

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA - CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANDRÉ CARVALHO RODRIGUEZ

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO E
MAGNETOTERAPIA NO TECIDO ÓSSEO E GENGIVAL COMO
TRATAMENTO ADJUVANTE NA OSTEONECROSE DE MANDIBULA
INDUZIDA PELO USO DE BISFOSFONATOS EM MODELO ANIMAL**

**São Paulo, SP
2023**

ANDRÉ CARVALHO RODRIGUEZ

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO E
MAGNETOTERAPIA NO TECIDO ÓSSEO E GENGIVAL COMO
TRATAMENTO ADJUVANTE NA OSTEONECROSE DE MANDIBULA
INDUZIDA PELO USO DE BISFOSFONATOS EM MODELO ANIMAL**

Tese apresentada à Universidade
Nove de Julho para obtenção do título
de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina
Chavantes.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Stella
Regina Zamuner

**São Paulo, SP
2023**

Rodriguez, André Carvalho.

Avaliação dos efeitos da terapia de fotobiomodulação e magnetoterapia no tecido ósseo e gengival como tratamento adjuvante na osteonecrose de mandíbula induzida pelo uso de bisfosfonatos em modelo animal. / André Carvalho Rodriguez. 2023.

66 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2023.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Chavantes.

1. Bisfosfonatos. 2. Osteonecrose dos maxilares. 3. Fotobiomodulação. 4. Laser de baixa intensidade. 5. Campo magnético pulsado.

I. Chavantes, Maria Cristina. II. Título

CDU 616

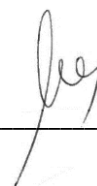
São Paulo, 12 de dezembro de 2023.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: **ANDRÉ CARVALHO RODRIGUEZ**

Título da tese: **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO E MAGNETOTERAPIA COMO TRATAMENTO ADJUVANTE EM OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA PELO USO DE BISFOSFONATOS EM MODELO ANIMAL.**

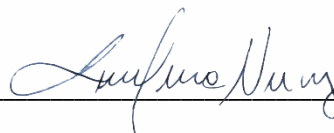
Presidente: PROFA. DRA. MARIA CRISTINA CHAVANTES _____



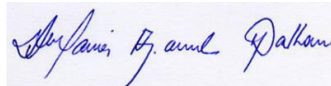
Membro: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR _____



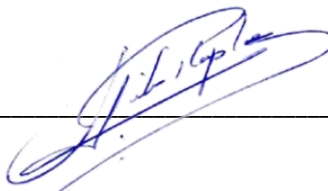
Membro: PROFA. DRA. SILVIA CRISTINA NUNEZ _____



Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI _____



Membro: PROF. DR. HÉLIO PLAPLER _____



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as portas abertas, unindo amor ao trabalho; o auxílio das pessoas envolvidas, que foram fundamentais para superar os desafios.

Gratidão a minha família que soube dar suporte e entender os momentos de ausência por trabalho e estresse.

Muito obrigado a minha orientadora Cristina e co-orientadora Stella por toda paciência e ensinamentos.

Obrigado especial a toda equipe do Biotério, sem a qual não seria possível realizar este trabalho.

E finalmente aos meus pais, por toda estrutura familiar e valores passados desde a infância.

RESUMO

Bisfosfonatos são medicamentos que, inibem a reabsorção óssea, usados para tratar doenças do metabolismo ósseo como a osteoporose, e até mesmo os casos de osteopenia, podendo levar a sérios efeitos adversos, como a osteonecrose dos maxilares (Medication Related Osteonecrosis of the Jaws - MRONJ) com complicações mutilantes, comprometendo a qualidade de vida destes pacientes. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta inflamatória e mecanismos de ação da Fotobiomodulação e Magnetoterapia, no tratamento da osteonecrose medicamentosa dos maxilares, induzida em animais. Metodologia: 77 Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) foram divididos em 5 grupos, sendo constituídos de um grupo controle sem osteonecrose e, os demais associando o tratamento cirúrgico padrão-ouro, com laserterapia e/ou magnetoterapia adjuvantes. As aplicações dos aparelhos de energia nos respectivos grupos experimentais foram realizadas nos tempos: T0 pós-operatório imediato, T1 em 24h e T2 em 7 dias e as eutanásias realizadas em três tempos: 24h, 7 dias e 14 dias. Posteriormente, todos os ratos foram eutanasiados. As avaliações foram feitas através de análises histopatológica e contagem de células. A análise estatística dos resultados demonstrou que a utilização separada dos equipamentos foi melhor, o Grupo Laser denotou resultados superiores no tecido gengival e tanto o Grupo Laser quanto o Grupo Magneto exibiram maior atividade óssea, favorecendo a ossificação da região, concluindo que a ação dos equipamentos baseados em energia foi eficiente para acelerar a reparação tecidual.

