



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba



GUSTAVO RIBEIRO FERREIRA

**Efeito da pentoxifilina e tocoferol no tratamento de
osteonecrose dos maxilares após a exodontia em ratas
ovariectomizadas e tratadas com medicação
antirreabsortiva**

Araçatuba - SP
2024

GUSTAVO RIBEIRO FERREIRA

**Efeito da pentoxifilina e tocoferol no tratamento de
osteonecrose dos maxilares após a exodontia em ratas
ovariectomizadas e tratadas com medicação
antirreabsortiva**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a graduação no curso de Odontologia.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani

A Andréia Magalhães Ribeiro, minha mãe, a Emilly Ribeiro Ferreira, minha irmã, ao Christian Carlos Cardoso Ferreira, meu pai, e a Ana de Magalhães Ribeiro, minha avó, as pessoas que mais estiveram presentes e me apoiaram durante toda essa aventura, essa vitória não é somente minha, mas nossa. Obrigado por tudo, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, aquele que nunca me desamparou e sempre se fez presente junto a mim em todos os momentos, desde aqueles de grande alegria até os de maior dificuldade e tristeza, sempre me protegendo, cuidando e confortando. Me sinto extremamente abençoado por permitir que eu tenha vivido tudo isso da maneira exata como tinha que ser, com tanta intensidade, aprendizado e carinho. Sem a presença dele em minha vida eu definitivamente não teria chegado até aqui.

A **minha mãe**, Andréia Magalhães Ribeiro, a pessoa que mais me inspira em todo o mundo e a responsável por tudo que sou hoje, serei eternamente grato pelo privilégio de ser seu filho, por todo amor, zelo, respeito e educação com que me criou, e por sempre ser um exemplo de humildade, empatia e gentileza para mim, é pela minha mãe que eu tento ser melhor a cada dia, e a finalização desse ciclo é inteiramente a ela e graças a todo seu esforço para que eu conseguisse estudar e me formar, você é meu maior amor; e a **minha irmã**, Emily Ribeiro Ferreira, minha maior companheira e amiga desde os meus 4 anos, aquela que mais sofreu com minha vinda para Araçatuba, mas que nunca deixou de me apoiar, de mostrar seu amor por mim e de sempre mandar fotos aleatórias dela, da minha mãe ou até dos nossos pets para me ajudar com a saudade, ter alguém como ela que divide a vida comigo desde os seus primeiros passos é um dos meus maiores privilégios; vocês são as maiores apoiadoras desse sonho e tudo isso foi por vocês, minha vida e nada disso teria sentido sem minha mãe e minha irmã, obrigado por me lembrarem que eu sempre terei um lar para onde voltar.

Ao **meu Pai**, Christian Carlos Cardoso Ferreira, por sempre acreditar no meu potencial e sempre fazer questão de mostrar o quanto se orgulha de mim todos os dias, serei para sempre grato por tudo que fez e faz por mim e pela minha educação e criação, quem sou hoje é graças a ele.

Aos **meus avós** maternos, Ana de Magalhães Ribeiro e Claudiner Pedro Ribeiro (*in memoriam*), minha avó que sempre me ensinou sobre determinação, respeito, e carinho com o próximo, grato por todo amor que recebo dela e pelos bolos que ela fez todas as vezes que retornei para casa,

meu avô, que perdi em abril de 2023, mas sempre vai estar presente em mim e em minhas memórias, gratidão por ele ter construído essa família e ser a base de todo amor e respeito que existe nela, isso também é para ele; e, aos meus avós paternos, Célia de Fátima Cardoso Ferreira e José Carlos Cardoso Ferreira, estes que são meus padrinhos, por sempre incentivarem a seguir meu sonho e jamais desistir dele, eu reconheço e jamais me esquecerei de toda ajuda que recebi deles, tanto financeira quanto afetiva, e independente de qual for a dificuldade, sei que posso contar com eles, assim como foram nesses cinco anos que se passaram.

Aos **meus tios e tias**, em especial Ademilson Magalhães Ribeiro e Luci Guerra Ribeiro, estes que desde o vestibular nunca duvidaram de mim e acreditavam no meu potencial, me ajudaram com a mudança para Araçatuba e sempre deram suporte aos meus pais, a gratidão é imensa por sempre se preocuparem e cuidarem de mim; Aos **meus primos e primas**, especialmente Fabiana Guerra Ribeiro, a primeira pessoa da minha família a ter um título de mestre, ela que apoiou e apoia todos os meus sonhos desde que eu nasci vai ser para sempre uma inspiração para mim, seja em âmbito acadêmico como pessoal, de força, dedicação e resiliência, saber que ela se orgulha dos meus passos e de quem estou me tornando é importante e especial demais para mim.

A **toda minha família e amigos**, que deixei em Paraguaçu Paulista, estes que se mantiveram presentes em minha vida durante esses anos mesmo com a distância entre as cidades ou a falta de tempo para dar a devida atenção que mereciam, só tenho a agradecer por nunca se esquecerem de mim e principalmente, por entenderem todas as vezes que não estive presente, abdicando de momentos para seguir com meus sonhos, muito obrigado, eu amo vocês!

Ao **meu orientador, “Prof. Leo”, Professor Associado Doutor Leonardo Perez Faverani**, o qual tive a honra de conhecer no final de 2019, quando apresentei meu primeiro trabalho em um congresso da universidade, o 11º CIRPAC (Círculo de Palestras a Comunidade “Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira”), onde tive a excepcional surpresa de ser premiado em 1º lugar na

categoria pôster/painel e com isso, a oportunidade de conversar com o Professor Leo, que desde o primeiro momento sempre se mostrou muito empático e solidário comigo, lembro que o professor me convidou para conhecer o departamento e os trabalhos do seu grupo de pesquisa, convite que me fez ficar extremamente feliz e orgulhoso, pois o sonho da iniciação científica já existia em mim. Infelizmente em 2020 vivemos a pandemia, as atividades presenciais pararam e sendo assim, acabei não entrando na iniciação científica logo no meu 2º ano de graduação, entretanto, em 2021 com a volta gradativa das aulas presenciais entrei em contato com o professor e ele me recebeu de braços abertos, foi então quando dei início às atividades em seu grupo de pesquisa “*Faverani’s Team*”, grupo este que eu não fazia ideia de todas as oportunidades que iria me proporcionar. Em 2022 tive a chance de ter a minha tão sonhada primeira bolsa de iniciação científica, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo: 2021/14913-4), com o projeto de pesquisa intitulado “Efeito da pentoxifilina e tocoferol no tratamento de osteonecrose dos maxilares após a exodontia em ratas ovariectomizadas e tratadas com medicação antirreabsortiva”, que hoje é meu trabalho de conclusão de curso. Após a finalização da pesquisa permaneci no grupo do professor e quando achei que não fosse mais possível, “Prof. Leo” me concede mais uma grande oportunidade, minha segunda e atual bolsa de iniciação científica, também pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo: 2023/16726-2), projeto intitulado “Análise reparacional de enxertos tridimensionais impressos no "gap" criado após osteotomia modificada em maxila de coelhos”. Após esses três anos trabalhando com o professor pude perceber o quão excelente profissional ele é, uma verdadeira inspiração para mim e creio que se um dia eu for metade do cirurgião que ele é, eu estarei completamente feliz, mas o professor Leo não me ensinou apenas sobre cirurgia, trauma, pesquisa ou osteonecrose, me ensinou sobre benevolência, humildade e empatia, todas estas características que ele possui. Dito isso, fica aqui minha enorme gratidão por todas as oportunidades que me proporcionou, os ensinamentos que me passou, e por toda paciência, gentileza, suporte e principalmente, por acreditar e confiar em mim, isso sempre me motivou, obrigado “Prof. Leo”.

À **“Profª. Ana”**, **Professora Associada Doutora Ana Paula Farnezi Bassi**, a qual eu admiro demais e tive o privilégio de não aprender apenas sobre a Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, mas também sobre determinação, foco e respeito aos pacientes. Lembro quando conheci a professora Ana no departamento de Diagnóstico e Cirurgia, muito antes de ter a primeira aula com ela na graduação, e posso com toda certeza afirmar que após todo esse período de contato com a professora na graduação, no departamento, conhecendo um pouco sobre sua pessoa e trajetória, minha admiração pela mesma só cresce, “Prof. Ana” é definitivamente uma grande inspiração na área da Cirurgia Bucomaxilofacial e só tenho a agradecer pela oportunidade de conhecê-la e poder tê-la como professora.

À **“Profª. Adriana”**, **Professora Associada Doutora Adriana Cristina Zavanelli**, a qual foi uma honra e enorme alegria conhecer, me lembro do primeiro dia no laboratório de Prótese Parcial Fixa quando descobri que ficaria em sua ala, e desde então meu carinho e admiração pela “Profª. Adriana” só aumentaram, ela é do tipo de pessoa que todos querem por perto, sempre alegre, divertida e nos ensinando muito sobre prótese e sobre a vida. Serei eternamente grato por toda sua paciência, cuidado, atenção e por nunca me desamparar nas clínicas, a senhora é “chiquérrima” e especial para mim.

Ao **“Prof. Edilson”**, **Professor Associado Doutor Edilson Ervolino**, o qual sempre esteve presente e tive a honra de ser auxiliado durante o desenvolvimento da pesquisa, além de ser um pesquisador e professor excepcional, deixo aqui minha admiração e gratidão a ele, por toda ajuda e aprendizado que me proporcionou durante a realização e interpretação das análises histológicas.

À **minha companheira oficial e “chefe” do projeto de pesquisa, Mirela Caroline Silva**, a qual devo tudo que aprendi com este trabalho e por ele de fato ter sido realizado, sem a Mirela presente comigo em cada etapa, me auxiliando, supervisionando e guiando nada desta pesquisa teria sido feito com a excelência que foi. Muito obrigado Mi, por toda paciência, companheirismo e memórias criadas durante essa aventura, você me inspira e me orgulha demais com sua trajetória.

À “**Sté**”, **Stefany Barbosa**, a pessoa cuja qual confiei para realizar a exodontia dos meus quatro terceiros molares, que foi excepcional por sinal, ela que é doutoranda do grupo de pesquisa, uma cirurgiã excelente e uma pessoa incrível, nunca medindo esforços para ajudar ou ensinar quem quer que seja, sou e sempre serei muito grato a ela por todo aprendizado e gentileza que sempre me proporcionou todas as vezes que estávamos juntos.

A **todo o grupo de pesquisa “Faverani’s Team”**, desde os pós-graduandos: Tiburtino José de Lima Neto, Anderson Maikon de Souza Santos, Leonardo Alan Delanora, Barbara Ribeiro Rios, Eduardo Dallazen, João Matheus Fonseca e Santos, Stéfany Barbosa, Mirela Caroline Silva e Monique Gonçalves da Costa, até os alunos da iniciação científica: Maria Eloise Simon, Gabriela Cristina Baccaro, Natália Pereira Ribeiro, Victor Perinazzo Sachi, Mileni Buzo Souza, Rafaela Sandro Staque e Franciele da Silva Flores, estes que foram essenciais para que o projeto de pesquisa fosse realizado. Ademais, reitero que nesta equipe foi onde aprendi tudo o que sei sobre a área acadêmica, a pesquisa e a como produzir ciência, e por isso meus mais sinceros agradecimentos a todos que sempre me receberam de braços abertos e nunca mediram esforços para me ensinar, acredito que seja este o motivo de tanto orgulho em fazer parte do “*Faverani’s Team*”.

À “**Gi Zeine**”, **Giovana Maria Zeine dos Santos**, meu maior e melhor presente que a universidade poderia me dar, me lembro do nosso primeiro encontro, no primeiro dia de aula em 2019, os dois completamente perdidos, mas desde aquele momento tivemos uma conexão inexplicável, era como se já fôssemos amigos de longa data, o que hoje posso dizer que é verdade. Sem a presença da “Gi” durante esses cinco anos, minha história na universidade não teria sido a mesma, ela foi minha companheira para tudo, estando em momentos de risadas, diversão, estudos, angústias, mais estudos, tristeza, e continua sendo até hoje. Eu ganhei uma irmã mais velha em Araçatuba e agradeço a Deus todos os dias por ter sido você, obrigado por dividir a vida, o apartamento (153), os atendimentos em dupla de quase todas as disciplinas, e principalmente por tantas recordações comigo, viver sem você por perto vai ser uma tarefa difícil, mas entendo que o tempo que passamos juntos foi só o

começo de tudo que ainda vamos viver, até porque você é família e família é para sempre.

