

Matheus Carvalho Michiles Fonseca

***Análise de terapias locais antimicrobianas e
biomodulatórias no tecido gengival devido as
alterações causadas pelo zoledronato pós-exodontia
em ratas senescentes***

Matheus Carvalho Michiles Fonseca

Análise de terapias locais antimicrobianas e biomodulatórias no tecido gengival devido as alterações causadas pelo zoledronato pós-exodontia em ratas senescentes

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

Orientador: Prof. Associado Leonardo Perez Faverani

Dedico esse trabalho a todos que apoiaram meus sonhos, aos meus orixás que me guiaram até o presente momento e principalmente aos meus pais, Patrícia e Marcelo, que estiveram sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha **casa de Umbanda, aos orixás da casa e aos meus orixás** que me guiaram por toda minha trajetória me ajudando e orientando por diversos momentos, sem sua ajuda tanto espiritual, quanto terrena eu jamais teria chegado onde cheguei.

Aos meus pais, **Patrícia e Marcelo**, por todo esforço e dedicação que tiveram por mim, por tudo que abdicaram para que eu pudesse realizar meus objetivos. Foram as pessoas que mais incentivaram meus sonhos e sempre acreditaram que eu era capaz, mesmo quando eu duvidava.

A minha mãe, **Patrícia**, por ter abdicado de seu trabalho para acompanhar meu crescimento e me proporcionar a melhor educação que poderia me dar, muitas vezes puxando minha orelha, até hoje, mas sempre acreditando no meu potencial em ser melhor.

Ao meu pai, **Marcelo**, por ter abdicado durante anos de seu tempo de qualidade, para poder proporcionar tudo do melhor para mim, meu irmão e minha mãe, sem que nada faltasse em casa. Mesmo por diversas vezes distante, sempre fez questão de demonstrar o quanto nos amava.

Ao meu avô, **Gilson**, que infelizmente não vai ver eu me formar, mas seu sonho ainda em vida era poder construir meu consultório depois de formado. Obrigado por sempre ter transmitido todo seu amor e apoio quanto a minha pessoa.

A melhor amiga que eu poderia ter feito, **Maria Paula**, que esteve comigo desde o início, nos piores e nos melhores momentos, por diversos momentos me socorreu, deu broncas e até fez papel de mãe. Sou muito grato pela sua parceria em todos esses anos.

Agradeço a minha namorada, **Beatriz**, por ter aparecido na minha vida e mostrado como é maravilhosa a reciprocidade em amar alguém, até eu me surpreendi com nosso namoro, ninguém esperava, muito menos eu, mas sou grato todos os dias por ter você me dando apoio, amor e carinho.

A todos os amigos que fiz durante a graduação, obrigado por estarem comigo nos meus momentos de sofrimento e alegria, vocês foram muito importantes na minha trajetória contribuindo para o meu amadurecimento como pessoa e profissional.

Ao meu orientador, Professor **Leonardo Perez Faverani**, que sempre se mostrou disponível para esclarecer dúvidas e compartilhar seu conhecimento. Sua paixão pelo ensino me admira e sou imensamente grato por ter tido a oportunidade de aprender com o senhor.

Ao professor, **André Pinheiro de Magalhães Bertoz**, por sua constante disponibilidade e apoio ao longo da graduação. Agradeço por acreditar em meu potencial e por ser uma fonte contínua de inspiração e motivação.

A professora, **Barbara Ribeiro Rios**, por sua paciência, conhecimento, dedicação e por me guiar com sabedoria durante todo o processo de desenvolvimento deste trabalho. Sua orientação foi crucial para meu desenvolvimento profissional e sua expertise e dedicação são atributos que admiro profundamente.

“Mílagres só acontecem com as pessoas que nunca
desistem”

Eiichiro Oda

RESUMO

FONSECA, M. C. M. **Análise de terapias locais antimicrobianas e biomodulatórias no tecido gengival devido as alterações causadas pelo zoledronato pós-exodontia em ratas senescentes.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, 2024.

A osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (MRONJ) é uma condição causada por fármacos antirreabsortivos e anti-angiogênicos. Terapias locais antimicrobianas e biomodulatórias podem exercer um papel fundamental no controle desses casos. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência do óleo ozonizado, terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) fibrina rica em plaquetas e leucócitos(L-PRF), na prevenção e tratamento de MRONJ, induzida experimentalmente. Para tal intuito, 26 ratas fêmeas, de 18 meses de idade, a qual 1 foi doadora de sangue para L-PRF, foram divididas em 5 grupos experimentais (n=5). No grupo SAL, aplicou-se solução de cloreto de sódio 0,9% e o grupo ZOL, recebeu 100µg/kg de zoledronato, ambos a cada 3 dias durante 7 semanas. Os grupos a seguir apresentam o mesmo protocolo de aplicação de zoledronato. No grupo ZOL+L-PRF, foi feita a aposição da matriz de L-PRF, imediata pós-extração do primeiro molar inferior esquerdo (dia 0). O grupo ZOL+aPDT recebeu terapia local de aPDT, enquanto o grupo ZOL+OZN+aPDT recebeu as terapias de aPDT e óleo ozonizado, sendo as terapias de ambos os grupos realizadas nos períodos dos dias 0, 2 e 4 pós-operatório. Os grupos foram eutanasiados após 28 dias de pós-operatório, na sétima semana do experimento. O tecido gengival na região do alvéolo reparacional foi coletado para as análises histológicas (HE e Picrosírius Red). A análise em HE, do grupo L-PRF ($p<0,05$), demonstrou maior concentração de células imunológicas e vasos sanguíneos em relação as demais. Na análise em PSR, o grupo L-PRF foi o único grupo a apresentar mais fibras colágenas imaturas em relação as maduras. Concluiu-se que o L-PRF é a terapia mais eficaz para promover cicatrização gengival em pacientes com MRONJ.

Palavras-chave: osteonecrose; fibrina rica em plaquetas; ozonioterapia; terapia com luz baixa intensidade.

ABSTRACT

FONSECA, M. C. M. **Analysis of local antimicrobial and biomodulatory therapies in gingival tissue due to the changes caused by zoledronate post-extraction in senescent rats.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, 2024.

Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) is a condition caused by antiresorptive and antiangiogenic drugs. Local antimicrobial and biomodulatory therapies can play a fundamental role in controlling these cases. The objective of the work was to evaluate the efficiency of ozonized oil, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) and fibrin rich in platelets and leukocytes (L-PRF), in the prevention and treatment of experimentally induced MRONJ. For this purpose, 26 female rats, 18 months old, of which 1 was a blood donor for L-PRF, were divided into 5 experimental groups (n=5). In the SAL group, 0.9% sodium chloride solution was applied and the ZOL group received 100µg/kg of zoledronate, both every 3 days for 7 weeks. The following groups have the same zoledronate application protocol. In the ZOL+L-PRF group, the L-PRF matrix was placed immediately after extraction of the lower left first molar (day 0). The ZOL+aPDT group received local aPDT therapy, while the ZOL+OZN+aPDT group received aPDT and ozonized oil therapies, with both groups' therapies performed on days 0, 2 and 4 post-operatively. The groups were euthanized 28 days after surgery, in the seventh week of the experiment. The gingival tissue in the repair socket region was collected for histological analyzes (HE and Picrosirius Red). The analysis in HE, from the L-PRF group (p<0.05), demonstrated a higher concentration of immune cells and blood vessels compared to the others. In the PSR analysis, the L-PRF group was the only group to present more immature collagen fibers compared to mature ones. It is concluded that L-PRF is the most effective therapy to promote gingival healing in patients with MRONJ.