Palavras-chave: Bisfosfonatos, Osteonecrose dos maxilares, fotobiomodulação, Laser de baixa intensidade, campo magnético pulsado

ABSTRACT

Bisphosphonates are medications that inhibit bone reabsorption, used to treat bone metastasis, metabolism diseases such as osteoporosis, and even cases of osteopenia. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws (MRONJ) is an adverse side effect of antiresorptive and antiangiogenic medications with mutilating complications, compromising the quality of life of these patients. The aim of this study was to evaluate the inflammatory response and mechanisms of action of Photobiomodulation and Magnetotherapy, as adjuvant in MRONJ, caused in animals. Methods: 77 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were divided into 5 groups, consisting of a control group without osteonecrosis and the others combining gold standard surgical treatment, with adjuvant Low Level Laser Therapy and/or Pulsed electromagnetic therapy. Assessments were completed through histopathological analysis and cell counting. The statistical analysis of results demonstrated that the equipment use of the equipment had better effect, the Laser Group determined superior results in the gingival tissue and both the Laser Group. The Magnetotherapy Group exhibited greater bone activity, favoring the necrotic region ossification. Then, it was possible to conclude that the action of the energy based devices were more efficient to decrease the inflammation process and repairing necrotic tissues as well as speeding up the region damage by bone recovering through these technological accessories.

Key words: Bisphosphonates, Osteonecrosis of the Jaws, Medication related osteonecrosis of the jaws (MRONJ), Photobiomodulation, low level laser therapy, Pulsed electromagnetic field-PEMF (Magnetic therapy).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

Figura 1: Disposição das células ósseas no tecido

Figura 2: Epitélio gengival

Figura 3: Procedimento para estabelecimento de MRONJ em modelos de roedores

Figura 4: Fluxograma para indução de osteonecrose e tratamento

Figura 5: Aparelho de Laser THERAPY EC, DMC, São Carlos, SP, Brasil

Figura 6: Dosimetria do Laser

Figura 7: Aparelho Magnetoterapia Neospin

Figura 8: Dosimetria da magnetoterapia

Figura 9: Quantificação de células

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Medidas-resumo da contagem de células do grupo controle

Tabela 2: Medidas-resumo da contagem de células na osteonecrose (ON) no tempo 0, por grupos

Tabela 3: Medidas-resumo da contagem de células da gengiva por grupo, nos tempos 1, 7 e 14 dias

Tabela 4: Medidas-resumo da contagem de células do osso por grupo, nos tempos 1, 7 e 14 dias

LISTA DE GRÁFICOS:

Gráfico 1: Médias e desvio padrão da contagem de células na osteonecrose (ON) no tempo 0, por grupos

Gráfico 2: Médias e desvio padrão da contagem de leucócitos da gengiva por grupo - 1 dia pós intervenção

Gráfico 3: Médias e desvio padrão da contagem de fibroblastos da gengiva por grupo - 1 dia pós intervenção

Gráfico 4: Médias e desvio padrão da contagem de vasos sanguíneos da gengiva por grupo - 1 dia pós intervenção

Gráfico 5: Médias e desvio padrão da contagem de queratinócitos da gengiva por grupo - 1 dia pós intervenção

Gráfico 6: Médias e desvio padrão da contagem de leucócitos da gengiva por grupo - 7 dias pós intervenção

Gráfico 7: Médias e desvio padrão da contagem de fibroblastos da gengiva por grupo - 7 dias pós intervenção

Gráfico 8: Médias e desvio padrão da contagem de vasos sanguíneos da gengiva por grupo - 7 dias pós intervenção

Gráfico 9: Médias e desvio padrão da contagem de queratinócitos da gengiva por grupo - 7 dias pós intervenção

Gráfico 10: Médias e desvio padrão da contagem de leucócitos da gengiva por grupo - 14 dias pós intervenção

Gráfico 11: Médias e desvio padrão da contagem de fibroblastos da gengiva por grupo - 14 dias pós intervenção

Gráfico 12: Médias e desvio padrão da contagem de vasos sanguíneos da gengiva por grupo - 14 dias pós intervenção

Gráfico 13: Médias e desvio padrão da contagem de queratinócitos da gengiva por grupo - 14 dias pós intervenção

Gráfico 14: Médias e desvio padrão da contagem de osteócitos por grupo - 1 dia pós intervenção

Gráfico 15: Médias e desvio padrão da contagem de osteoclastos por grupo - 1 dia pós intervenção

Gráfico 16: Médias e desvio padrão da contagem de osteoblastos por grupo - 1 dia pós intervenção

Gráfico 17: Médias e desvio padrão da contagem de osteócitos por grupo - 7 dias pós intervenção

Gráfico 18: Médias e desvio padrão da contagem de osteoclastos por grupo - 7 dias pós intervenção

Gráfico 19: Médias e desvio padrão da contagem de osteoblastos por grupo - 7 dias pós intervenção

Gráfico 20: Médias e desvio padrão da contagem de osteócitos por grupo – 14 dias pós intervenção

Gráfico 21: Médias e desvio padrão da contagem de osteoclastos por grupo – 14 dias pós intervenção

Gráfico 22: Médias e desvio padrão da contagem de osteoblastos por grupo – 14 dias pós intervenção