A **todas as minhas amigas da graduação**, Paula Rebeca Rodrigues, a qual é uma das pessoas mais doces, gentis e maduras que conheci na graduação, obrigado “Beca” pelas memórias, histórias juntos, e por sempre se preocupar e cuidar de mim, você é o tipo de amiga que todos mereciam ter e eu sou afortunado com isto; à Mileni Buzo Souza, minha oficial dupla da iniciação científica, ela que sempre me apoiou, ajudou, incentivou e comemorou minhas vitórias, grato demais “Mimi” por todo companheirismo e amizade que construímos juntos, saber que eu tinha você em momentos de dificuldade e angústia deixava tudo mais leve; à Giovanna Lima Fortunato, que estive comigo desde 2019 quando éramos vizinhos de apartamento e hoje divide o lar comigo, sendo minha vizinha de quarto, gratidão “Gigi” pelo carinho que sempre teve comigo, pelas mais sinceras conversas em frente a porta dos quartos e por cada momento que tivemos juntos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da minha primeira bolsa de iniciação científica (Processo: 2021/14913-4), cuja qual é a responsável pelo presente trabalho de conclusão de curso e foi fundamental para o desenvolvimento do mesmo, para meu aprendizado, presença e apresentações em alguns congressos brasileiros, e também para que eu me mantivesse como aluno de graduação na universidade, além disso, pela concessão e incrível oportunidade da minha segunda e atual bolsa de iniciação científica (Processo: 2023/16726-2).

À **FINEP e ao MUBIO (01.12.0530.00 - Finep/ProInfra (01/2011))**, pela disponibilização do aparelho e realização das análises de Microtomografia Computadorizada (Micro-CT), que foram feitas com tanta excelência e de grande importância para este estudo.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA**, a qual foi minha casa por cinco anos e meio e tenho um orgulho imenso de tê-la em minha história e currículo, eu não poderia pedir instituição melhor para minha graduação do que esta, constituída com os melhores professores/pesquisadores da odontologia brasileira e contendo uma

infraestrutura de ponta e única com os laboratórios multidisciplinares e o complexo de clínicas odontológicas, características estas que contribuíram diretamente para que eu desfrutasse de uma formação teórico-prática de excelência. Por fim, gostaria de agradecer aos funcionários, servidores e professores da FOA, todos foram essenciais, colaborando para minha formação e de tantos outros alunos que se graduam todos os anos.

“Nada é tão nosso como os nossos sonhos.”

Friedrich Nietzsche

FERREIRA, G. R. **Efeito da pentoxifilina e tocoferol no tratamento de osteonecrose dos maxilares após a exodontia em ratas ovariectomizadas e tratadas com medicação antirreabsortiva.** 2024. 52 f. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

RESUMO

A osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (MRONJ) é uma condição que apresenta patogênese ainda não totalmente esclarecida e, por isso, não há um protocolo de tratamento bem definido. Nesse sentido, terapias medicamentosas como a associação de Pentoxifilina e Tocoferol tem sido alvo de poucos estudos e parecem apresentar o potencial de otimizar o reparo tecidual, porém sem qualquer consenso clínico ou análise das respostas biológicas frente as suas aplicações. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da Pentoxifilina e Tocoferol associados ou administrados isoladamente, na prevenção e tratamento de osteonecrose dos maxilares após a exodontia em ratas ovariectomizadas tratadas com Zoledronato. Para tanto, 40 ratas (12 meses) foram divididas em 5 grupos experimentais (n=5). No grupo VEI as ratas foram submetidas a administração de solução de cloreto de sódio 0,9% e o grupo ZOL receberam administração de Zoledronato 100µg/kg, ambos a cada 3 dias durante 7 semanas; o grupo ZOL+PENTO recebeu administração de Zoledronato seguindo o mesmo protocolo e 50mg/kg/dia de Pentoxifilina diariamente, via gavagem; o grupo ZOL+TOCO recebeu aplicação de Zoledronato no mesmo protocolo e de 80mg/kg/dia de Tocoferol diariamente, via gavagem; e, por fim, o grupo ZOL+PENTO+TOCO que recebeu aplicação de Zoledronato e as terapias de Pentoxifilina e Tocoferol seguindo os mesmos protocolos, todos após a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. A eutanásia foi realizada na sétima semana de experimento, 28 dias após a exodontia. A microCT evidenciou maior porosidade nos grupos que receberam terapia com Pentoxifilina e Tocoferol associados ou de forma isolados ($p<0,05$). A histometria mostrou maior porcentagem de osso não vital para o grupo ZOL em comparação aos grupos de terapia ($p<0,05$) e maior tecido ósseo vital no grupo VEI enquanto as terapias não diferiram entre si. Na histologia, as terapias apresentaram osteócitos na matriz extracelular do osso em formação.

E na avaliação clínica, no momento da eutanásia, as terapias utilizadas mostraram regiões de alvéolo com ausência de exposição de tecido ósseo necrótico e sinais de infecção. Dessa forma, pode-se inferir que o uso do protocolo de Pentoxifilina e Tocoferol, associados ou não, pode ser realizado para manutenção e melhora na qualidade tecidual de pacientes com o desenvolvimento da MRONJ.

Palavras-chave: Osteonecrose; Vitamina E; Inibidores da Fosfodiesterase.

FERREIRA, G. R. Effect of pentoxifylline and tocopherol in the treatment of osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in ovariectomized rats treated with antiresorptive medication. 2024. 52 f. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

ABSTRACT

Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) is a condition whose pathogenesis is not yet fully understood and, therefore, there is no well-defined treatment protocol. In this sense, drug therapies such as the combination of Pentoxifylline and Tocopherol have been the subject of few studies and appear to have the potential to optimize tissue repair, but without any clinical consensus or analysis of biological responses to their applications. The objective of the study was to evaluate the effect of Pentoxifylline and Tocopherol combined or administered alone, in the prevention and treatment of osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in ovariectomized rats treated with Zoledronate. To this end, 40 rats (12 months old) were divided into 5 experimental groups (n=5). In the VEI group, the rats were administered 0.9% sodium chloride solution and the ZOL group received Zoledronate 100µg/kg, both every 3 days for 7 weeks; the ZOL+PENTO group received administration of Zoledronate following the same protocol and 50mg/kg/day of Pentoxifylline daily, via gavage; the ZOL+TOCO group received Zoledronate in the same protocol and 80mg/kg/day of Tocopherol daily, via gavage; and, finally, the ZOL+PENTO+TOCO group that received Zoledronate and Pentoxifylline and Tocopherol therapies following the same protocols, all after the extraction of the lower left first molar. Euthanasia was performed in the seventh week of the experiment, 28 days after tooth extraction. The microCT showed greater porosity in the groups that received therapy with Pentoxifylline and Tocopherol combined or alone ($p<0.05$). Histometry showed a higher percentage of non-vital bone for the ZOL group compared to the therapy groups ($p<0.05$) and greater vital bone tissue in the VEI group while the therapies did not differ from each other. In histology, the therapies showed osteocytes in the extracellular matrix of the forming bone. And in the clinical evaluation, at the time of euthanasia, the therapies used showed regions of the alveolus with no

exposure of necrotic bone tissue and signs of infection. Therefore, it can be inferred that the use of the Pentoxifylline and Tocopherol protocol, associated or not, can be carried out to maintain and improve tissue quality in patients with the development of MRONJ.

Keywords: Osteonecrosis; Vitamin E; Phosphodiesterase inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Distribuição dos animais de acordo com os grupos experimentais (VEI; ZOL; ZOL+PENTO; ZOL+TOCO; ZOL+PENTO+TOCO) (n=25) e de caracterização óssea (MCT0, MCT1 e MCT2) (n=15). 25
- FIGURA 2 - Fórmula de Reagen–Shaw, Nihal e Ahmad (2007) para conversão de dose humana para dose animal. 25
- FIGURA 3 - Etapas cirúrgicas do procedimento de ovariectomia. **(A)** Incisão nos flancos das ratas. **(B)** Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos. **(C)** Acesso ao peritônio. **(D)** Incisão do peritônio e acesso a cavidade abdominal. **(E)** Localização do ovário e chifre uterino. **(F)** Laqueadura do chifre uterino. **(G)** Ovário removido. **(H)** Reposição dos tecidos laqueados. **(I)** Sutura dos planos internos. **(J)** Sutura do plano superficial. 27
- FIGURA 4 - Instalação da ligadura de algodão no 1º molar inferior esquerdo **(A)**. Pericoronarite induzida pela ligadura de algodão em posição **(B)**. 28
- FIGURA 5 - Animal posicionado em mesa de operação para procedimento de exodontia. 30
- FIGURA 6 - Procedimento de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. **(A)** Luxação do dente. **(B)** Alvéolo logo após a extração. 30
- FIGURA 7 - Aplicação das medicações via gavagem. 31
- FIGURA 8 – Protocolo que foi utilizado para caracterização do tecido ósseo na senilidade (MCT0), com a aplicação de zoledronato (MCT1) e solução salina (MCT2). 32
- FIGURA 9 - Linha do tempo evidenciando a ordem cronológica dos principais eventos do desenho experimental em animais. 32
- FIGURA 10 - Aspecto clínico de grupo ZOL+PENTO após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. **(A)** Processo alveolar de animal evidenciando região de edema em processo alveolar. **(B)** Processo alveolar com ausência de sinais flogísticos e exposição óssea, com reparo alveolar. 37
- FIGURA 11 - Aspecto clínico de grupo ZOL+PENTO+TOCO após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. **(A)** Processo alveolar sem exposição óssea, onde é possível observar ponto sangrante. **(B)** Processo alveolar em reparo tardio, com restos alimentares na região, porém sem sinais de infecção. 37
- FIGURA 12 - Aspecto clínico de grupo ZOL+TOCO após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. **(A e B)** Processo alveolar em reparo tardio, porém, sem sinais flogísticos e de exposição óssea. 38
- FIGURA 13 - Gráficos microtomográficos de caracterização óssea dos grupos MCT0, 1 e 2 onde foram avaliados os parâmetros BV, BV.TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N e Po(tot). Símbolos: † mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos MCT0 e MCT2. 39

FIGURA 14 - Gráficos microtomográficos de análise dos grupos experimentais onde foram avaliados os parâmetros BV, BV.TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N e Po(tot). Símbolos - BV, Tb.Th e Po(tot): † (diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI) e ‡ (diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL); BV.TV, Tb.N: † (diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI); Tb.Sp: † (diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI), ‡ (diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL), *(diferença estatisticamente significativa entre ZOL e VEI). 41

FIGURA 15 - Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. (a - e) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI (a), ZOL (b), ZOL-Pe(c), ZOL-To (d), ZOL-PeTo (e). Abreviações e símbolos: asteriscos, biofilme com restos necróticos e bactérias; tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo; tonv, tecido ósseo não vital. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E). 42

FIGURA 16 - Aspecto histológico do tecido ósseo situado nas adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. (a - e) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI (a), ZOL (b), ZOL-Pe (c), ZOL-To (d), ZOL-PeTo (e). Abreviações e símbolos: asteriscos, biofilme com restos necróticos e bactérias; setas pretas, lacunas contendo osteócitos; setas vermelhas, lacunas vazias ou contendo remanescentes celulares. Aumento original: 100x. Barras de escala: 200 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E). 43

FIGURA 17 - Porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF) no sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI. 44

FIGURA 18 - Porcentagem de tecido ósseo não vital (TONV) nas adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL. 45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
2. OBJETIVO	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Desenho experimental: animais	22
3.1.1 Grupos experimentais.....	23
3.2 Ovariectomia bilateral	26
3.3 Delineamento do procedimento cirúrgico.....	27
3.3.1 Pré operatório	28
3.3.2 Período de Indução da Osteonecrose.....	28
3.3.3 Período de antibioticoterapia.....	29
3.3.4 Exodontia.....	29
3.3.5 Pentoxifilina e Tocoferol.....	31
3.3.6 Eutanásia.....	31
4. MÉTODOS DE ANÁLISES.....	32
4.1 Análise clínica	33
4.2 Análises e processamento de tecidos calcificados	33
4.2.1 Microtomografia computadorizada (MicroCT).....	33
4.3 Análise e processamento dos tecidos descalcificados.....	34
4.3.1 Análise microscópica e área microscópica de interesse (AMI)	34
4.3.2 Análise histológica e histométrica.....	35
4.4 Calibração do examinador	35
4.5 Análise estatística	36
5. RESULTADOS	36
5.1 Análise clínica	36
5.2 Microtomografia computadorizada (MicroCT)	38
5.3 Histologia.....	42
5.4 Histometria.....	43
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	52

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Com o passar dos anos temos observado que a pirâmide etária tem sofrido mudanças e o número de crianças vem diminuindo enquanto que o de idosos aumentando, algo que tende a permanecer nos próximos anos. Isso traz como consequência uma maior prevalência de doenças relacionadas a esta faixa etária, como é o caso da osteopenia e da osteoporose. Ambas as condições estão relacionadas a perda de massa óssea e, na maioria dos casos, são tratadas com medicamentos chamados bisfosfonatos, como exemplo o Zoledronato e Alendronato, que são medicamentos antirreabsortivos e antiangiogênicos amplamente empregados para o tratamento destas doenças, já estabelecido como um dos tratamentos mais utilizados há anos (2-4).