Keywords: osteonecrosis; platelet-rich fibrin; ozone therapy; low intensity light therapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma representativo da distribuição dos animais. Animal doador de sangue (n=1). Grupos experimentais (N=30) eutanasiados 49 dias após início do protocolo medicamentoso: Grupo SAL (n=5), ZOL (n=5), ZOL + L-PRF (n=5), ZOL+aPDT (n=5) e ZOL + OZN + aPDT (n=5) 19
- Figura 2 – (A) Instalação da ligadura de algodão no 1º molar inferior esquerdo das ratas. (B) Periodontite induzida pela ligadura de algodão. 20
- Figura 3 – (A) Procedimento de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. (B) Foto pós-imediata do alvéolo a exodontia. 21
- Figura 4 – (A) Representação da conformação física de L-PRF após centrifugação e separação da porção de interesse. (B) Aspecto clínico pós-imediato de L-PRF no alvéolo. 23
- Figura 5 – (A) Pré irradiação com azul de metileno (fotossensibilizador) no alvéolo vazio. (B) Irradiação com laser de baixa potência logo após, em região de alvéolo 24
- Figura 6 – (A e B) Aplicação de óleo de gisassol ozonizado com cureta de Molt no alvéolo pós-exodontico. 24
- Figura 7 - Imagem representativa da cronologia das etapas experimentais 25
- Figura 8 - Imagens representativas da análise histológica de células inflamatórias e vasos sanguíneos. (A) Representação gráfica dos valores de células inflamatórias. (B) Representação gráfica do número de vasos sanguíneos (C) Fotomicrografias das células inflamatórias e vasos sanguíneos de acordo com os tratamentos 30
- Figura 9 - Imagens representativas da coloração PSR para identificar a maturidade das fibras colágenas. Fotomicrografias das fibras colágenas presentes de acordo com os tratamentos 31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Desenho Experimental: Animais	17
3.2 Delineamento do procedimento cirúrgico	19
3.2.1 Pré operatório	20
3.2.2 Período de Indução da Osteonecrose	20
3.2.3 Exodontia	21
3.2.4 Coleta e terapia local com L-PRF	22
3.2.5 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)	23
3.2.6 Ozonioterapia local	24
3.3 Eutanásia	25
4 ANÁLISES	27
4.1 Análise clínica	27
4.2 Análises e processamento de tecidos moles	27
4.2.1 Análise microscópica e área microscópica de interesse (AMI)	27
4.2.2 Análise histológica	27
4.2.3 Análise histológica: Picosírius Red (PSR)	28
4.3 Análise dos dados	29
5 RESULTADOS	30
5.1 Análise histológica	30
5.2 Análise por Picosírius Red	31
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Segundo a atualização da American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) do ano de 2022, a osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (MRONJ) é definida como uma área de exposição óssea na maxila ou na mandíbula que não se repara em oito semanas e acomete pacientes que estão em tratamento ou já realizaram tratamentos com a administração isolada de medicamentos antirreabsortivos ou em combinação com moduladores imunológicos ou drogas antiangiogênicas, sem apresentarem antecedentes de radioterapia ou doença metastática no complexo maxilomandibular. (1)

Dentre as drogas que podem resultar no aparecimento de MRONJ, os bisfosfonatos (BFs) são aquelas que apresentam maior predisposição para ocorrência dessa doença. Esses medicamentos vêm sendo utilizados desde a década de 60, para o tratamento de doenças e distúrbios que alteram o metabolismo ósseo, como doença de *Paget* do osso, mieloma múltiplo, doenças metabólicas do cálcio, menopausa, osteoporose, osteopenia e condições oncológicas de metástase óssea, sendo seu uso nos últimos anos bastante ampliado como resultado do crescente envelhecimento da população. (2,3,4,5,6,7,8,9) Desde 2003, há relatos dessa classe de fármacos induzindo osteonecrose dos maxilares, sendo esse um fator agravante que implica diretamente na qualidade de vida dos pacientes, em sua maioria mulheres de idade avançada. (1,3,7,8)

Tais medicamentos alteram os mecanismos de reabsorção e remodelação óssea, inibindo a atividade dos osteoclastos. Possuem forte afinidade pelo tecido ósseo, depositando-se nos cristais de hidroxiapatita tendo uma meia vida de até 10 anos, por isso, mesmo com a interrupção do uso dessas drogas, seus efeitos podem permanecer por muitos anos. (4,5,6,8) Estes competem com os osteoclastos pelas regiões de ligação com a hidroxiapatita, impedindo a formação da lacuna de *Howship*. (4) Devido a essa competição os osteoclastos tornam-se inativos e sofrem apoptose, consequentemente diminuindo a expressão das proteínas RANK e OPG responsáveis pela regulação da atividade osteoclástica no eixo OPG/RANK-

RANKL. Com isso, ocorre um desequilíbrio no eixo de regulação osteoclastica impedindo a formação e reabsorção do tecido ósseo. (4,5,6,8)

Entre os bisfosfonatos mais utilizados, o ácido zoledrônico administrado por via endovenosa é o de maior potência relativa, sendo o fármaco que apresenta uma maior frequência no aparecimento de casos de MRONJ. (4,10,11) Sua atuação não se limita somente ao tecido ósseo, podendo retardar a função das células tronco mesenquimais da gengiva (GMSCs), diminuindo sua proliferação, adesão e capacidade de migração, causando apoptose precoce pela interrupção do seu ciclo celular. (9,12)

O uso desses medicamentos a longo prazo, apresentam efeito citotóxico as GMSCs e suprimem tanto a via de sinalização do fator de crescimento transformador 1-beta (TGF-1beta), que atua diretamente na síntese de colágeno em fibroblastos, quanto o fator de crescimento endotelial (VEGF), que atua estimulando a angiogênese, o que torna o processo de cicatrização gengival deficiente. (9,12,13) Assim qualquer trauma existente permitirá que o tecido ósseo continue exposto ao microambiente da boca, já que a mucosa oral atua como barreira primária para invasão de patógenos, permitindo a proliferação de microorganismos que causarão uma resposta inflamatória resultando no aparecimento da osteonecrose. (9,12,14)

Vale ressaltar que não só o tipo de droga antirreabsortiva ou antiangiogênica condiciona o aparecimento da patologia, mas também as condições locais e sistêmicas do paciente, como a presença de comorbidades, a via de administração, a dosagem, a frequência e a potência relativa do fármaco utilizado, tratamento concomitante com corticoides ou quimioterápicos, idade, sexo, doença periodontal, má higiene oral entre outros fatores. (1,4,5,6,7,8)

Dessa forma a MRONJ apresenta uma etiopatologia multifatorial, não tendo estabelecido um protocolo único de tratamento na literatura que abranja todos os casos. De modo geral, são aplicadas abordagens clinicas baseadas no estadiamento clínico da doença, que vão desde bochechos com soluções tópicas como o gluconato de clorexidina 0,12% até antibioticoterapia intensiva ou debridamento cirúrgico com remoção de tecido ósseo necrótico exposto. (1,4,7) Além disso, terapias adjuvantes têm mostrado resultados positivos a nível celular e in vivo, tanto como tratamento quanto medida preventiva, com o

intuito de minimizar a contaminação da região, bem como otimizar o reparo tecidual ou a qualidade dos tecidos de suporte e revestimento, a exemplos da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), óleo ozonizado e fibrina rica em plaquetas e leucócitos(L-PRF).

A aPDT consiste na utilização de luz com comprimento de onda compatível com a banda de absorção de um fotossensibilizador, seletivamente pré-absorvido pela membrana celular de células microbianas, que na presença do oxigênio é ativado, gerando altos níveis de oxigênio reativo (ROS), altamente citotóxico e letal para bactérias, fungos, vírus e parasitas. (11,15,16) Essa terapia é vantajosa por ser um tratamento não invasivo que provoca morte microbiana sem causar resistência, nem efeitos colaterais ao paciente. (15,16) Além da ação antimicrobiana, estudos mostram que aPDT, ao utilizar laser de baixa potência como fonte de luz, apresenta ações na modulação da resposta inflamatória, regeneração óssea, angiogênese, proliferação, migração e diferenciação na atividade celular, eventos esses essenciais para promover o processo de reparação tecidual e analgesia. (10,11,15,16,17,18)

O ozônio (O_3), é uma molécula gasosa natural formada por três átomos de oxigênio, podendo se apresentar na forma líquida ou gasosa e terapeuticamente no formato de óleo, produzido através do borbulhamento de altas concentrações do O_3 em óleo, retendo assim a molécula do gás. (19,22,23,25) A terapia com óleo ozonizado, tem a capacidade de diminuir a dispersão de O_3 nos tecidos, atuando diretamente no metabolismo ósseo, sistema de defesa antioxidante e na microcirculação, em função da liberação de ROS, contribuindo para atividade antimicrobiana e expressão de citocinas, como TGF-beta, VEGF e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), importantes para o reparo dos tecidos ósseo, epitelial e conjuntivo. Embora escassa, a literatura apresenta evidências da ozonioterapia promovendo a cicatrização de tecidos moles em pacientes com MRONJ. (23,24,25,26)

