM, Amiri M, Shahrousvand M, Babaei A. Fabrication and characterization of graphene oxide-chitosan-zinc oxide ternary nano-hybrids for the corrosion inhibition of mild steel. *Int J Biol Macromol*. 2020;148:1190-200. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.060.
29. Thambiliyagodage C, Jayanetti M, Mendis A, Ekanayake G, Liyanaarachchi H, Vigneswaran S. Recent Advances in Chitosan-Based Applications-A Review. *Materials (Basel)*. 2023 Mar 3;16(5):2073. doi: 10.3390/ma16052073. PMID: 36903188; PMCID: PMC10004736.
30. Wang X, Wang X, Tan Y, Zhang B, Gu Z, Li X. Synthesis and evaluation of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites for bone grafting. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Jun 15;89(4):1079-87. doi: 10.1002/jbm.a.32087. PMID: 18478560.
31. Sionkowska A, Wisniewski M, Skopinska J, Kennedy CJ, Wess TJ. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*. 2004 Feb;25(5):795-801. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00595-7. PMID: 14609668.
32. Li, X., Feng, Q., Jiao, Y., & Cui, F. (2005). Collagen-based scaffolds reinforced by chitosan fibres for bone tissue engineering. *Polymer International*, 54(7), 1034-1040.
33. Venkatesan J, Kim SK. Chitosan composites for bone tissue engineering--an overview. *Mar Drugs*. 2010 Aug 2;8(8):2252-66. doi: 10.3390/md8082252. PMID: 20948907; PMCID: PMC2953403.
34. Huq T, Khan A, Brown D, Dhayagude N, He Z, Ni Y. Sources, production and commercial applications of fungal chitosan: a review. *J Bioresour Bioprod*. 2022;7(2):85–8. doi: 10.1016/j.jobab.2022.01.002.
35. Shukla SK, Mishra AK, Arotiba OA, Mamba BB. Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review. *Int J Biol Macromol*. 2013 Aug;59:46-58. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.043.

36. Laranjeira, M. C. M., & Fávere, V. T. de .. (2009). Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, 32(3), 672–678. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300011>
37. Goy, R. C., Britto, D. de ., & Assis, O. B. G.. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19(3), 241–247. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>
38. Revete A, Aparicio A, Cisterna BA, Revete J, Luis L, Ibarra E, Segura González EA, Molino J, Reginensi D. Advancements in the Use of Hydrogels for Regenerative Medicine: Properties and Biomedical Applications. *Int J Biomater.* 2022 Nov 7;2022:3606765. doi: 10.1155/2022/3606765. PMID: 36387956; PMCID: PMC9663251.
39. Clasen C, Wilhelms T, Kulicke WM. Formation and characterization of chitosan membranes. *Biomacromolecules.* 2006 Nov;7(11):3210-22. doi: 10.1021/bm060486x. PMID: 17096553.
40. Shukla SK, Mishra AK, Arotiba OA, Mamba BB. Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review. *Int J Biol Macromol.* 2013 Aug;59:46-58. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.043.
41. Confederação Brasileira de Experimentação Animal (COBEA). *Princípios Éticos na Experimentação Animal*. 2ª ed. São Paulo: COBEA; 2012.
42. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. *ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research*. *PLoS Biol.* 2020 Jul 14;18(7):e3000410. doi:10.1371/journal.pbio.3000410.
43. Campos MGN. Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação controlada de fármacos [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP; 2007.
44. Almeida LA. Membrana de quitosana incorporada com extrato de uva Jacquez para tratamento de feridas cutâneas [dissertação]. Poços de Caldas: Universidade de Alfenas; 2017.
45. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62(4A):609-14. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008.
46. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats

- with diabetes. *J Periodontol.* 2008;79(11):2156-65. doi: 10.1902/jop.2008.080103.
47. Molon RS, Avila ED, Nogueira AVB, Souza JAC, Avila-Campos MJ, Andrade CR, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol.* 2014;85(3):465-77. doi: 10.1902/jop.2013.130225.
48. Silva PG, Ferreira Junior AE, Teófilo CR, Barbosa MC, Lima Júnior RC, Sousa FB, et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Arch Oral Biol.* 2015;60(9):1237-45. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.05.015.
49. de Oliveira PHC, Gomes Filho JE, Rodrigues MJDS, da Silva CC, Cardoso CDBM, Cosme da Silva L, Ervolino E, Cintra LTA (2022) Influência da administração de suplemento de ômega-3 na resposta do tecido subcutâneo de cimentos endodônticos em ratos Wistar. *Int Endod J* 55(10):1026–1041.
50. Statkiewicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, de Sá DP, Casatti CA, Issa JPM, Cintra LTA, de Almeida JM, Nagata MJH, Garcia VG, Theodoro LH, Ervolino E. 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 Jul;184:7-17. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.05.004. Epub 2018 May 9. PMID: 29777942.
51. Gusman DJR, Ervolino E, Theodoro LH, Garcia VG, Nagata MJH, Alves BES, de Araujo NJ, Matheus HR, de Almeida JM. Antineoplastic agents exacerbate periodontal inflammation and aggravate experimental periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2019 Apr;46(4):457-469. doi: 10.1111/jcpe.13101.
52. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
53. Pereira-Silva, M., Hadad, H., de Jesus, L.K. *et al.* Ozone therapy effect in medication-related osteonecrosis of the jaw as prevention or treatment: microtomographic, confocal laser microscopy and histomorphometric analysis. *Clin Oral Invest* 28, 151 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00784-024-05547-z>