Os bisfosfonatos são medicamentos com ação antirreabsortiva através da alteração no início da osteoclastogênese, o que impede que ocorra a remodelação óssea e promove uma ação antiangiogênica, o que afeta a resposta imune local e aumenta, conseqüentemente, a susceptibilidade a infecções. Esses medicamentos são amplamente utilizados para osteoporose, doença de Paget, metástases ósseas, mieloma múltiplos, entre outras doenças, devido ao seu mecanismo de ação no bloqueio da reabsorção óssea evitando a liberação de fatores de crescimento. Dentro desta classe, pode-se citar o Zoledronato como o bisfosfonato mais potente devido a sua alta aderência a superfície óssea (3-5).

Entretanto, o uso desta medicação vem sendo associado à ocorrência de osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (MRONJ), definida pela “American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons” (AAOMS) como sendo a presença de tecido ósseo exposto, ou fístulas rastreáveis ao próprio osso em região maxilofacial por um período de mais de oito semanas em pacientes submetidos a terapia utilizando antirreabsortivos/antiangiogênicos e sem histórico de radioterapia de cabeça e pescoço. A etiopatogenia dessa doença ainda não é totalmente definida, porém, acredita-se que seja associada ao mecanismo de ação dos antirreabsortivos, pois atuam na diminuição do turnover ósseo e suprimento sanguíneo da região, diminuindo a oferta celular

do tecido e inibindo a atuação de células osteoblásticas, conseqüentemente, interrompendo o processo de remodelação óssea fundamental para a vitalidade do osso (6-8).

A ação antiangiogênica dos bisfosfonatos faz com que haja efeitos citotóxicos locais pelo uso desta medicação. Ademais, deve-se levar em consideração como possíveis fatores que podem também ajudar no surgimento da MRONJ, infecções anteriores decorrentes de microbiota específica residente, inflamações persistentes de tecido mole e duro, comorbidades que são associadas à ineficiência de reparo tecidual, como por exemplo, diabetes mellitus e histórico de tabagismo. Traumas relacionados a procedimentos dentários, tal como extrações ou colocação de implantes são precedentes da ocorrência de MRONJ, pois geram mini fraturas no tecido ósseo e requerem remodelação óssea para reparo, algo que não ocorre em pacientes que fazem uso desta medicação (3, 4). Fraturas patológicas com sequestros ósseos, envolvimento dos seios maxilares, envolvimento de estruturas vitais e perda óssea significativa podem ocorrer em casos mais agravantes (9, 10).

Os bisfosfonatos podem ser administrados por via intravenosa e oral, destacando, assim como na maioria dos medicamentos, a administração intravenosa, que apresenta efeitos mais rápidos e mais potentes. A MRONJ afeta de 0,8% a 12% dos pacientes que fazem uso do antirreabsortivo por via intravenosa, enquanto apenas 0,001% a 0,01% dos que fazem uso via oral são afetados. Ademais, os bisfosfonatos quando em uso contínuo possuem a característica de serem acumulativos no tecido, o que causa um aumento no número de pacientes afetados, podendo ir para 21% de pessoas acometidas pela condição após quatro ou mais anos de tratamento. Mulheres de idade avançada são as mais afetadas, pois é nessa faixa etária que comumente se desenvolvem problemas ósseos como osteoporose, fazendo com que se inicie o uso desses medicamentos. Sendo o maior local de ocorrência na região posterior de mandíbula, entre o primeiro pré-molar e o primeiro molar (3, 10, 11).

Dentre os tratamentos e terapias propostas na literatura temos a laserterapia de baixa potência, procedimentos cirúrgicos como o de

fluorescência guiada, recombinação do hormônio da paratireoide, oxigenioterapia hiperbárica e até o uso de antimicrobianos com intuito de evitar infecções decorrentes da osteonecrose. Entretanto, a terapia medicamentosa que envolve a associação da Pentoxifilina e Tocoferol vem sendo alvo de diversos estudos e apresentando resultados pré clínicos significativos no tratamento adjuvante da osteonecrose, com melhora principalmente na sintomatologia dos pacientes afetados. Estudos mostram pequenas áreas da mandíbula que de 3 a 5 meses após o início do tratamento sofreram completa remissão, e mais de 50% da necrose óssea cicatrizada após 12 meses de tratamento com os medicamentos (12, 15, 16).

A Pentoxifilina é um derivado de metilxantina, inibidor da fosfodiesterase utilizado para o tratamento de doenças vasculares periféricas. Embora seu mecanismo de ação ainda não seja muito bem elucidado, sabemos que o medicamento é capaz de reduzir a viscosidade sanguínea, promover a redução da fibrinogênese no plasma enquanto aumenta a atividade fibrinolítica, causando vasodilatação, aumento da filtração e melhora na deformação dos eritrócitos, ou seja, uma melhora na angiogênese. Além disso, a Pentoxifilina é muito usada no tratamento de disfunções imunes por conta de seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, principalmente pela queda de ativação dos neutrófilos e dos níveis plasmáticos de interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6), além de reduzir a síntese de TNF- α pelo RNA mensageiro, resultando também em sua diminuição nos níveis plasmáticos (2, 4).

Já o Tocoferol é um potente agente antioxidante que minimiza injúrias à membrana celular, devido à proteção aos fosfolípidios de membrana a partir da remoção de espécies reativas de oxigênio geradas durante o estresse oxidativo. Dessa forma, este medicamento consegue evitar a peroxidação lipídica e, por isso, ajuda a promover uma cicatrização normal de injúrias no tecido endotelial. Além disso, o Tocoferol também reduz inflamação e inibe a expressão de gene do procolágeno (2, 4). Ademais, alguns estudos têm mostrado que ambos os medicamentos possuem efeito sinérgico no tratamento da osteonecrose, e conseguem desempenhar um papel na cicatrização de feridas e na redução de formação de cicatriz (2).

Portanto, a partir do que foi exposto conseguimos perceber que a osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (MRONJ) ainda necessita de terapias otimizadoras do tecido ósseo e mole de recobrimento com comprovações científicas para seu protocolo de tratamento. Neste sentido, este trabalho terá como intenção analisar os efeitos da associação de Pentoxifilina e Tocoferol em ratas ovariectomizadas com osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos, para que seja possível entender o fenômeno biológico envolvido e estabelecer um protocolo de tratamento e, assim, realizar possíveis testes clínicos em humanos no futuro.

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da Pentoxifilina e do Tocoferol após exodontia no tratamento de osteonecrose dos maxilares em ratas ovariectomizadas tratadas com Zoledronato, no reparo ósseo alveolar pós-exodontia do primeiro molar inferior.

A hipótese nula do trabalho foi que ambos os medicamentos não promoveriam melhoras significativas no reparo ósseo, administrados de forma associada ou isoladamente em comparação aos grupos sem as terapias propostas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental: animais

Essa pesquisa seguiu todos os preceitos e princípios éticos para experimentação animal, regulamentados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os protocolos experimentais foram enviados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, através do número do parecer consubstanciado 0096-2022 (Anexo A).

40 animais (n=5) (*Rattus norvegicus albinus Wistar*), fêmeas, com aproximadamente 12 meses, com peso corporal variando entre 300 a 350 gramas, foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de

Araçatuba (FOA) – UNESP e mantidos no Biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia.

Para a determinação do número amostral, o cálculo do Poder do Teste foi realizado utilizando o programa estatístico SigmaPlot 12.0 (Exakt graph and data analysis, San Jose, CA, USA). Para a utilização dos dados da literatura, tais como diferenças das medias e desvio padrão, uma busca nas principais bases de dados disponíveis (PUBMED, Scoups, Embase, Web of Science e Scielo) foi realizada, por meio de trabalhos de experimentação animal que envolvesse a terapia de tratamento e/ou prevenção de osteonecrose dos maxilares utilizando Pentoxifilina e Tocoferol através da padronização das palavras-chaves “Osteonecrose; Vitamina E; Inibidores da Fosfodiesterase”, porém não foram encontrados os dados necessários para o teste, inviabilizando a realização do mesmo. Sendo assim, o número de animais por grupo experimental foi baseado nos trabalhos de Delfrate et al. (2021) que apresenta metodologia no qual esse projeto se baseou. Além disso, também pudemos nos basear nas pesquisas anteriores do nosso grupo de pesquisa que utilizam este número de animais, ficando assim o valor de n=5 por grupo experimental (17).

3.1.1 Grupos experimentais

Especificamente para a análise em microtomografia computadorizada (MicroCT), 5 ratas foram alocadas aleatoriamente para serem submetidas à eutanásia logo após a ambientalização no biotério cirúrgico (dia 0), para caracterização do osso mandibular na região posterior (1º molar inferior esquerdo) (**MCT0**). Da mesma forma, 5 ratas foram induzidas a osteonecrose com aplicação de zoledronato por 3 semanas (**MCT1**) e as 5 demais ratas receberam aplicação de solução salina, também durante 3 semanas (**MCT2**); sendo essas 10 ratas submetidas a eutanásia no final da 3ª semana, para avaliação da arquitetura do osso no dado momento após instituição dessas terapias prévias, totalizando 15 ratas.

25 animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais sendo o grupo 1 (**VEI**), 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); o grupo 2 (**ZOL**) com 5 ratas, onde induziu-se a osteonecrose pela aplicação de zoledronato 100µg/kg, a cada 3 dias por 7 semanas (controle positivo); grupo 3 (**ZOL+PENTO**) com 5 ratas que também foram induzidas à osteonecrose com zoledronato no mesmo protocolo e aplicação diária de 50mg/kg/dia de Pentoxifilina (“Farmácia Manipullis” – Araçatuba, SP) via gavagem até o dia da eutanásia, totalizando 28 dias; grupo 4 (**ZOL+TOCO**) com 5 ratas que induziu-se a osteonecrose com zoledronato e aplicação diária de 80mg/kg/dia de Tocoferol (“Farmácia Manipullis” – Araçatuba, SP) via gavagem até o dia da eutanásia, também por 28 dias e o grupo (**ZOL+PENTO+TOCO**) com 5 ratas que foram induzidas à osteonecrose, aplicação diária via gavagem de Pentoxifilina e Tocoferol usando os protocolos já citados (Figura 1). As doses do plano medicamentoso foram baseadas em terapias oncológicas em humanos, adaptadas para animais e a aplicação via gavagem obedeceu aos princípios de experimentação animal que utiliza 1mL/1g de peso corpóreo. Além disso, as doses de Pentoxifilina e Tocoferol foram baseadas na fórmula de Reagen-Shaw, Nihal e Ahmad (2007), considerando uma dose diária total em humanos de 800mg de Pentoxifilina e 1000UI de Tocoferol (17-19) (Figura 2).