Por fim, o protocolo terapêutico com L-PRF, uma estrutura tridimensional em gel formada por uma rede complexa de microfibrina na qual plaquetas e leucócitos estão aprisionados, manifesta uma alta concentração dos fatores de crescimento TGF-beta, VEGF, PDGF, fator de crescimento epidérmico (EGF), fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) , esses por sua vez induzem angiogênese e crescimento tecidual. (13,27,28,29,30,31.32,33,34) Além disso,

apresenta efeito antibacteriano, decorrente da concentração de células imunes, podendo ser potencializado junto a uma antibioticoterapia. (35) Em virtude de suas propriedades biológicas, essa terapia autóloga regenerativa tornou-se um potencial tratamento preventivo para MRONJ, fazendo uso de derivados do próprio sangue do paciente e, por isso, considerada uma metodologia simples de baixo custo. (27,30,33)

Dentre as terapias locais contextualizadas, não existem estudos suficientes na literatura sobre a associação benéfica dessas terapias e comparações terapêuticas entre elas, relacionadas ao tratamento de MRONJ. Dessa forma, torna-se bastante relevante o estudo em modelo animal nas terapias apresentadas, como forma de analisar sua efetividade separadamente e em associação, na busca de resultados satisfatórios quanto a reparação de tecido mole.

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivo analisar a eficiência das terapias locais antimicrobianas e biomodulatórias, aPDT, óleo ozonizado e L-PRF, no tecido gengival em reparação nas regiões do alvéolo pós-exodontico de ratas senescentes tratadas com zoledronato.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho Experimental: Animais

Todos os protocolos experimentais foram enviados para o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, sendo somente iniciados após análise e aprovação.

Para tanto, 26 animais (25 + 1 doador de sangue) (*Rattus norvegicus albinus Wistar*) senis, fêmeas, com aproximadamente 18 meses, com peso corporal entre 300 a 350 gramas, a partir de linhagem mantida no Biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição.

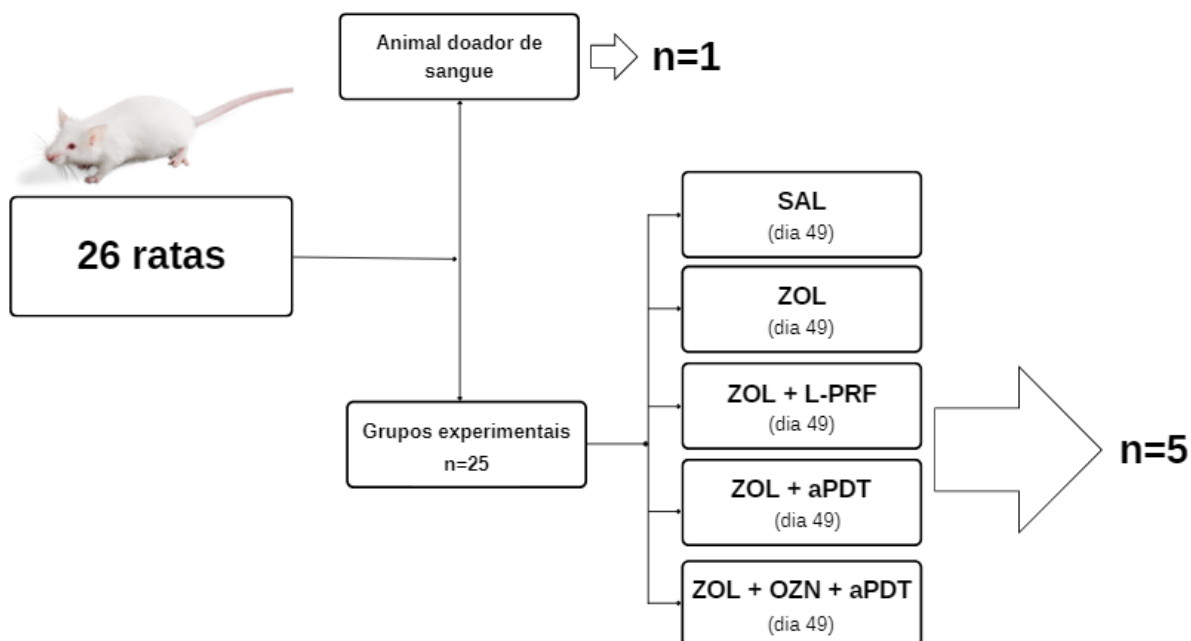
Para determinação do número amostral, foi feita uma varredura nas principais bases de dados (PUBMED, Scopus, Embase, Web of Science e Scielo) tendo como critério estudos de experimentação animal que apresentassem metodologia semelhante e/ou utilização de óleo ozonizado, terapia fotodinâmica antimicrobiana e/ou fibrina rica em plaquetas, padronizando assim a busca por palavras-chaves “Osteonecrose; L-PRF; Ozonioterapia; aPDT”. Devido à ausência de literaturas avaliando as variáveis, a metodologia desse projeto foi baseada no trabalho de Zheng *et al.* (12) elegendo como parâmetro, para o número de animais, o valor de n=5 por grupo experimental.

Com o intuito de avaliar as alterações teciduais, 25 animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais sendo o Grupo 1 - **SAL**, com 5 ratas que receberam 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (solução salina) intraperitoneal, a cada 3 dias, por 7 semanas, simulando os procedimentos com o zoledronato (controle negativo); Grupo 2 - **ZOL** com 5 ratas que foram induzidas a osteonecrose pela aplicação de zoledronato 100µg/kg, a cada 3 dias por 7 semanas (controle positivo); Grupo 3 - **ZOL+L-PRF** com 5 ratas também induzidas a osteonecrose com zoledronato e submetidas a aposição de matriz de L-PRF sobre o alvéolo pós exodôntico no dia 0 (pós-operatório imediato); Grupo 4 - **ZOL+aPDT** com 5 ratas que também foram induzidas a osteonecrose com zoledronato no mesmo protocolo e aplicação de aPDT por 60 segundos no alvéolo nos períodos de

0, 2 e 4 dias pós operatórios; Grupo 5 - **ZOL+OZN+aPDT** com 5 ratas que foram induzidas a osteonecrose com zoledronato, aplicação de aPDT usando o protocolo já citado e a terapia local com ozônio no qual será utilizado óleo de girassol ozonizado (30 ml – 600 mEq/kg) em concentração de 0,3 mg/kg, durante 2 minutos, período em que o animal estará imobilizado, aos 0, 2 e 4 dias pós cirúrgico. As doses do plano medicamentoso foram baseadas em terapias oncológicas em humanos, adaptadas para animais. Os protocolos, de coleta e centrifugação para obtenção da matriz de L-PRF se deu baseada no estudo Awadeen *et al.* (35) e de acordo com o protocolo de centrifugação estabelecido por Choukroun *et al.* (36); de concentração do óleo de girassol ozonizado eleita para o grupo experimental desta proposta foi fundamentada nos resultados clínicos de reparação tecidual publicados por Monteiro *et al.* (25); e de aplicação de aPDT foi embasado no trabalho de Ervolino *et al.* (11).

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas (até 5 animais por gaiola) em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração balanceada contendo 1,4% Ca e 0,8% P (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todas as etapas experimentais e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos, no qual serão submetidos a jejum (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma representativo da distribuição dos animais. Animal doador de sangue (n=1). Grupos experimentais (N=25) eutanasiados 49 dias após início do protocolo medicamentoso: Grupo SAL (n=5), ZOL (n=5), ZOL + L-PRF (n=5), ZOL+aPDT (n=5) e ZOL + OZN + aPDT (n=5)



Fonte: Autor, 2023

3.2 Delineamento do procedimento cirúrgico

Os 26 animais (25 + 1 animal doador para coleta de L-PRF) passaram por um período de adaptação ao biotério e foram submetidos a um jejum de 12 horas previamente ao procedimento cirúrgico. Com o intuito de preservar os animais, todos os procedimentos invasivos, que poderiam ter causado dor ou desconforto, foram realizadas sob anestesia através da administração de 50mg/kg de quetamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) além da anestesia infiltrativa para analgesia e hemostasia da região manipulada com cloridrato de mepivacaína (0,3 ml/kg, Mepiadre 2% com adrenalina 1:100.000, DFL).