54. Badel T, Pavicin IS, Carek AJ, Rosin-Grget K, Grbesa D. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate. *Coll Antropol.* 2013 Jun;37(2):645-51. PMID: 23941019.
55. Migliorati, C., Epstein, J., Abt, E. *et al.* Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates in cancer: a narrative review. *Nat Rev Endocrinol* 7, 34–42 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.195>
56. T. Badel, I.S. Pavicin, A.J. Carek, K. Rosin-Grget, D. Grbesa, Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate, *Coll. Antropol.* 37 (2013) 645–651.
57. Khan AA, Morrison A, Kendler DL, Rizzoli R, Hanley DA, Felsenberg D, et al. Case-Based Review of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and Application of the International Recommendations for Management From the International Task Force on ONJ. *J Clin Densitom.* 2017;20(1):8-24. doi: 10.1016/j.jocd.2016.09.005.
58. Høegh-Andersen P, Tankó LB, Andersen TL, Lundberg CV, Mo JA, Heegaard AM, et al. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(2):R169-80. doi: 10.1186/ar1152.
59. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991;15(3):175-91. doi: 10.1016/0169-6009(91)90124-i.
60. Johnston BD, Ward WE. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. *Biomed Res Int.* 2015;2015:635023. doi: 10.1155/2015/635023.
61. Li J, Chen X, Lu L, Yu X. The relationship between bone marrow adipose tissue and bone metabolism in postmenopausal osteoporosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020 Apr;52:88-98. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.02.003. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32081538.
62. Ferrari E, Naponelli V. Catechins and Human Health: Breakthroughs from Clinical Trials. *Molecules.* 2025 Jul 25;30(15):3128. doi: 10.3390/molecules30153128. PMID: 40807299; PMCID: PMC12348855.
63. Ohishi T, Goto S, Monira P, Isemura M, Nakamura Y. Anti-inflammatory Action of Green Tea. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2016;15(2):74-90. doi: 10.2174/1871523015666160915154443. PMID: 27634207.

64. Johnston BD, Ward WE. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. *Biomed Res Int.* 2015;2015:635023. doi: 10.1155/2015/635023. Epub 2015 Apr 28. PMID: 26060817; PMCID: PMC4427799. Johnston BD, Ward WE. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. *Biomed Res Int.* 2015;2015:635023. doi: 10.1155/2015/635023. Epub 2015 Apr 28. PMID: 26060817; PMCID: PMC4427799.
65. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone.* 2011 Jul;49(1):34-41. doi: 10.1016/j.bone.2010.11.008. Epub 2010 Nov 26. PMID: 21111853.
66. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol.* 2009 Mar;144(5):667-76. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07504.x. Epub 2008 Nov 20. PMID: 19036117; PMCID: PMC2739302.
67. Córdova LA, Guilbaud F, Amiaud J, Battaglia S, Charrier C, Lezot F, Piot B, Redini F, Heymann D. Severe compromise of preosteoblasts in a surgical mouse model of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016 Sep;44(9):1387-94. doi: 10.1016/j.jcms.2016.07.015. Epub 2016 Jul 22. PMID: 27519659.
68. Hadad H, de Jesus LK, da Silva MP, Oliveira MEFS, Guastaldi FPS, Nilsson O, Okamoto R, Souza FÁ. A Systematic Review of the Effects of Bisphosphonates on Osteoblasts In Vitro. *Calcif Tissue Int.* 2025 Jun 16;116(1):86. doi: 10.1007/s00223-025-01390-w. PMID: 40523987; PMCID: PMC12170739.
69. Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Jul;106(1):5-13. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.03.036. Epub 2008 May 27. PMID: 18504149.
70. Martelli SJR, Damian MF, Gomes APN, Schinestsck AR, Silva AER, Vasconcelos ACU. Comparison of effects of zoledronic acid and clodronate on the bone structure: imaginological and histomorphometrical study in vivo. *J Oral Pathol Med.* 2017;46(8):632-6. doi: 10.1111/jop.12546.
71. Wang L, Fang D, Xu J, Luo R. Various pathways of zoledronic acid against osteoclasts and bone cancer metastasis: a brief review. *BMC Cancer.* 2020 Nov

- 3;20(1):1059. doi: 10.1186/s12885-020-07568-9. PMID: 33143662; PMCID: PMC7607850.
72. Madni A., Kousar R., Naeem N., Wahid F. Recent Advancements in Applications of Chitosan-Based Biomaterials for Skin Tissue Engineering. *J. Bioresour. Bioprod.* 2021;6:11–25
73. Kafi MA, Aktar MK, Phanny Y, Todo M. Adhesion, proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cell on chitosan/collagen composite scaffold. *J Mater Sci Mater Med.* 2019 Nov 29;30(12):131. doi: 10.1007/s10856-019-6341-8. PMID: 31784840.
74. Muzzarelli RA, Greco F, Busilacchi A, Sollazzo V, Gigante A. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: a review. *Carbohydr Polym.* 2012 Jul 1;89(3):723-39. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.04.057. Epub 2012 May 4. PMID: 24750856.
75. Ohishi T, Goto S, Monira P, Isemura M, Nakamura Y. Anti-inflammatory Action of Green Tea. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2016;15(2):74-90. doi: 10.2174/1871523015666160915154443. PMID: 27634207.

ANEXOS

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



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 "**Efeitos do uso de uma membrana de quitosana enriquecida com chá verde (Camellia sinensis) como terapia adjuvante preventiva à osteonecrose dos maxilares**", Processo FOA nº 356-2024, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 26 de Junho de 2024.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Julho de 2028.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Agosto de 2028.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Effects of using a chitosan membrane enriched with green tea (Camellia sinensis) as preventive adjuvant therapy for osteonecrosis of the jaw**", Protocol FOA nº 356-2024, under the supervision of Juliano Milanezi de Almeida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 26, 2024.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 01, 2028.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 01, 2028.

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