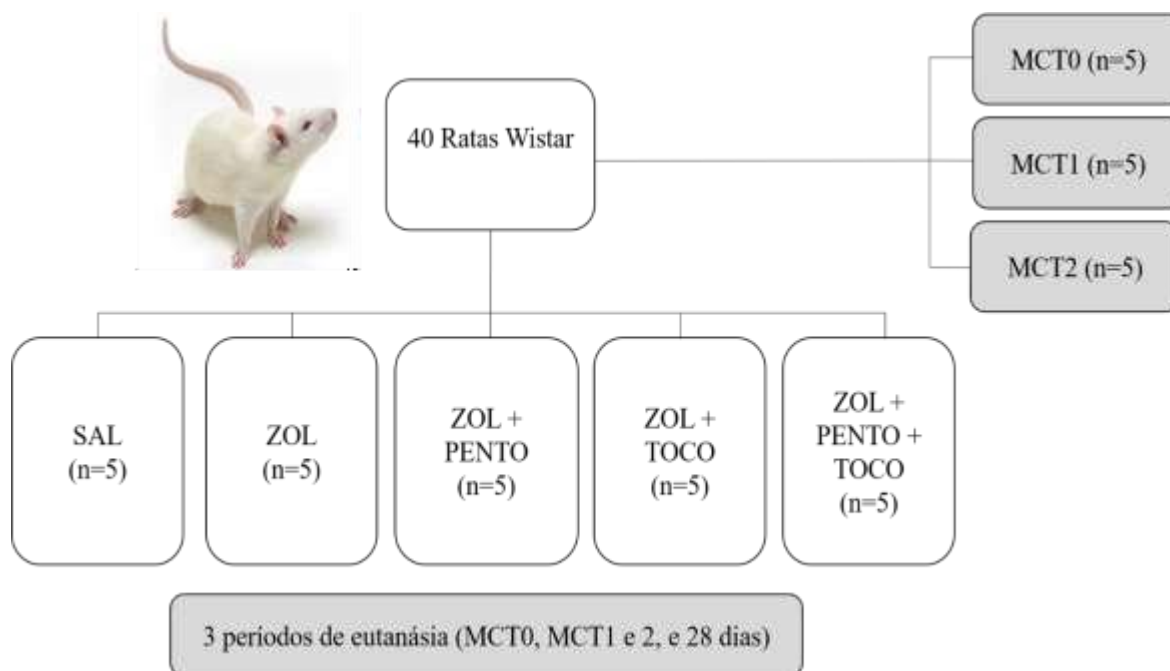


Figura 1. Distribuição dos animais de acordo com os grupos experimentais (VEI; ZOL; ZOL+PENTO; ZOL+TOCO; ZOL+PENTO+TOCO) (n=25) e de caracterização óssea (MCT0, MCT1 e MCT2) (n=15).

Formula for Dose Translation Based on BSA	
HED (mg/kg) = Animal dose (mg/kg)	<i>multiplied by</i> $\frac{\text{Animal Km}}{\text{Human Km}}$

Figura 2. Fórmula de Reagen–Shaw, Nihal e Ahmad (2007) para conversão de dose humana para dose animal.

Após um período de adaptação, todos os animais foram submetidos ao procedimento de ovariectomia bilateral.

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração balanceada contendo 1,4% Ca e 0,8% P (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante toda a

pesquisa experimental e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos, que apresentará o jejum.

3.2 Ovariectomia bilateral

Nos primeiros oito dias, após a ambientalização, que corresponde a 2 ciclos estrais regulares (ciclo estrogênio), as ratas foram submetidas ao esfregaço vaginal, de acordo com a técnica descrita em estudos prévios. A obtenção de células epiteliais através do esfregaço foi disposta em lâminas histológicas e analisadas em microscópio óptico. Com isso, durante os oito dias, a regularidade do ciclo astral foi avaliada. Os animais que não tiveram a regularidade entre as fases estrais (proestro, estro, metaestro e diestro) foram desconsiderados do estudo. Após esta fase, todas as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral. Inicialmente, estas foram anestesiadas com Cloridrato de Xilazina (Xilazina – Coopers, Brasil, Ltda.) na dose de 5 mg/kg e Cloridrato de Quetamina (Ketamina, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) na dose de 50mg/kg e, depois, foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral. Realizou-se uma incisão de 1,5 cm em ambos os flancos, seguido da divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio afim de ter acesso à cavidade abdominal. Os ovários e os chifres uterinos foram localizados e laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Feito isso, fez-se a remoção dos ovários (ovariectomia), seguido da sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) (Figura 3). Estas ratas continuaram no biotério, sendo alimentadas com ração e água *ad libitum* durante todo o tempo experimental e foram mantidas em gaiolas que comportavam até 4 animais. A temperatura do ambiente se manteve estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro). Passados 60 dias da indução da osteoporose as ratas foram submetidas ao procedimento de amarra no dia -1 e ao final da 3ª semana ao procedimento de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo.

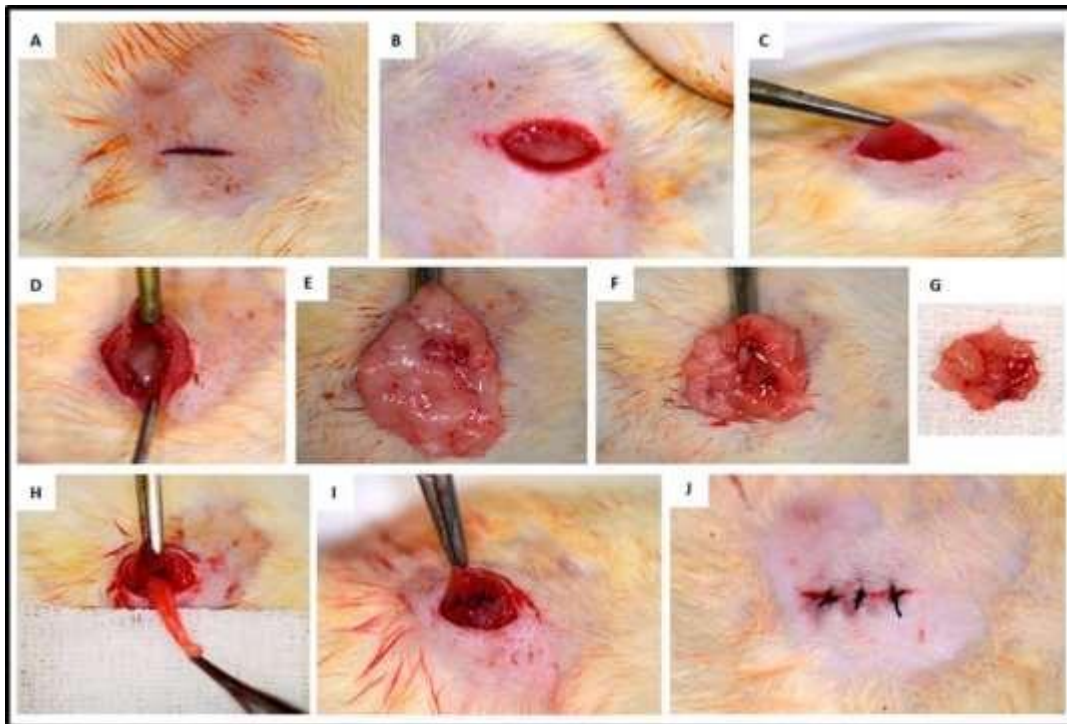


Figura 3. Etapas cirúrgicas do procedimento de ovariectomia. **(A)** Incisão nos flancos das ratas. **(B)** Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos. **(C)** Acesso ao peritônio. **(D)** Incisão do peritônio e acesso a cavidade abdominal. **(E)** Localização do ovário e chifre uterino. **(F)** Laqueadura do chifre uterino. **(G)** Ovário removido. **(H)** Reposição dos tecidos laqueados. **(I)** Sutura dos planos internos. **(J)** Sutura do plano superficial.

3.3 Delineamento do procedimento cirúrgico

Os 25 animais (n=5) passaram por um período de adaptação ao biotério e também passaram por um jejum de 12 horas previamente ao procedimento cirúrgico. Todos os procedimentos experimentais que poderiam desenvolver dor ou desconforto para os animais foram realizados sob anestesia pela combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e, receberam cloridrato de mepivacaína (0,3 ml/kg, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont França) para anestesia local e hemostasia da área operada (8, 13, 24).

3.3.1 Pré operatório

Cronologicamente, a intervenção iniciou no dia -1 com a indução de periodontite experimental através da colocação de uma ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo de cada animal, dessa forma, esta amarraria auxiliou no momento da extração desse dente devido a diminuição do osso intra e interradicular, evitando assim fratura apical das raízes radiculares e técnicas invasivas para extração dentária. Além da periodontite ser um fator que propicia a indução da osteonecrose (8, 25-27) (Figura 4).

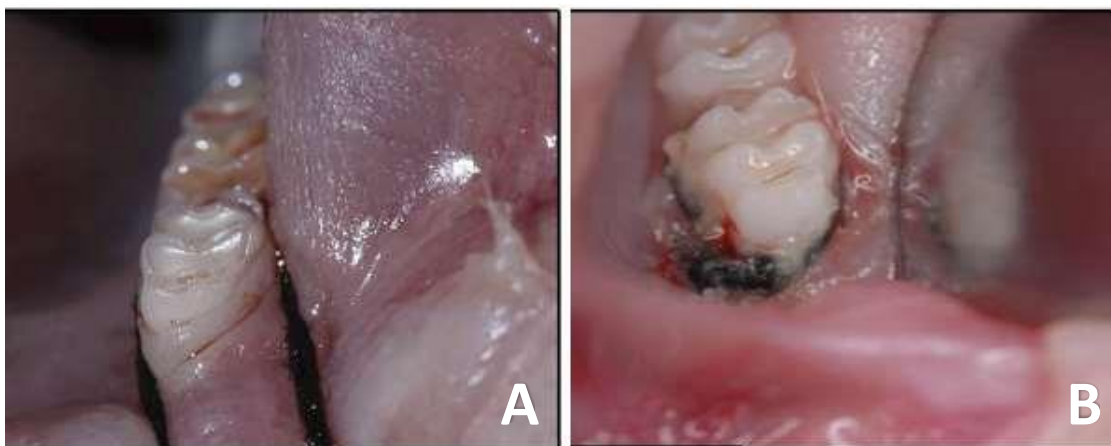


Figura 4. Instalação da ligadura de algodão no 1º molar inferior esquerdo (A). Pericoronarite induzida pela ligadura de algodão em posição (B).

3.3.2 Período de Indução da Osteonecrose

No dia 0 iniciou a indução de osteonecrose através da instituição do protocolo de 100µg/kg diluídos em 0,45 ml de solução salina, por via intraperitoneal, em uma seringa SLIP INSULINA de 1 ml, descartável com agulha de calibre 13mm x 0,38mm, a cada 3 dias por 7 semanas, até a eutanásia. Os grupos que receberam o Zoledronato incluem o grupo **ZOL** (apenas aplicação do Zoledronato), **ZOL+PENTO** (aplicação de Zoledronato e Pentoxifilina), **ZOL+TOCO** (aplicação de Zoledronato e Tocoferol) e **ZOL+PENTO+TOCO** (aplicação de Zoledronato, Pentoxifilina e Tocoferol).

Os animais do grupo **VEI** que não foram expostos ao medicamento receberam 0,45 ml de solução salina também por via intraperitoneal, com o mesmo modelo de seringa, para mimetizar o estresse do manejo dos animais do grupo teste (8, 28, 29).

3.3.3 Período de antibioticoterapia

Na terceira semana de indução, 3 dias antes da extração do molar, os animais iniciaram a antibioticoterapia profilática, em que o antibiótico utilizado foi a Penicilina G Potássica 0,1ml/kg por dia, administrada por via intraperitoneal (Cristacilina® (Benzilpenicilina potássica) 1.000.000UI, Novafarma Indústria Farmacêutica Ltda ®, Anápolis- GO BR) na dose de 0,1 mL/kg ao dia por 7 dias, finalizando a sua administração 4 dias após a extração (24).

3.3.4 Exodontia

Sob sedação (Quetamina associada à Xilazina, como descrito anteriormente), após 3 semanas do início da medicação, as ratas foram posicionadas na mesa de operação; removeu-se a ligadura de algodão e, após a antissepsia bucal com PVPI 10% (PVPI 10% Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), foi realizada a sindesmotomia dos tecidos adjacentes ao dente, luxação e, por fim, extração do primeiro molar inferior esquerdo, utilizando materiais cirúrgicos odontológicos adaptados aos animais. Todas as ratas, de todos os grupos experimentais, foram submetidas a esse procedimento (8) (Figura 5 e 6).



Figura 5. Animal posicionado em mesa de operação para procedimento de exodontia.