3.2.1 Pré operatório

A primeira intervenção foi realizada com a instalação de ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo de cada animal, com o objetivo de induzir a doença periodontal, uma vez que essa doença favorece a reabsorção óssea, facilitando a extração dentária, o que evita complicações como fratura radicular, e induzindo a osteonecrose. O quadro infeccioso da periodontite é apontado, na literatura, como um dos principais fatores predisponentes a osteonecrose. (5) (Figura 2)

Figura 2 – (A) Instalação da ligadura de algodão no 1º molar inferior esquerdo das ratas. (B) Periodontite induzida pela ligadura de algodão.



Fonte: Autor, 2023

3.2.2 Período de Indução da Osteonecrose

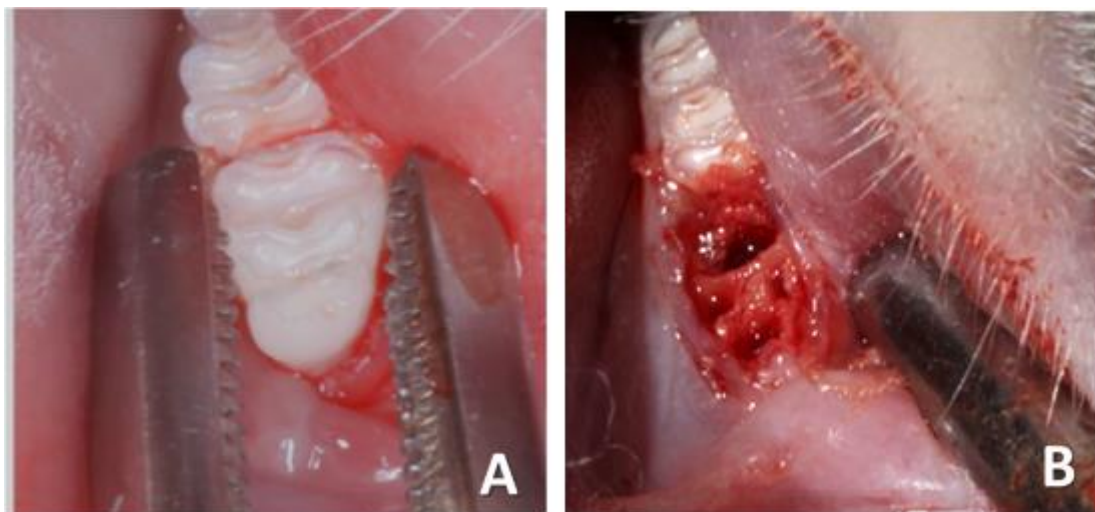
No dia 0, iniciou-se o protocolo de indução de osteonecrose a 21 animais (20 referentes aos grupos **ZOL**; **ZOL+L-PRF**, **ZOL+aPDT** e **ZOL+OZN+aPDT**; + 1 animal doador para L-PRF), que foram submetidos a administração de zoledronato 100µg/kg diluídos em 0,45 ml de solução salina, por via intraperitoneal, em uma seringa SLIP INSULINA de 1ml, descartável com agulha de calibre 13mm x 0,38mm. A aplicação foi realizada com o intervalo de 3 dias, com duração de 7 semanas (49 dias) até eutanásia.

Os 5 animais restantes (referentes ao grupo SAL) não foram expostos ao medicamento zoledronato, recebendo apenas 0,45 ml de solução salina também por via intraperitoneal, nas mesmas circunstâncias que os demais, no intuito de submeter todos os animais ao mesmo estresse.

3.2.3 Exodontia

Após as 3 semanas do início do protocolo medicamentoso com Zoledronato, os animais foram submetidos a sedação com Quetamina associada a Xilazina e com o auxílio de mesa de operação adaptada para manter a boca aberta, foi removida a ligadura de algodão. Na sequência, todos os animais foram submetidos a antissepsia oral com PVPI 10% (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto) para sindesmotomia dos tecidos adjacentes ao dente, luxação e, por fim, extração do primeiro molar inferior esquerdo. (Figura 3).

Figura 3 – (A) Procedimento de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. (B) Foto pós-imediata do alveólo a exodontia.



Fonte: Autor, 2023

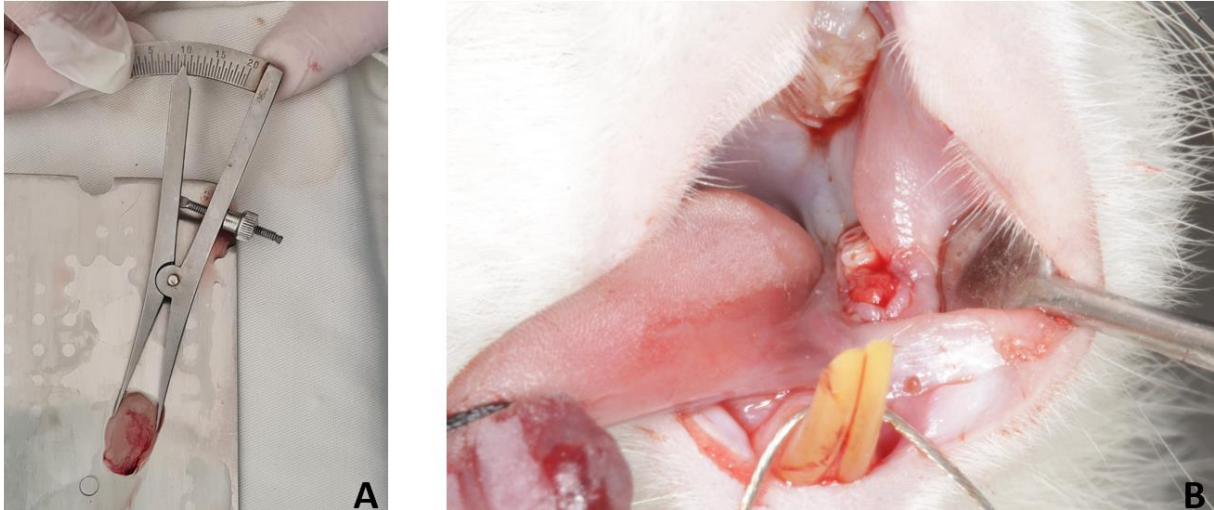
3.2.4 Coleta e terapia local com L-PRF

De acordo com o estudo de Awadeen et. al. (35) um animal aleatório foi eleito como doador de sangue com a finalidade de produção de matriz de L-PRF para os demais, como meio de reduzir o tempo cirúrgico e otimizar o experimento. Foi realizado neste animal as mesmas etapas experimentais, sem receber nenhum dos tratamentos locais, para reduzir o viés.

Para tal propósito, o animal foi imobilizado e com o auxílio de escalpe foi feita a punção cardíaca, a qual o operador coletará 10 ml de sangue com o auxílio de tubo de coleta sem anticoagulante. Em seguida, o segundo operador fez a programação da centrífuga (MONTSEERRAT®, modelo LC-04P, Jinta, Jiangsu, China – Equipamento adquirido por verba FAPESP pelo processo nº 2022/08298-8) em 3000 rpm por 10 minutos de acordo com o protocolo descrito por Choukroun et al (36). Imediatamente após a centrifugação foi possível diferenciar na parte inferior os glóbulos vermelhos, no terço médio o coágulo de PRF e na porção superior o plasma. Com cuidado o operador removeu o coágulo que foi apostado em kit para preparo de concentrados plasmáticos, sobre uma superfície e comprimido com o peso para obter a conformação de matriz.

Assim L-PRF foi introduzido no alvéolo pós-exodôntico das ratas do grupo **ZOL+L-PRF**, no pós-operatório imediato (dia 0).