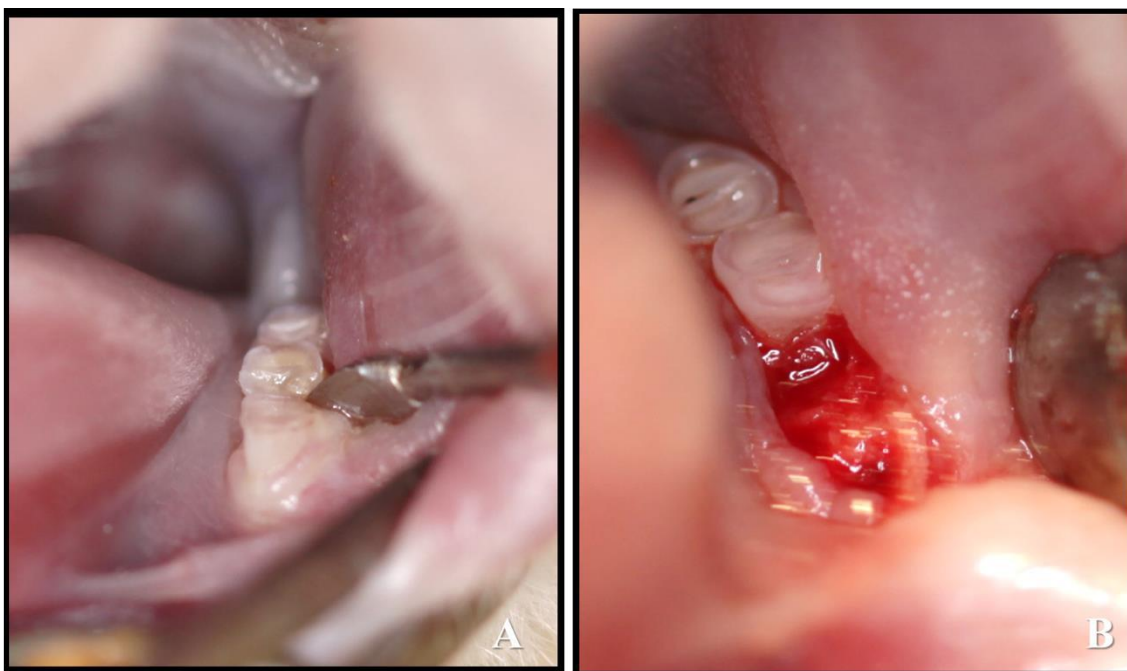


Figura 6. Procedimento de exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. **(A)** Luxação do dente. **(B)** Alvéolo logo após a extração.

3.3.5 Pentoxifilina e Tocoferol

Após a exodontia, as ratas pertencentes aos grupos **ZOL+PENTO**, **ZOL+TOCO** e **ZOL+PENTO+TOCO** passaram por aplicações via gavagem de 50mg/kg/dia de Pentoxifilina e 80mg/kg/dia de Tocoferol (“Farmácia Manipullis” – Araçatuba, SP) conforme o grupo na qual cada animal fazia parte, diariamente até o dia da eutanásia, totalizando 28 dias conforme os princípios de experimentação animal que utiliza 1mL/1g de peso corpóreo. (Figura 7).



Figura 7. Aplicação das medicações via gavagem.

3.3.6 Eutanásia

O grupo **MCT0** foi submetido à eutanásia no dia 0, logo após a ambientação. Os grupos **MCT1** e **MCT2** foram submetidos à eutanásia no dia de número 21 (terceira semana), ao fim da terapia (Figura 8). Os grupos **VEI**, **ZOL**, **ZOL+PENTO**, **ZOL+TOCO** e **ZOL+PENTO+TOCO** foram submetidos à eutanásia após 28 dias do procedimento de extração dos dentes dos grupos (totalizando 7 semanas) (Figura 8 e 9).

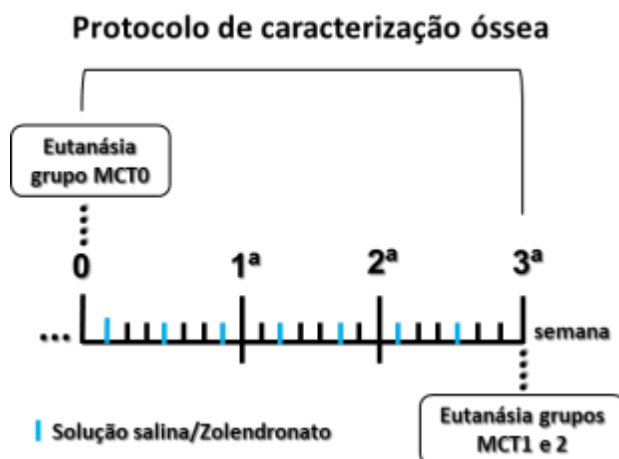


Figura 8. Protocolo que foi utilizado para caracterização do tecido ósseo na senilidade (MCT0), com a aplicação de zoledronato (MCT1) e solução salina (MCT2).

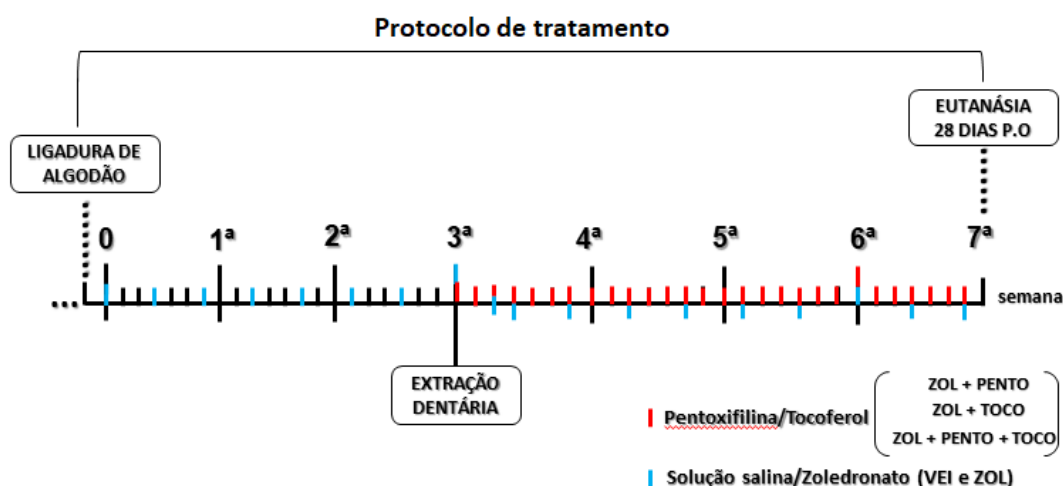


Figura 9. Linha do tempo evidenciando a ordem cronológica dos principais eventos do desenho experimental em animais.

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

4. MÉTODOS DE ANÁLISES

4.1 Análise clínica

Antes do procedimento de eutanásia, sob anestesia geral, os animais por grupo foram posicionados na mesa estabilizadora e a condição clínica da área de primeiro molar inferior esquerdo foi analisada. Condições como grau de epitelação dos tecidos moles de recobrimento, exposição de tecido ósseo, assim como presença de eritema, fístula, infecção (drenagem de conteúdo purulento) foram consideradas.

4.2 Análises e processamento de tecidos calcificados

4.2.1 Microtomografia computadorizada (MicroCT)

Para a análise tridimensional da estrutura do tecido ósseo, os animais pertencentes aos grupos **MCT0**, **MCT1** e **MCT2** e, posteriormente **VEI**, **ZOL**, **ZOL+PENTO**, **ZOL+TOCO** e **ZOL+PENTO+TOCO** tiveram as mandíbulas removidas do fixador e lavadas por 12 horas em água corrente a fim de remover qualquer resíduo do fixador. Logo depois, foram armazenadas em álcool 70% para transporte até o local de análise. Primariamente, foram submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 8 µm de espessura (90Kv e 111µA), com filtro de cobre e passo de rotação de 0,05 mm. As áreas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstruídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6. 6.0) (24, 30).

No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizamos o software CTAnalyser – CTAn (2003 11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida a área radiográfica de interesse (ARI) delimitada por uma área de 4 mm³ que incluiu a porção do local de extração dentária anteriormente ocupada pelas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior esquerdo e tecidos adjacentes. O software CTAn analisou e mediu a imagem de acordo com a escalas de cinza.

Após o ajuste e remoção dos tons de cinza da área correspondente do alvéolo, o *threshold* utilizado na análise foi de 25 - 90 tons de cinza, o que possibilitou a obtenção do volume de osso presente/formado no interior dos alvéolos (24, 30).

Os parâmetros analisados foram referentes à quantidade do tecido ósseo (BV.TV= porcentagem do volume ósseo) e qualidade do tecido ósseo (Tb.Th= espessura do trabeculado ósseo, Tb.SP= separação das trabéculas ósseas, Tb.N= número das trabéculas e To (tot) = porcentagem de porosidade total) (24, 30).

4.3 Análise e processamento dos tecidos descalcificados

Logo após a MicroCT de todos os grupos, as peças retornaram para o fixador a fim de completarem 72 horas de fixação, e após isso foram submetidas novamente a um banho de água corrente por 12 horas e partiram para a descalcificação em ácido etilendiamino tetra-acético 10% (EDTA) por 6-8 semanas. Após a descalcificação, a região correspondente ao alvéolo e estruturas adjacentes da extração foram separadas. Assim, as peças seguiram para a desidratação numa sequência de álcoois (70 a 100%). Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 5 µm de espessura e a confecção das lâminas. Foram coletadas, de lingual para vestibular, as secções histológicas da porção do alvéolo dental e tecidos adjacentes a serem analisados. As lâminas pares após a microtomia foram destinadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) (8, 13).

4.3.1 Análise microscópica e área microscópica de interesse (AMI)

As análises microscópicas foram realizadas por um histologista certificado, cego aos tratamentos. Para a análise histométrica avaliaram-se três cortes histológicos localizados na porção vestibular, média e lingual do local da extração dentária. A área de interesse foi dividida em duas: AMI (I) e a AMI (II) que foram determinadas de acordo com a análise microscópica realizada. A AMI (I) consiste em uma área de 4 mm x 4 mm que inclui a porção do local da extração dentária anteriormente ocupada pelas raízes mesial e distal do

primeiro molar inferior esquerdo e tecidos adjacentes. Seu limite distal é composto de uma linha situada paralelamente à dentina coronária e à superfície radicular do segundo molar inferior esquerdo, estendendo-se 4mm mesialmente. Seu limite coronário é composto de uma linha paralela ao limite da margem cemento-gengival do segundo molar inferior esquerdo, estendendo-se 4mm apicalmente (21). O AMI (II) consiste em duas áreas de 250 × 250 µm, situadas no tecido conjuntivo que recobre o local da extração dentária. O limite das áreas 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. Duas outras linhas foram utilizadas, uma paralela à porção central do local de extração dentária anteriormente ocupada pela raiz mesial e outra paralela à porção central do local de extração dentária anteriormente ocupada pela raiz distal do primeiro molar. A intersecção dessas linhas determinou o centro das duas áreas que serão analisadas (8).

4.3.2 Análise histológica e histométrica

A análise histológica com as características gerais dos tecidos e histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PONF) foram realizadas através de fotomicrografias da área do alvéolo do dente extraído e tecidos adjacentes, que foram capturadas com o auxílio de um software de análise de imagem (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). A área ocupada pela PONF foi estabelecida e expressa em µm² como média ± desvio padrão em cada grupo experimental. Na região de Interesse AMI (I), as imagens foram capturadas utilizando uma câmera digital (AxioCam® Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada a um microscópio de luz (AxioLab®) e conectada a um microcomputador. A quantificação da porcentagem de tecido ósseo neoformado e a porcentagem de tecido ósseo não vital foram calculados utilizando o software de análise de imagens (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss). A PONV representa uma região onde mais de dez lacunas de osteócitos vizinhos apresentaram-se vazias ou contendo restos de osteócitos necróticos (8, 13).

4.4 Calibração do examinador

Ocorreram anteriormente as mensurações propostas para a histometria, histopatologia, histologia e microCT. O avaliador foi submetido a um teste

prévio do nível de concordância entre mensurações, onde foram realizadas as mensurações propostas no estudo de 12 animais randomizados, em duplicata com um intervalo de 1 semana entre elas. O teste estatístico kappa mostrou o índice $k=0.9$, o que representa alto nível de concordância em relação a calibração intra-examinador.

4.5 Análise estatística

Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos que foram obtidos através da histometria (AON, TONV) e morfometria tridimensional pela Microtomografia (BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N), foi abordada a diferença entre os grupos experimentais (VEI; ZOL; ZOL+PENTO; ZOL+TOCO; ZOL+PENTO+TOCO (MCT0; MCT1 e MCT2)). Todos os dados foram submetidos à curva de normalidade – teste de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Para todos os testes, o nível de significância adotado foi de 5% ($p<0,05$). O programa estatístico utilizado foi o SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Análise clínica

No grupo ZOL+PENTO foi possível observar animais com a região de primeiro molar inferior esquerdo com certo edema em região de gengiva inserida e animais com processo de reparo alveolar tardio, porém sem exposição de tecido ósseo e sinais de infecção (Figura 10).



Figura 10. Aspecto clínico de grupo ZOL+PENTO após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. **(A)** Processo alveolar de animal evidenciando região de edema em processo alveolar. **(B)** Processo alveolar com ausência de sinais flogísticos e exposição óssea, com reparo alveolar.

E tanto no grupo ZOL+PENTO+TOCO quanto no grupo ZOL+TOCO pode-se observar a maioria dos animais com processo de reparo alveolar tardio, porém sem exposição de tecido ósseo e sinais de infecção (Figura 11 e 12).

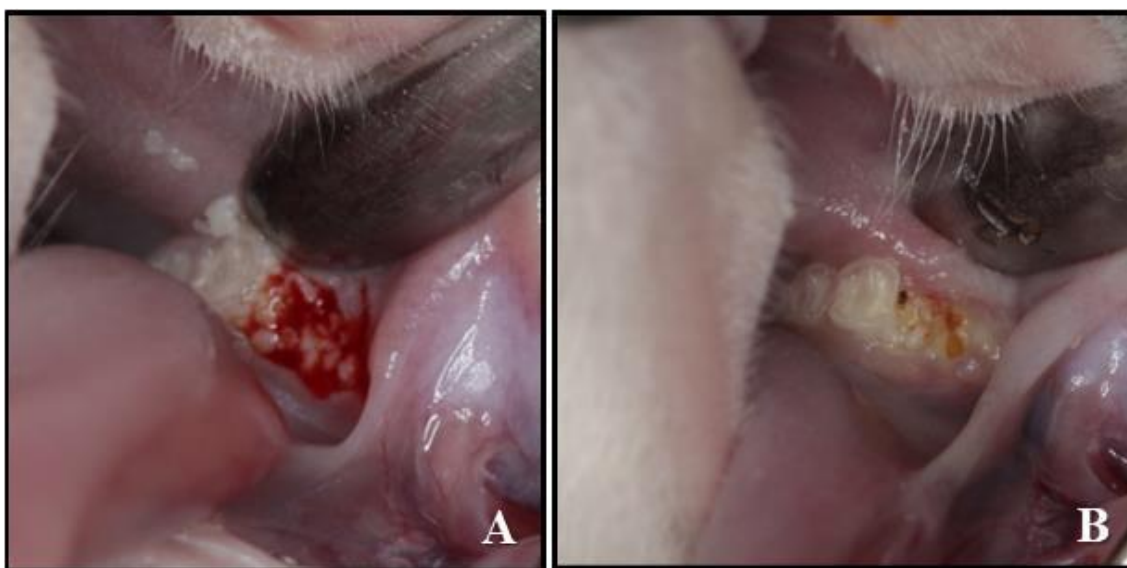


Figura 11. Aspecto clínico de grupo ZOL+PENTO+TOCO após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. **(A)** Processo alveolar sem exposição óssea, onde é possível observar ponto sangrante. **(B)** Processo alveolar em reparo tardio, com restos alimentares na região, porém sem sinais de infecção.

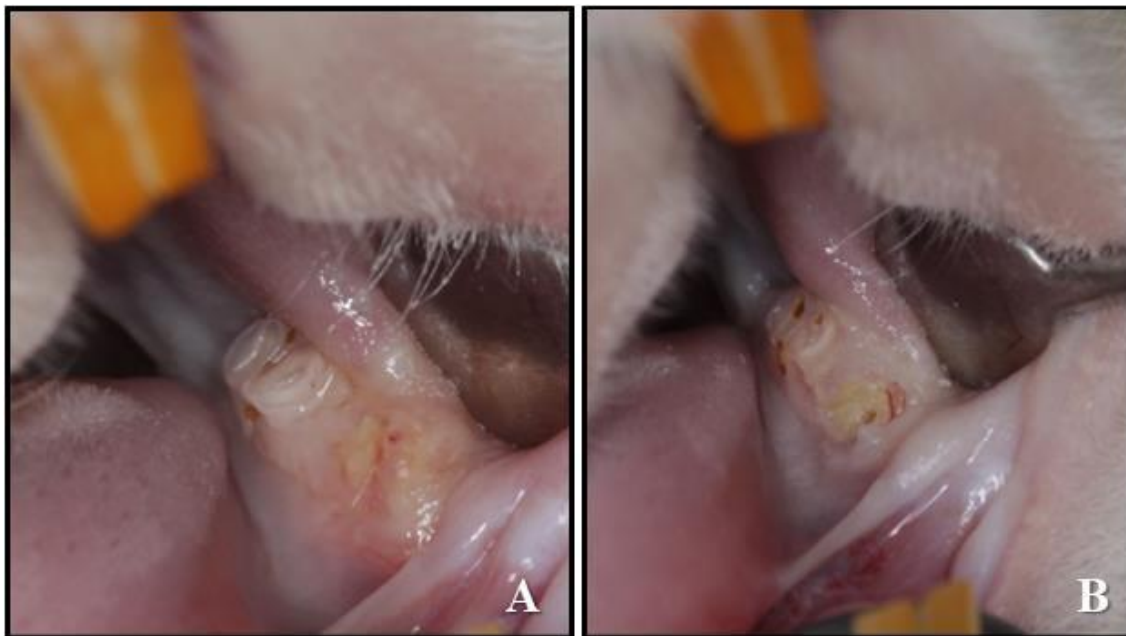


Figura 12. Aspecto clínico de grupo ZOL+TOCO após 28 dias de exodontia de primeiro molar inferior esquerdo. **(A e B)** Processo alveolar em reparo tardio, porém, sem sinais flogísticos e de exposição óssea.

5.2 Microtomografia computadorizada (MicroCT)

As análises de Micro-CT dos grupos MCT0, 1 e 2 foram realizadas, como citado anteriormente, para caracterização de tecido ósseo após ovariectomia (MCT0), aplicação por 3 semanas de ZOL (MCT1) e VEI (MCT2). Foi observado avaliando o parâmetro BV e BV.TV diferença entre os grupos MCT0 e MCT2 ($p < 0,05$). Já no parâmetro Po(tot) foi observado diferença entre os grupos MCT2 e MCT0 ($p < 0,05$). Na avaliação de outros parâmetros não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 13).

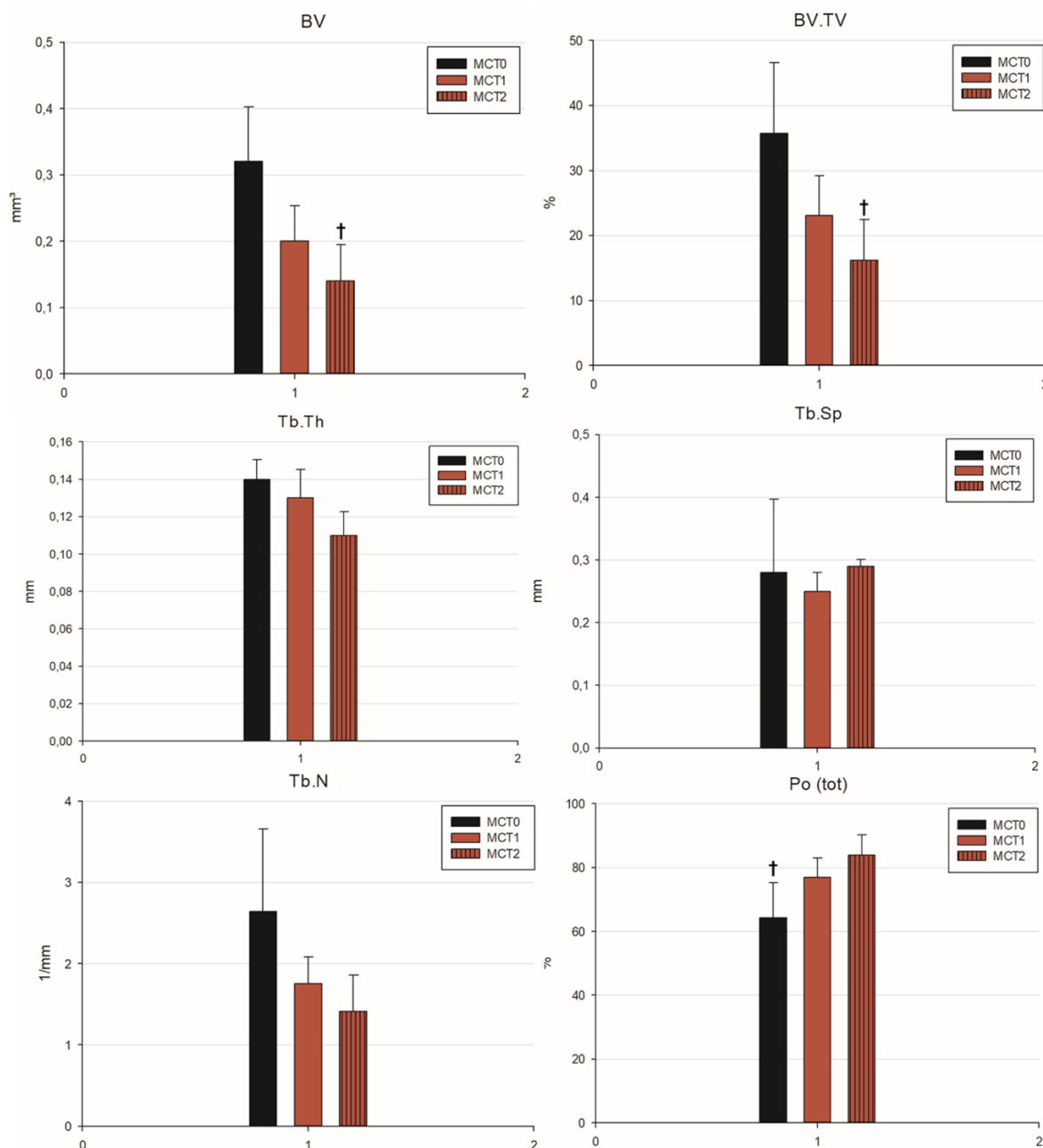


Figura 13. Gráficos microtomográficos de caracterização óssea dos grupos MCT0, 1 e 2 onde foram avaliados os parâmetros BV, BV.TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N e Po(tot). Símbolos: † mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos MCT0 e MCT2.

Na análise microtomográfica dos grupos experimentais, no parâmetro BV foi possível observar um maior volume ósseo do grupo VEI em relação aos grupos ZOL+PENTO, ZOL+PENTO+TOCO e ZOL+TOCO ($p < 0,05$) seguido do grupo ZOL em relação aos grupos ZOL+PENTO, ZOL+PENTO+TOCO e ZOL+TOCO ($p < 0,05$). Avaliando o parâmetro BV.TV o grupo VEI apresentou

uma maior porcentagem de volume ósseo em relação aos grupos ZOL+PENTO, ZOL+PENTO+TOCO e ZOL+TOCO ($p<0,05$), seguido do grupo ZOL, porém sem diferença estatística entre os grupos.

O parâmetro Tb.Th evidenciou uma maior espessura de trabéculas do grupo VEI seguido do ZOL em relação aos grupos ZOL+PENTO, ZOL+PENTO+TOCO e ZOL+TOCO ($p<0,05$). Em Tb.Sp foi possível observar uma maior separação de trabéculas no grupo ZOL seguido do grupo VEI em relação aos grupos ZOL+PENTO, ZOL+PENTO+TOCO e ZOL+TOCO ($p<0,05$) e entre o grupo ZOL e VEI ($p<0,05$). Avaliando o número de trabéculas (Tb.N), o grupo VEI obteve um maior resultado em relação ao grupo ZOL+TOCO ($p<0,05$), seguido do grupo ZOL+PENTO+TOCO porém sem diferença estatística. Por fim, na avaliação de Po(tot) os grupos ZOL+PENTO+TOCO, ZOL+PENTO e ZOL+TOCO, respectivamente, se sobressaíram em relação aos grupos VEI ($p<0,05$) e ZOL ($p<0,05$) (Figura 14).