Figura 4 – (A) Representação da conformação física de L-PRF após centrifugação e separação da porção de interesse. (B) Aspecto clínico pós- imediato a inserção de L-PRF no alvéolo.

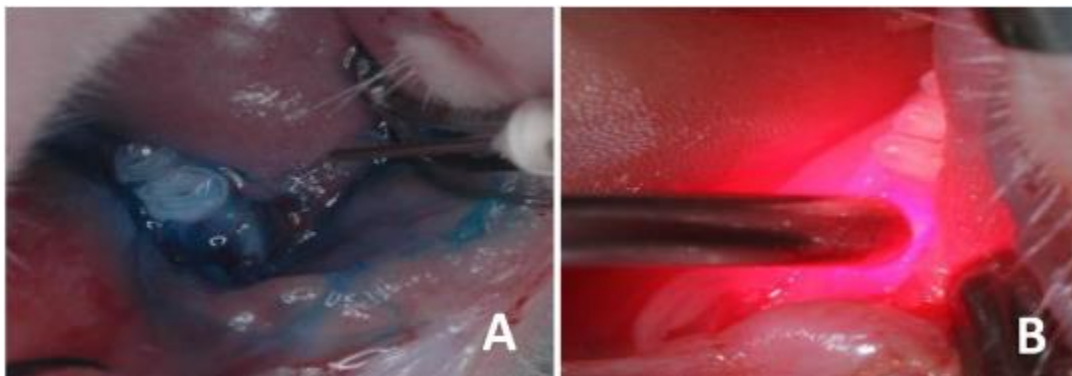


Fonte: Autor, 2023

3.2.5 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

As ratas pertencentes aos grupos **ZOL+aPDT** e **ZOL+OZN+aPDT** passaram por sessões de aplicação aPDT no alvéolo, após a exodontia, através da utilização de azul de metileno (100ug/ml) como substância fotossensibilizadora que foi mantida no local de extração durante 60 segundos e posteriormente, com o posicionamento da ponta do laser em um único ponto no centro do local de extração. Para a irradiação a laser de baixa potência foi utilizado um dispositivo a laser InGaAlP (600nm; Thera Lase®, DMC Equipamentos Ltda®, SP, Brasil) com spot de tamanho de 0,0283 cm², obedecendo aos seguintes parâmetros: potência de 35 mW; operação contínua; ponto de energia de 2,1 J/ ponto de 60s, densidade energia de 74,2 J/cm²; intensidade de potência de 1,23 W/cm². As aplicações ocorreram nos períodos de 0 (pós-operatório imediato), 2 e 4 dias. (11) (Figura 4)

Figura 5 – (A) Pré irradiação com azul de metileno (fotossensibilizador) no alvéolo vazio. (B) Irradiação com laser de baixa potência logo após, em região de alvéolo.

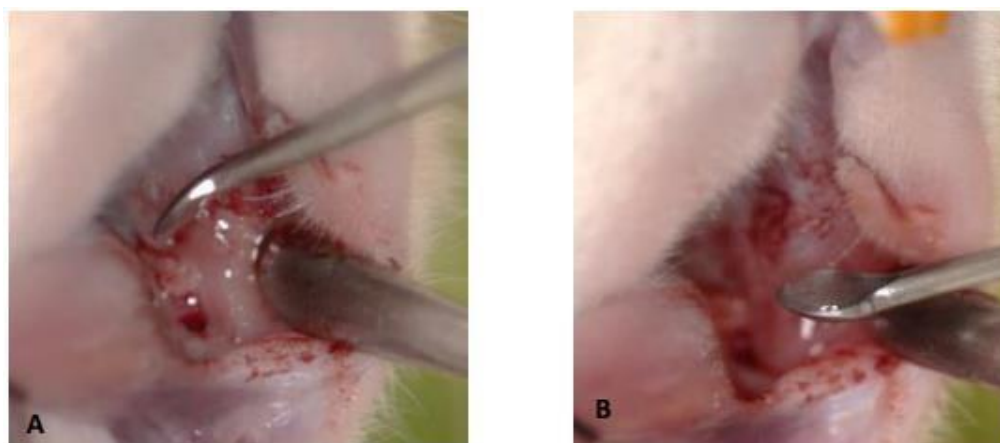


Fonte: Autor, 2023

3.2.6 Ozonioterapia local

As ratas pertencentes ao grupo **ZOL+OZN+aPDT** receberam aplicação de óleo de girassol ozonizado na concentração de 600 mEq/kg (“Dose Extra” farmácia de manipulação – Pelotas/Rio Grande do Sul-BR), em concentração de 0,3mg/kg através de seringa de 1ml com agulha 13mm x 0,38mm. As aplicações foram realizadas no alvéolo pós exodôntico durante 2 minutos, com a contenção dos animais, ocorrendo nos dias 0 (pós-operatório imediato), 2 e 4. (23,24)

Figura 6 – (A e B) Aplicação do óleo de girassol ozonizado em cureta de Molt no alvéolo pós-exodontico.



Fonte: Autor, 2023

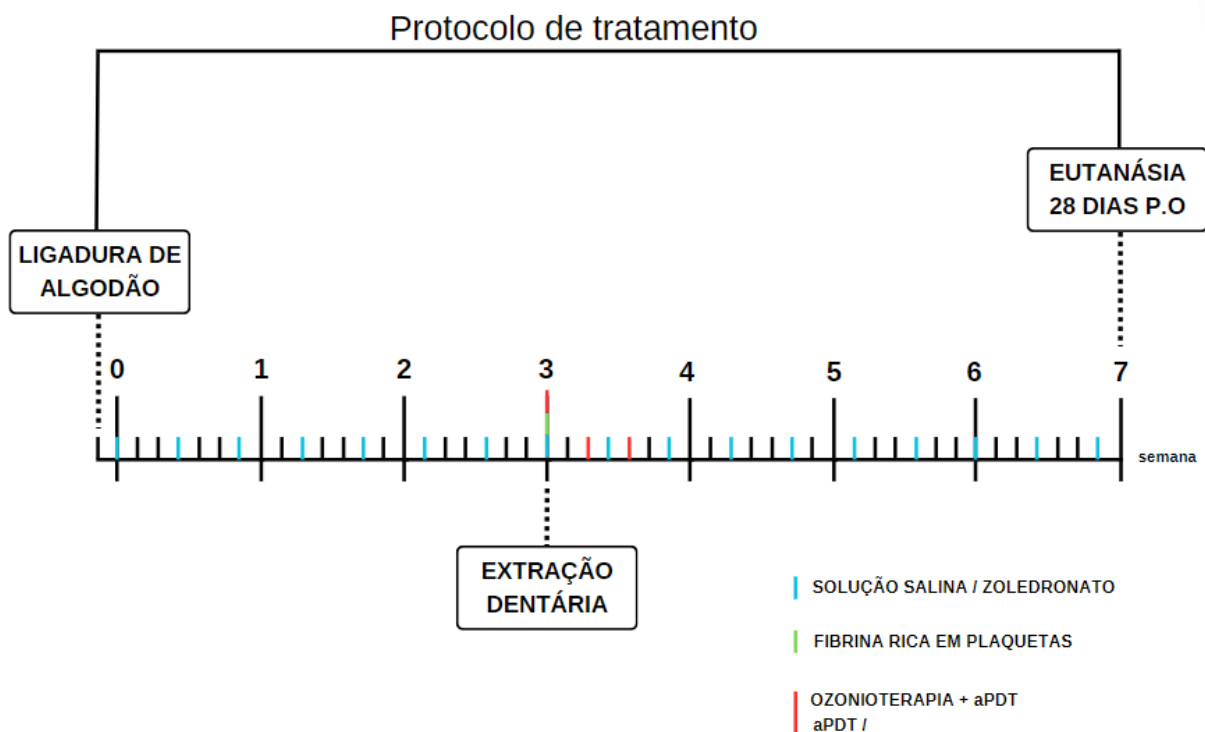
3.3 Eutanásia

Previamente ao procedimento de eutanásia, todos os animais foram fotografados para análise clínica através de câmera Nikon utilizando flash macro de 105 mm sempre pelo mesmo operador.