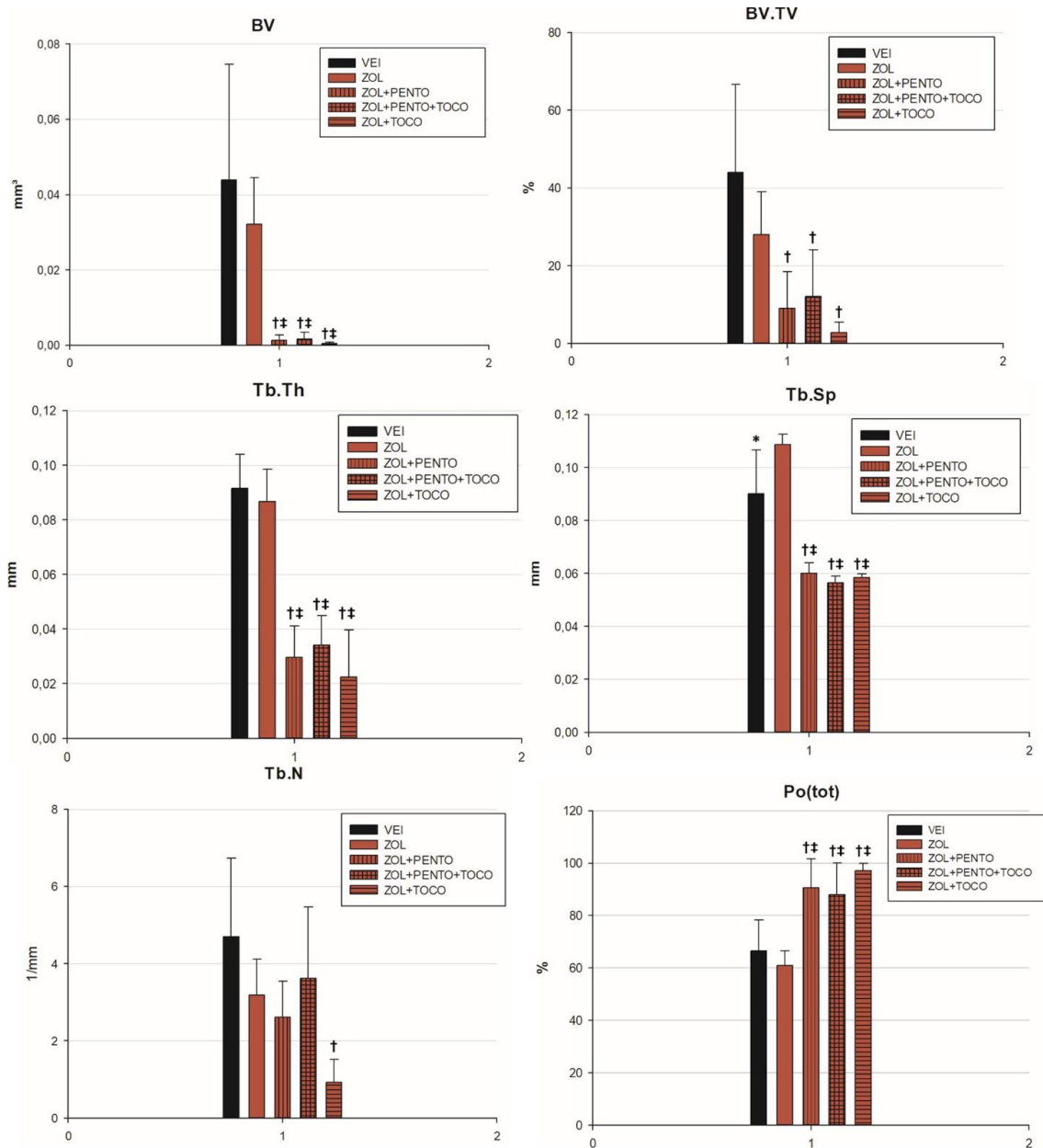


Figura 14. Gráficos microtomográficos de análise dos grupos experimentais onde foram avaliados os parâmetros BV, BV.TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N e Po(tot). Símbolos - BV, Tb.Th e Po(tot): † (diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI) e ‡ (diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL); BV.TV, Tb.N: † (diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI); Tb.Sp: † (diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI), ‡ (diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL), *(diferença estatisticamente significativa entre ZOL e VEI).

5.3 Histologia

A análise histológica evidenciou tecido necrótico, como esperado, no grupo ZOL em regiões adjacentes e no interior do alvéolo remanescente, inclusive com regiões de bactérias. Já grupos em que foi aplicada as medicações, tanto isoladamente quanto associados, pode-se observar no sítio de extração dentária regiões de tecido ósseo vital e tecido conjuntivo (Figura 15). O tecido ósseo adjacente ao local de extração se mostrou nos grupos ZOL+PENTO, ZOL+TOCO, ZOL+PENTO+TOCO com lacunas de osteócitos vazias e com remanescentes celulares (Figura 16).

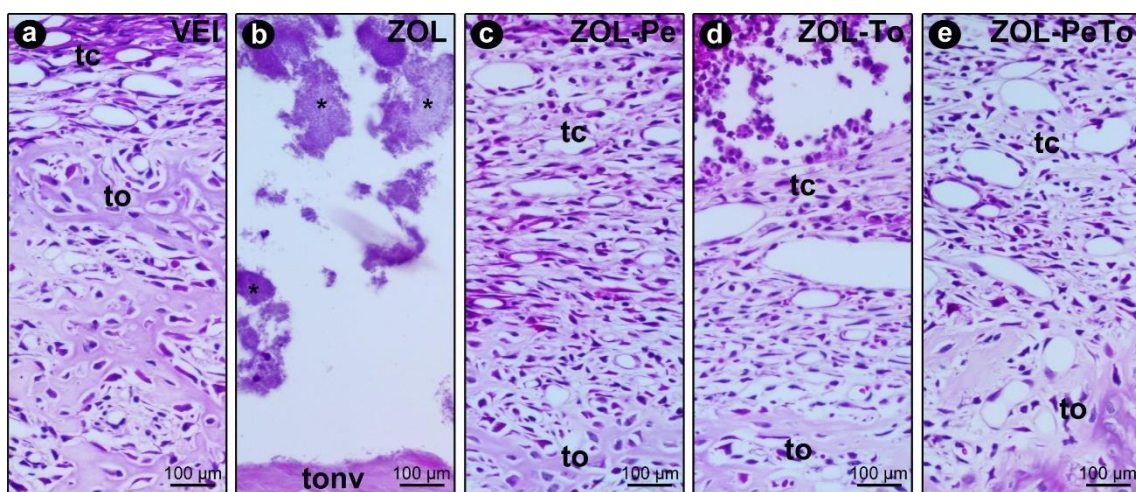


Figura 15. Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. **(a – e)** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI **(a)**, ZOL **(b)**, ZOL-Pe **(c)**, ZOL-To **(d)**, ZOL-PeTo **(e)**. Abreviações e símbolos: asteriscos, biofilme com restos necróticos e bactérias; tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo; tonv, tecido ósseo não vital. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

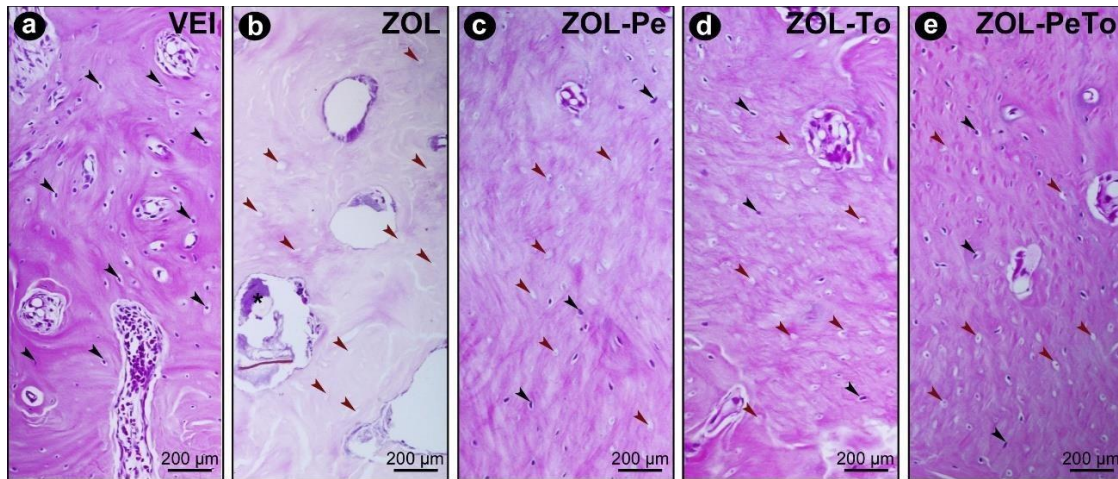


Figura 16. Aspecto histológico do tecido ósseo situado nas adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. **(a – e)** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI **(a)**, ZOL **(b)**, ZOL-Pe **(c)**, ZOL-To **(d)**, ZOL-PeTo **(e)**. Abreviações e símbolos: asteriscos, biofilme com restos necróticos e bactérias; setas pretas, lacunas contendo osteócitos; setas vermelhas, lacunas vazias ou contendo remanescentes celulares. Aumento original: 100x. Barras de escala: 200 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

5.4 Histometria

Analisando a porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF), pode-se observar o maior valor para VEI ($p < 0,05$) em comparação aos grupos ZOL, ZOL+PENTO, ZOL+TOCO e ZOL+PENTO+TOCO, em que as terapias testadas e o grupo ZOL apresentaram valores similares ($p > 0,05$) (Figura 17).

TONF

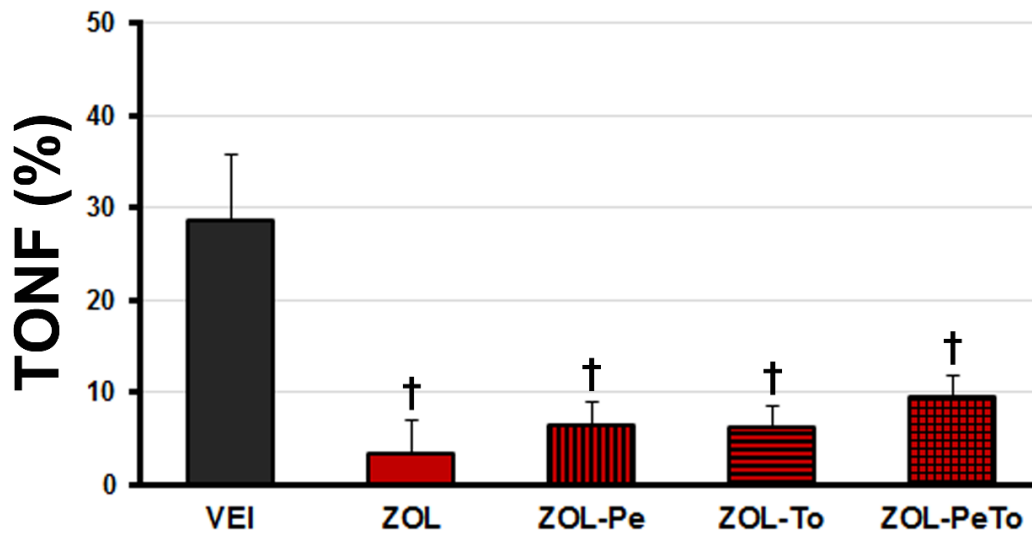


Figura 17. Porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF) no sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI.

Na porcentagem de tecido ósseo não vital (TONV) o grupo ZOL apresentou o maior valor na comparação com as terapias realizadas (ZOL+PENTO, ZOL+TOCO e ZOL+PENTO+TOCO, ZOL+TOCO) ($p < 0,05$). As terapias não diferiram na comparação entre elas mesmo ($p > 0,05$). O menor resultado foi observado no grupo VEI com diferença estatística em relação aos grupos ZOL e as terapias ($p < 0,05$) (Figura 18).

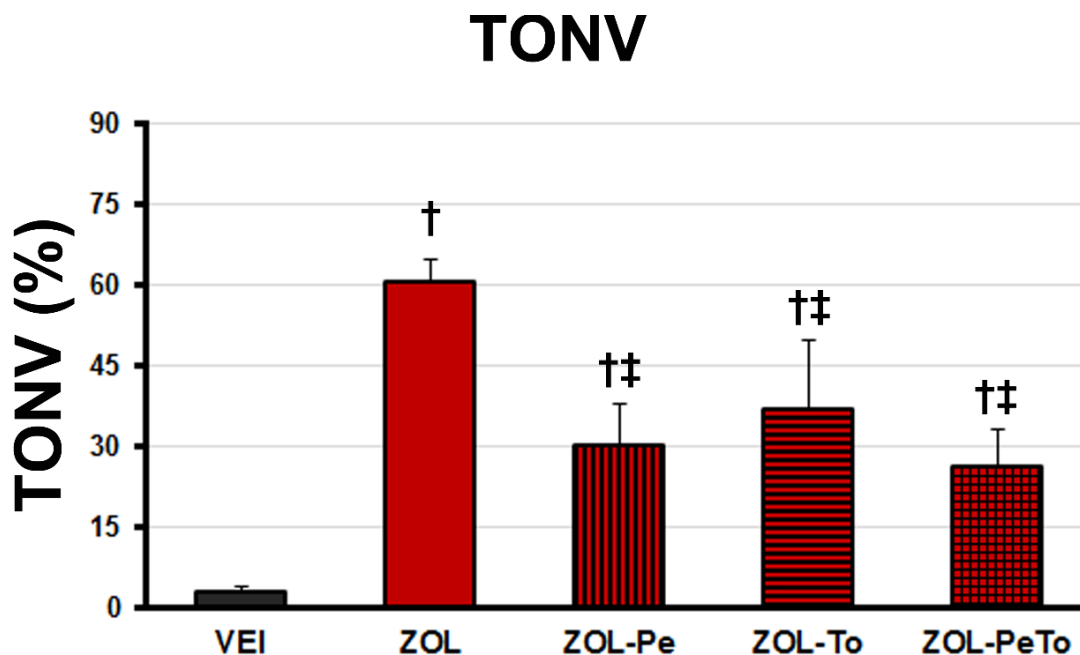


Figura 18. Porcentagem de tecido ósseo não vital (TONV) nas adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia. Testes estatísticos: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL.