A eutanásia dos grupos experimentais **SAL, ZOL, ZOL+L-PRF, ZOL+APDT e ZOL+OZN+aPDT** ocorreu 4 semanas (28 dias) após a exodontia, totalizando 7 semanas (49 dias) desde o início do protocolo medicamentoso.

Por fim, o animal eleito como doador de sangue para produção de matriz de L-PRF foi eutanasiado ao fim de sua função. (Figura 4)

Figura 7 – Imagem representativa da cronologia das etapas experimentais



Fonte: Autor, 2023

Todos os procedimentos de eutanásia foram realizados por perfusão cardíaca, através da combinação de 100 ml de solução salina e 0,1% de heparina e 800ml de formaldeído 4% (Sigma Chemical®, St. Louis, MO, USA) em tampão fosfato-salino (PBS – Sigma Chemical®) 0.1 M, 4°C, pH 7.4 para fixação dos espécimes.

4 ANÁLISES

4.1 Análise clínica

Todos os espécimes coletados foram avaliados clinicamente, junto de registros fotográficos para identificar características como aspecto da mucosa, presença ou ausência de tecido reparador, coloração dos tecidos moles, exposição ou não de tecido ósseo, presença de sequestro ósseo, supuração ou quaisquer outros aspectos acerca do reparo.

4.2 Análises e processamento de tecidos moles

As peças ficaram no fixador até completar 48 horas, e após a fixação, foram submetidas a lavagem em água corrente por 12 horas, seguindo para desidratação numa sequência de álcoois (70 a 100%), realizando após estas etapas, a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina. Os blocos obtidos foram encaminhados ao micrótomo para obtenção de cortes com 5 μm de espessura para assim confeccionar as lâminas. Foram coletadas, de lingual para vestibular, as secções histológicas dos tecidos moles adjacentes ao alvéolo, sendo então analisados de maneira a padronizá-las e facilitar a identificação.

4.2.1 Análise microscópica e área microscópica de interesse (AMI)

A AMI foi determinada de acordo com a análise microscópica realizada, consistindo em uma área de 250 μm , situada no tecido conjuntivo que recobre o local da extração dentária. O limite da área foi determinado por uma linha localizada no centro do tecido conjuntivo, perpendicular ao longo eixo dos dentes e que divide esse tecido em sua direção coronoapical.

4.2.2 Análise histológica

Todas as análises foram realizadas por operador cego ao tratamento. Para a análise histológica foram avaliados três cortes histológicos localizados na porção vestibular, média e lingual do local da extração dentária.

Os parâmetros avaliados foram referentes a qualidade e quantidade de maturação do tecido mole e perfil inflamatório, incluindo contagem de células inflamatórias e vasos sanguíneos.

Para isso, as lâminas coradas em HE foram fotomicrografadas na região central do tecido mole formado sobre o alvéolo antes exposto, inicialmente em uma objetiva de 2.5x, que irá garantir uma visão ampla da região e permitirá a mensuração da área de neoformação tecidual, a partir do software Image J, por meio da ferramenta “Free hands”. Para observação da maturação do tecido mole, foram realizadas fotomicrografias em uma objetiva de 40x. Já para a avaliação do perfil inflamatório, com ênfase em contagem de linfócitos e contagem de número de vasos sanguíneos, para cada amostra foram realizadas três fotomicrografias em objetivas de 100x, em diferentes regiões do defeito. Em seguida, no software Image J, foram utilizadas as ferramentas “Grid” e “Cell Counter Notice”, para localização e contagem propriamente dita das estruturas mencionadas.

4.2.3 Análise histológica: Picrossírius Red (PSR)

Para análise por PSR, as áreas de interesse foram removidas e, posteriormente, incluídas em parafina para serem cortadas em micrótomo (Leica – Biosystems® RM 2245, Nussloch, Alemanha), com 5 µm de espessura, sendo esses cortes acoplados em duas lâminas, com três cortes cada. Essas lâminas foram submetidas à coloração pela técnica de PSR para análise da maturação das fibras colágenas, assim seus níveis de maturação foram analisados sob microscopia de luz polarizada, utilizando o programa LAS (Leica LAS 4.12, Leica Microsystems), o que permite a seleção de cores correspondentes para cada tipo de fibra de colágeno do tecido conjuntivo com fibras amarelas esverdeadas consideradas imaturas e finas, enquanto fibras vermelhas amareladas consideradas maduras e grossas. Em sequência a seleção da cor, o programa calculou automaticamente a área marcada para cada tipo de fibra (37).

4.3 Análise dos dados

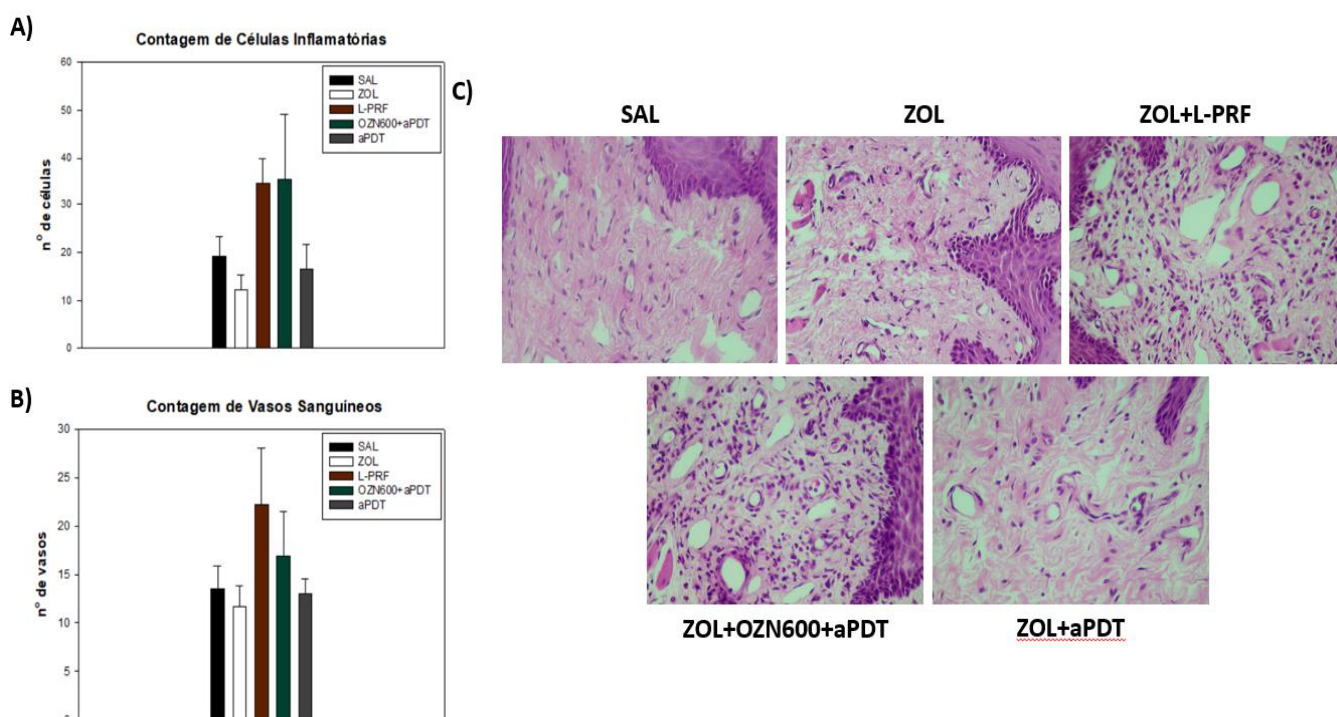
Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos que foram obtidos, foi abordada a diferença entre os grupos experimentais (**SAL; ZOL; ZOL+L-PRF; ZOL+aPDT, ZOL+OZN+aPDT**). Todos os dados foram submetidos à curva de normalidade – teste de Shapiro-Wilk com nível de significância de 0,05 para todos os testes. Portanto, diante da homogeneidade ou heterogeneidade dos dados, um teste paramétrico ou não paramétrico foi aplicado. O programa estatístico utilizado foi o SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica

Como resultado da contagem de células inflamatórias na coloração em HE, foi evidenciado uma baixa quantidade de infiltrado inflamatório nos grupos **SAL**, **ZOL**, **ZOL+aPDT** em relação aos grupos **ZOL+L-PRF** e **ZOL+OZN+aPDT** que apresentam perfis inflamatórios equivalentes, com mais células imunológicas presentes (Figura 6). Entretanto, em relação a contagem de vasos sanguíneos, no grupo **ZOL+L-PRF**, observa-se uma maior quantidade quando comparado aos demais (Figura 6).

Figura 8 – Imagens representativas da análise histológica de células inflamatórias e vasos sanguíneos. (A) Representação gráfica dos valores de células inflamatórias. (B) Representação gráfica do número de vasos sanguíneos (C) Fotomicrografias das células inflamatórias e vasos sanguíneos de acordo com os tratamentos.

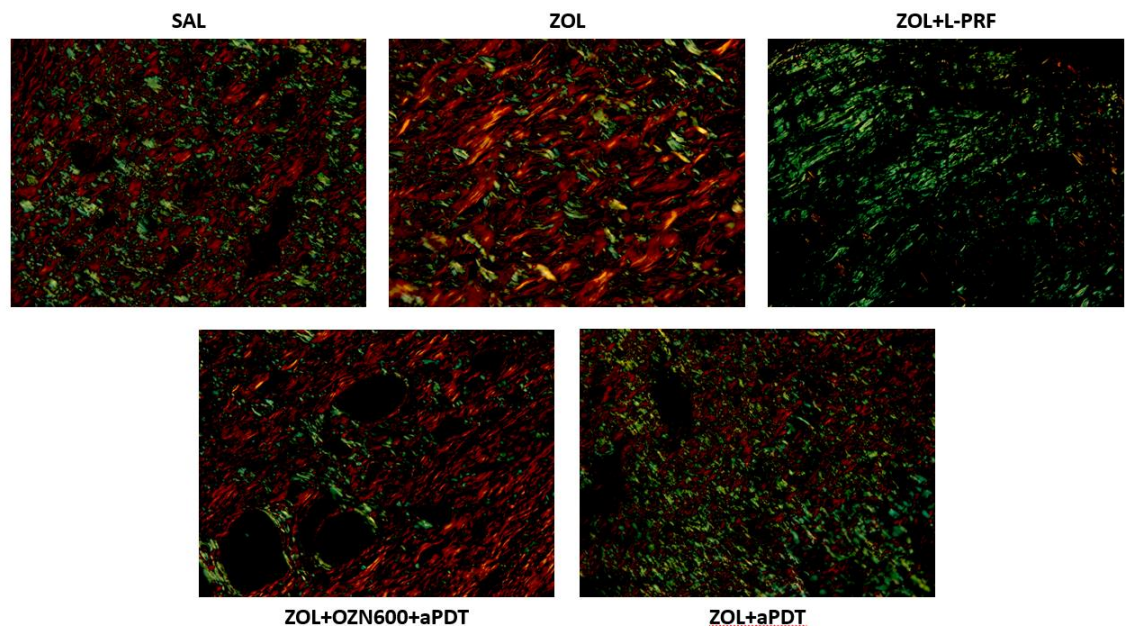


Fonte: Autor, 2023

5.2 Análise por Picrosírius Red

Uma análise qualitativa da maturação das fibras colágenas foi realizada em PSR (figura 7). Nos grupos SAL, ZOL, ZOL+aPDT e ZOL+OZN+aPDT, observou-se uma predominância de fibras colágenas maduras. Em contraste, o grupo ZOL+L-PRF apresentou uma quantidade maior de fibras colágenas imaturas em comparação com as maduras.

Figura 9 – Imagens representativas da coloração PSR para identificar a maturidade das fibras colágenas. Fotomicrografias das fibras colágenas presentes de acordo com os tratamentos



Fonte: Autor, 2023

6 DISCUSSÃO

Embora a incidência de MRONJ seja relativamente rara, a prevenção e detecção precoce na região dento-maxilo-facial é de grande importância devido à perda de qualidade de vida nas pessoas afetadas (1,9). Atualmente, já existem hipóteses na literatura de que MRONJ ocorre de “fora para dentro”, ou seja, inicia-se nos tecidos moles da boca, devido a feridas na mucosa (10). Essa hipótese é sustentada em consequência de medicamentos antirreabsortivos como os BFs, usados a longo prazo, causarem disfunções nas GMSCs e nas vias de sinalização TGF-beta e VEGF, retardando assim o processo de cicatrização, deixando a superfície óssea, em caso de traumas, exposta a infecções, sugerindo que o fechamento primário dos tecidos moles lesados reduza efetivamente a ocorrência de MRONJ (9,12,13).

Os resultados que temos obtidos no nosso grupo de pesquisa e ainda não publicados tem mostrado que as terapias locais antimicrobianas e biomodulatórias tem um importante potencial na interrupção e prosseguimento da MRONJ na reparação óssea alveolar. Tendo em vista que o processo laboratorial de desmineralização do tecido ósseo provoca alterações deletérias aos tecidos moles gengivais de recobrimento, sendo a análise destes tecidos também fundamental, e assim acreditamos na necessidade desta investigação pré-clínica. Nesse contexto, o presente estudo *in vivo*, realizado em ratas senescentes medicadas com zoledronato, mimetizando uma condição clínica capaz de aumentar consideravelmente as chances de desencadear MRONJ, buscou a terapia local mais adequada como estratégia para tratar e prevenir essa doença, através do reparo tecidual da gengiva.

Como alternativa ao tratamento de osteonecrose a aPDT ganhou espaço por efeito de sua vantajosa ação antimicrobiana, por não acarretar na resistência de micro-organismos e nem apresentar efeitos adversos, em relação a antibióticoterapia, além de apresentar eficaz reparo tecidual e modulação da resposta inflamatória (11,16). Essa estratégia torna-se ainda mais promissora em função da facilidade de execução e não ser invasiva (11).

No presente estudo foi utilizado o mesmo protocolo de Ervolino *et al.* (11) para o tratamento supramencionado, evidenciando sua ação anti-inflamatória, visto

que foi observado uma contagem de células inflamatórias diminuta em relação aos demais grupos, com exceção do grupo ZOL. Apesar dessas evidências, não foi revelada grande ação angiogênica ao analisar a quantidade de vasos formados, caracterizando um reparo inexpressivo. No entanto, quando a aPDT foi associada com a ozonioterapia em solução oleosa, demonstrou não só uma maior quantificação de vasos sanguíneos, como a expressão de células imunológicas aumentada, indicando um efeito sinérgico da co-aplicação dessas terapias.

Esses dados corroboram com Ripamonti et al. (21) e Lim et al. (26) que descrevem o óleo ozonizado como um recurso terapêutico simples, seguro e eficaz, capaz de liberar ROS, que além de atuarem na morte de patógenos, induzem neovascularização e impulsionam a migração das células de defesa e células endoteliais, promovendo reepitelização de feridas.

Já bem elucidado na literatura o L-PRF, possui utilidade tanto na odontologia quanto na medicina, em virtude da liberação de fatores de crescimento, já mencionados, responsáveis por acelerar a regeneração de tecidos adicionado a alta representação de leucócitos que induzem a resposta imune prevenindo infecções (27,25,38). Tais aplicações foram observadas no presente estudo, pois foi o grupo que apresentou maior concentração de células do sistema de defesa e quantificação de vasos sanguíneos. Para mais, de acordo com Jamalpour et al., essa estratégia autóloga apresenta propriedades regenerativas persistentes, evidenciada pela análise de luz polarizada, sendo o único grupo a apresentar maior expressão de fibras colágenas imaturas em relação as maduras, contrastando com os demais grupos (37,39).

Vários fatores podem limitar os resultados e influenciar o prognóstico da MRONJ, e estudos ainda precisam ser realizados sobre esse assunto. No entanto, os dados do presente estudo, demonstraram que mesmo a associação ente aPDT e óleo ozonizado sendo promissora, a abordagem terapêutica com L-PRF se faz mais confiável para promover a reparação gengival em pacientes com da MRONJ, o que continua sendo um grande desafio para os cirurgiões bucomaxilofaciais.