6. DISCUSSÃO

MRONJ vem sendo muito investigada desde o princípio devido a seu mecanismo fisiopatológico e manejo. Nos “papers” de posicionamento da AAOMS (2009, 2014, 2022), estes expõem a doença em estágios conforme características clínicas e radiológicas, abordando tratamentos conservadores e cirúrgicos além de fatores de risco para seu desenvolvimento (1, 31, 32). Devido sua etiologia multifatorial, seu manejo se torna dificultado, porém devem, segundo Khan et al. (2015), auxiliar o prognóstico e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (33).

A busca de terapias adjuvantes ao tratamento desta condição é baseada na melhora de reparo de tecido ósseo e mole, já que pacientes que fazem uso dos bifosfonatos apresentam alteração na remodelação tecidual, a qual pode perdurar por até mais de dez anos devido à alta afinidade deste a hidroxiapatita (1, 33). O presente estudo utiliza um modelo experimental mimetizando alteração fisiológica no tecido ósseo através da ovariectomia e aplicação de

doses animais oncológicas de Zoledronato, por ser a medicação mais utilizada para tratamento de alterações osteolíticas, principalmente a osteoporose. Clinicamente, as mulheres que tiverem na menopausa, com a depleção da produção do estrógeno e que desenvolverem a osteoporose com risco de fraturas dos ossos longos ou da coluna vertebral ou cervical, necessitam de doses maiores de antirreabsortivos (4, 33, 34).

Ruggiero et al. (2022) classifica a exodontia e a doença periodontal como os principais fatores de risco para o desenvolvimento de MRONJ, sendo a mandíbula em região de molares a área com maior risco de ocorrência. Além disso, Bohn & Schussel (2015) indicam condições sistêmicas, idade, sexo e tabagismo como associada a MRONJ. A inibição de remodelação óssea somado a dificuldade de angiogênese a nível de tecido mole e condições sistêmicas associadas levam a ocorrência dos sinais clínicos da osteonecrose (2).

O protocolo de Pentoxifilina e Tocoferol aplicado a pacientes foi baseado nos estudos de Delain e Lefaix (2007) e Mcleod et al. (2011) e convertidos para dose animal utilizando a fórmula de Reagan-Shaw et al. (2019) (19, 35, 36). Há uma limitação de estudos pré-clínicos que utilizem a associação destes medicamentos, por esse motivo, este modelo experimental se torna um resultado importante para literatura. Este protocolo medicamentoso foi usado anteriormente para tratamento de osteorradionecrose, evidenciado por Bohn & Schussel (2015) com cicatrização completa de fistulas em quase 90% dos casos com 90 dias de uso (2).

Alterações clínicas frequentemente observadas em pacientes em estágios iniciais e avançados da doença não foram observados nos animais que receberam as terapias isoladamente ou associadas, somente regiões de reparo ósseo tardio, porém sem exposições de tecido ósseo extensa e presença de sinais de infecção. Isso pode ser confirmado através da histologia, em que foi possível observar regiões de tecido ósseo vital através da evidência de lacunas preenchidas com osteócitos.

É importante ressaltar que a Pentoxifilina é contraindicada para cardiopatas, hepatopatas e nefropatas, além de não poder ser associada ao uso de anticoagulantes e hipoglicemiantes, podendo agravar seus efeitos. Essas características podem limitar sua aplicação (2). Neste contexto, foi observado neste estudo que o uso isolado do Tocoferol reproduziu tecido ósseo neoformado de modo semelhante a Pentoxifilina, possivelmente podendo ser prescrito a pacientes que apresentem fatores de risco de complicações relacionadas a mesma e apresentarem os mesmos resultados. Tendo em vista que não há estudos clínicos que investigaram a administração isolada de Tocoferol na prevenção ou tratamento das MRONJ e, também associadas a outras terapias adjuvantes otimizadoras dos tecidos, esses questionamentos clínicos deverão ser investigados num futuro próximo.

A análise histométrica evidenciou maior área de osso neoformado para o grupo VEI em comparação com os demais e as terapias administradas não diferiram entre si nem em comparação ao grupo ZOL. Corroborando com isso, foi observado uma redução significativa da porcentagem de osso não vital para todas as terapias com Pentoxifilina associadas ou não ao Tocoferol na comparação ao ZOL e obtenção de parâmetros microtomográficos que indicam ter aumentado a dinâmica do tecido ósseo com maior porosidade (menor densidade). Os dados deste estudo levam a acreditar na otimização do tecido ósseo com as terapias realizadas. Os próximos passos deste trabalho, com as análises imunoistoquímicas, contribuirão para a confirmação desses achados quanto à dinâmica do tecido ósseo, com ênfase nas respostas de angiogênese.

É evidente que a completa reparação do alvéolo não foi observada e era o esperado, já que há administração de medicações com uma farmacodinâmica sérica e não está proposto, neste momento, a reconstrução ou preservação óssea alveolar. É necessário compreender que altas doses de ZOL, como outros bifosfonatos que tem alto nível sérico, a proposta deve ser de entendimento da patofisiologia tanto do desenvolvimento da MRONJ, como da sua prevenção. E como inferido por Bohn & Schussel (2015), além das medicações aqui testada, a associação com um protocolo de antibioticoterapia e a cirurgia para remoção de sequestros, podem favorecer ainda mais a reparação tecidual (2).

7. CONCLUSÃO

Diante do exposto, pode-se inferir que a Pentoxifilina e o Tocoferol associados ou administrados de forma isolados (PENTO ou TOCO) atuam de modo benéfico no tratamento ou evitando a ocorrência da MRONJ, melhorando a qualidade tecidual, permitindo manutenção clínica local e osteogênese.

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 Jaw—2022 Update. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2022.
2. Bohn JC, Schussel JL, Stramandinoli-Zanicotti RT, Sassi LM. Tissue repair in osteoradionecrosis using pentoxifylline and tocopherol—report of three cases. *Oral and maxillofacial surgery*. 2016;20(1):97-101.
3. Fitzpatrick SG, Stavropoulos MF, Bowers LM, Neuman AN, Hinkson DW, Green JG, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws in 3 osteoporotic patients with history of oral bisphosphonate use treated with single yearly zoledronic acid infusion. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;70(2):325-30.
4. Heifetz-Li JJ, Abdelsamie S, Campbell CB, Roth S, Fielding AF, Mulligan JP. Systematic review of the use of pentoxifylline and tocopherol for the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2019;128(5):491-7. e2.
5. Zavras AI, Zhu S. Bisphosphonates are associated with increased risk for jaw surgery in medical claims data: is it osteonecrosis? *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2006;64(6):917-23.
6. Rosenberg TJ, Ruggiero S. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2003;61(8):60.
7. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2004;62(5):527-34.
8. Statkiewicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, de Sá DP, Casatti CA, Issa JPM, et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2018;184:7-17.
9. 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. *Journal of clinical densitometry*. 2017;20(1):8-24.

10. McGowan K, McGowan T, Ivanovski S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: A systematic review. *Oral Diseases*. 2018;24(4):527-36.
11. 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. *Journal of Cranio- Maxillofacial Surgery*. 2012;40(4):303-9.
12. Dimopoulos M, Kastritis E, Bamia C, Melakopoulos I, Gika D, Roussou M, et al. Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. *Annals of Oncology*. 2009;20(1):117-20.
13. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone*. 2019;120:101-13.
14. Momesso GAC, Lemos CAA, Santiago-Júnior JF, Faverani LP, Pellizzer EP. Laser surgery in management of medication-related osteonecrosis of the jaws: a meta- analysis. *Oral and maxillofacial surgery*. 2020;24(2):133-44.
15. Assaf AT, Zrnc TA, Riecke B, Wikner J, Zustin J, Friedrich RE, et al. Intraoperative efficiency of fluorescence imaging by Visually Enhanced Lesion Scope (VELscope®) in patients with bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2014;42(5):e157-e64.
16. Delanian S, Lefaix J. Complete healing of severe osteoradionecrosis with treatment combining pentoxifylline, tocopherol and clodronate. *The British journal of radiology*. 2002;75(893):467-9.
17. Delfrate G. Efeito da administração de pentoxifilina e α -tocoferol na osteonecrose de mandíbula induzida por bifosfonato: antes e depois da exodontia. 2021.
18. Andersen ML, Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação: Departamento de Psicobiologia. Escola Paulista de Medicina. Universidade ...; 2004.
19. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB journal*. 2008;22(3):659-61.
20. Evans HM, Long J. Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1922;8(3):38.
21. Luvizuto ER, Dias SMD, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia Jr IR, Okamoto R, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone*. 2010;46(4):1021-9.

22. Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SMD, Okamoto T, Dornelles RCM, Garcia Jr IR, et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Archives of oral biology*. 2010;55(1):52-9.
23. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *Journal of biomedical optics*. 2015;20(3):038003.
24. Toro LF, de Mello-Neto JM, Dos Santos FFV, Ferreira LC, Statkiewicz C, Cintra LTÂ, et al. Application of Autologous Platelet-Rich Plasma on Tooth Extraction Site Prevents Occurrence of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws in Rats. *Scientificreports*. 2019;9(1):1-15.
25. Aghaloo T, Hazboun R, Tetradis S. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaws. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics*. 2015;27(4):489-96.
26. Song M, Alshaikh A, Kim T, Kim S, Dang M, Mehrazarin S, et al. Preexisting periapical inflammatory condition exacerbates tooth extraction-induced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw lesions in mice. *Journal of endodontics*. 2016;42(11):1641-6.
27. Thumbigere-Math V, Michalowicz BS, Hodges JS, Tsai ML, Swenson KK, Rockwell L, et al. Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of periodontology*. 2014;85(2):226-33.
28. Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M, Bassorgun I, Ozler M, Oter S, et al. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2014;43(6):777-83.
29. Kan B, Sencimen M, Bayar GR, Korkusuz P, Coskun AT, Korkmaz A, et al. Histomorphometric and microtomographic evaluation of the effects of hyperbaric oxygen and systemic ozone, used alone and in combination, on calvarial defect healing in rats. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2015;73(6):1231. e1-. e10.
30. MacKay JW, Murray PJ, Kasmai B, Johnson G, Donell ST, Toms AP. Subchondral bone in osteoarthritis: association between MRI texture analysis and histomorphometry. *Osteoarthritis and cartilage*. 2017;25(5):700-7.
31. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws—2009 update. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2009;67(5):2-12.
32. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw—2014 update. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2014;72(10):1938-56.

33. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2015;30(1):3-23.
34. Jasper V, Laurence V, Maximiliaan S, Ferri J, Nicot R, Constantinus P. Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) stage III: Conservative and conservative surgical approaches versus an aggressive surgical intervention: A systematic review. *J Craniomaxillofac Surg*. 2020;20:S1010-5182.
35. Delanian S, Lefaix J-L, editors. Current management for late normal tissue injury: radiation-induced fibrosis and necrosis. *Seminars in radiation oncology*; 2007: Elsevier.
36. Mcleod N, Pratt C, Mellor T, Brennan P. Pentoxifylline and tocopherol in the management of patients with osteoradionecrosis, the Portsmouth experience. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;50(1):41-4.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito da Pentoxifilina e Tocoferol no tratamento de osteonecrose dos maxilares após a exodontia em ratas ovariectomizadas e tratadas com medicação antirreabsortiva", Processo FOA nº 0096-2022, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Fevereiro de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Março de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Maio de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Effect of Pentoxifyllie and Tocopherol in the treatment of osteonecrosis of jaws after tooth extraction in ovariectomized rats treated with antiresorptive medication", Protocol FOA nº 0096-2022, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on February 24, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 31, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 01, 2023.

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