7 CONCLUSÃO

A terapia com L-PRF se mostrou mais eficaz para promover cicatrização gengival em ratas senescentes que foram medicadas com zoledronato, confirmando seu potencial como uma abordagem terapêutica segura nos desafios da MRONJ.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Wang Z, Xu J, Wan J, Zhang W, Wang Y, Du Y. Vascular analysis of soft tissues around the bone lesion in osteoradionecrosis, medication-related osteonecrosis, and infectious osteomyelitis of the jaw. *J Craniofac Surg.* 2022;33(7):e750-4.
3. Leonardi N, Gilligan G, Piemonte E, Panico R. Alternativas terapéuticas de osteonecrosis maxilar asociada a medicamentos (ONMAM): reportes de dos casos clínicos y revisión de la literatura. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 2022;79(4):379-82.
4. Silva MC, Pavelski MD, Delanora LA, Lima Neto TJ, Santos AMS, Barbosa S, et al. Sequestrectomy as a treatment for drug-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) after installation of dental implants – Case report. *Res Soc Dev.* 2021;10(12):e362101220331.
5. França TRT, Ramos-Perez FMM, Pontual AA, Castro JFL, Bonan PRF, Perez DEC. Effects of zoledronic acid in experimental periapical lesions in rats: an imaging and histological analysis. *Braz Dent J.* 2017;28(5):566-72.
6. Basso FG, Pansani TN, Cardoso LM, Hebling J, Real RPV, Costa CAS. Influence of bisphosphonates on the behavior of osteoblasts seeded onto titanium discs. *Braz Dent J.* 2020;31(3):304-9.
7. Brozoski MA, Traina AA, Deboni MCZ, Marques MM, Naclério-Homem MG. Osteonecrose maxilar associada ao uso de bisfosfonatos. *Rev Bras Reumatol.* 2012; 52(2):265-70.
8. Heimes D, Mark NA, Kuchen R, Pabst A, Becker P, Kyyak S, et al. Evaluation of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ) in terms of staging and treatment strategies by dental students at different educational levels. *Medicina.* 2023;59(2):252.

9. Li M, Wang J, Yu Y, Zhou Y, Shi Y, Zhang W, et al. Characterization of mesenchymal stem cells derived from bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw patients' gingiva. *Stem Cell Rev and Rep* 2022;18(1):378–94.
10. 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 Biol.* 2018;184:7-17.
11. 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.
12. Zheng Y, Dong X, Chen S, He Y, An J, Liu M, et al. Low-level laser therapy prevents medication-related osteonecrosis of the jaw-like lesions via IL-1RA-mediated primary gingival wound healing. *BMC Oral Health.* 2023;23(1):14.
13. Toro LF, Mello-Neto JM, Santos FFV, Ferreira LC, Statkiewicz C, Cintra LTÂ, et al. Application of autologous platelet-rich plasma on tooth extraction site prevents occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws in rats. *Sc Rep.* 2019;9(1):1-15.
14. Ngeow WC, Tan CC, Goh YC, Deliberador TM, Cheah CW. A narrative review on means to promote oxygenation and angiogenesis in oral wound healing. *Bioengineering.* 2022;9(11):636.
15. 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, *Photodiagn Photodyn Ther.* 2022;2022:103172.
16. Menezes IL, Sales JM, Targino MLM, Vasconcelos RG, Marinho SA. Terapia fotodinâmica no tratamento de osteonecrose mandibular por bisfosfonatos: uma revisão. *Braz J Health Rev.* 2021;4(1):2652–65.
17. Yoshinari FM. Influence of photodynamic therapy in the control of postoperative pain in endodontic treatment: a cross-sectional randomized clinical trial. *Pesqui Bras Odontopediatria Clín Integr.* 2019;19:e4369.

18. Momesso GAC, Lemos CAA, Santiago-Júnior JF, Faverani LP, Pellizzer EP. Laser surgery in management of medication-related osteonecrosis of the jaws: a meta-analysis. *Oral Maxillofac Surg.* 2020;24(2):133-44.
19. Ugazio E, Tullio V, Binello A, Tagliapietra S, Dosio F. Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. *Molecules.* 2020;25(2):334.
2014;43(6):777-83.
20. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res.* 2006;37(4):425-35.
21. Ripamonti CI, Cislighi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O₃) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: preliminary results of a phase I–II study. *Oral Oncol.* 2011;47(3):185-90.
22. Toker AH. The effects of allograft combined with ozone therapy on regeneration of calvarial defects in rats. *Cumhuriyet Dent J.* 2017;19(3):205-13.
23. Xiao W, Tang H, Wu M, Liao Y, Li K, Li L, et al. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Biosc Rep.* 2017;37(6):BSR20170658.
24. Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M, Bassorgun I, Ozler M, Oter S, et al. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolarbone healing following tooth extraction in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014;43(6):777-83.
25. Monteiro C, Vieira E, Emerick C, Azevedo R, Pascoal V, Homsí N, et al. Ozonated oil effect for prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in rats undergoing zoledronic acid therapy. *Clin Oral Investig.* 2021;25(12):6653-9.
26. Lim Y, Lee H, Woodby B, Valacchi G. Ozonated oils and cutaneous wound healing. *Current Pharmaceutical Design.* 2019;25(20):2264-78.

27. Fortunato L, Bennardo F, Buffone C, Giudice A. Is the application of platelet concentrates effective in the prevention and treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw? A systematic review. *J Craniomaxillofac Surg.* 2020;48(3):268-85.
28. Szentpeteri S, Schmidt L, Restar L, Csaki G, Szabo G, Vaszilko M. The effect of platelet-rich fibrin membrane in surgical therapy of medication-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Maxillofac Surg.* 2020;78(5):738-48.
29. Steller D, Herbst N, Pries R, Juhl D, Hakim SG. Positive impact of Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin on viability, migration and proliferation of osteoblasts and fibroblasts treated with zoledronic acid. *Sci Rep.* 2019;9(1):8310.
30. Costa KL, Santos MV, Santos MDS. Fibrin rich in platelets and leukocytes-L-PRF- in dentistry: literature review. *Res Soc Dev.* 2021;10(11):e332101119473.
31. Shirbhate U, Bajaj P. Third-generation platelet concentrates in periodontal regeneration: gaining ground in the field of regeneration. *Cureus.* 2022;14(8):e28072.
32. Alranyes Y, Aloraini S, Alkhalaf A, Aljasser R. Soft-tissue healing assessment after extraction and socket preservation using platelet-rich fibrin (prf) in smokers: a single-blinded, randomized, controlled clinical trial. *Diagnostics.* 2022;12(10):2403.
33. Pall E, Roman A, Olah D, Beteg FI, Cenariu M, Spînu M. Enhanced bioactive potential of functionalized injectable platelet-rich plasma. *Molecules.* 2023;28(4):1943.
34. Parise GK, Costa BN, Nogueira ML, Sassi LM, Schussel JL. Efficacy of fibrin-rich platelets and leukocytes (L-PRF) in tissue repair in surgical oral procedures in patients using zoledronic acid-case-control study. *Oral Maxillofac Surg.* 2023;27(3):507-12.
35. Awadeen MA, Al-Belasy FA, Ameen LE, Helal ME, Grawish ME. Early therapeutic effect of platelet-rich fibrin combined with allogeneic bone marrow-derived stem cells on rats' critical-sized mandibular defects. *World J Stem Cells.* 2020;12(1):55-69.
36. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical

effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontol.* 2006;101(3):e56-60.

37. Oliveira PHC, Gomes Filho JE, Rodrigues MJ, Silva CC, Cardoso CB, Silva LC, et al. Influence of supplement administration of omega-3 on the subcutaneous tissue response of endodontic sealers in Wistar rats. *Int End J.* 2022;55:1026–41.

38. Scribante A, Ghizzoni M, Pellegrini M, Pulicari F, Spadari F. Laser devices and autologous platelet concentrates in prevention and treatment of medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. *Medicina.* 2023;59(5):972.

39. Jamalpour MR, Shahabi S, Baghestani M, Shokri A, Jamshidi S, Khazaei S. Complementarity of surgical therapy, photobiomodulation, A-PRF and L-PRF for management of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): an animal study. *BMC Oral Health.* 2022;22(1):241.