LISTA DE ABREVIATURAS:

AAOMS: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

ABE : Aparelhos baseados em energia

ADA: American Dental Association

ANOVA: Análise de variância

BFs: Bisfosfonatos

BRONJ: Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaws

Ca: Cálcio

CEMPBF: Campos eletromagnéticos pulsados de baixa frequência

CEUA: Comissão de ética no uso de animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CMO: Campo magnético oscilante

FDA: Food and Drug Administration

HE: Hematoxilina-Eosina

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

K: Potássio

LASER: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LBI: Laser de Baixa Intensidade

LPS: Lipopolissacarídeo

MAG: Magnetoterapia

MRONJ: Medication related osteonecrosis of the Jaws

Na: Sódio

nm: nanometros

ON: Osteonecrose dos maxilares

OPGL: Osteoprotegerina

PCR: Proteina C reativa

PDT: Photodynamic therapy (Terapia fotodinâmica)

PEMF: Pulsed electromagnetic field

RANKL: Receptor ativador do NFk B ligante

TNF-alfa: Fator de necrose tumoral alfa

Sumário

1. INTRODUÇÃO12

- 1.2 OSTEONECROSE DOS MAXILARES17
- 1.3. OSTEONECROSE EM MODELO ANIMAL21
- 1.4. LASER22
- 1.5. MAGNETOTERAPIA24
- 1.6. JUSTIFICATIVA25
- 1.7 HIPÓTESE26

2. OBJETIVO27

3. MATERIAIS E MÉTODOS28

- 3.1. CEUA28
- 3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS28
- 3.3. AVALIAÇÕES35
- 3.4. LOCAL DE PESQUISA36
- 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA37

4. RESULTADOS38

5. DISCUSSÃO55

6. CONCLUSÃO63

7. CONSIDERAÇÕES FUTURAS64

8. REFERÊNCIAS65

1. INTRODUÇÃO

Os Bisfosfonatos (BFs) são medicamentos antirreabsortivos eficazes no tratamento de complicações ao tecido ósseo relacionadas ao câncer, como compressão da medula, fraturas patológicas por fragilidade e prevenção de metástases de tumores sólidos como câncer de mama, próstata e pulmão. Tem efeito positivo na qualidade de vida dos pacientes, reduzindo e prevenindo eventos relacionados ao esqueleto (RUGGIERO, 2022).

Porém, efeitos adversos ao tratamento com tais medicamentos são mencionados na literatura, como: a hipocalcemia, função renal prejudicada, complicações no trato digestivo como úlcera esofágica, fraturas atípicas de fêmur, fibrilação atrial e a osteonecrose dos maxilares (FLEISHER, 2016).

Medication related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) é um efeito colateral adverso raro, mas potencialmente grave, de medicamentos antirreabsortivos e antiangiogênicos. O risco de MRONJ entre estudos em pacientes tratados com bisfosfonatos por via oral é de 0,02% a 0,05%, porém em pacientes tratados com a medicação intravenosa (IV), o risco estimado é de até 18 % (RUGGIERO, 2022).

O tratamento clínico da osteonecrose dos maxilares consiste em melhorar os sinais e sintomas, tratando a infecção, reduzindo a inflamação em tecido mole e duro, diminuindo o tamanho das lesões e limitando a dor. (FLIEFEL, 2015).

O tratamento conservador pode durar meses, com consultas frequentes causando efeitos adversos, tais como resistência microbiana e surgimento de infecções oportunistas, como a candidíase oral, agravando as condições locais (MARX, 2003).

Já o tratamento cirúrgico, com remoção do osso necrótico e sequestro ósseo, obtendo margens sangrantes para torná-las mais acessíveis aos antibióticos, apresenta taxas de sucesso superiores comparadas com o tratamento conservador (85% a 20%) (LESCLOUS, 2014).

Tratamentos adjuvantes, como: câmara hiperbárica, teriparatida, pentoxifilina, alpha-tocopherol, ozônioterapia, terapia com laser de baixa potência, terapia fotodinâmica, também são utilizados (FLIEFEL, 2015).

Para estudar o desenvolvimento e progressão de doenças, modelos animais são usados não apenas para testar novos tratamentos, mas também, antes de serem administrados a humanos (AGUIRRE, 2021).

Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a resposta inflamatória e mecanismo de ação de tratamentos adjuvantes com aparelhos baseados em energia (Laser e Magneto), na osteonecrose de mandíbula relacionada ao uso de bisfosfonatos, induzida em modelo animal.

1.1 INFLAMAÇÃO E REPARO:

O termo inflamação tem origem no latim, *inflammatione*, advindo de *inflammare*, que significa converter em chamas, acender, do Grego. Como sinônimo temos, *phlogosis*, ação de inflamar, com objetivo de destruir agentes agressores e restabelecer a área lesada. Tal agressão inicia com lesão celular, causando um estresse, onde a célula pode se adaptar e voltar ao normal ou necrosar e induzir ao processo inflamatório crônico (CONSOLARO, 2009).

Em uma extração dentária, por exemplo, toxinas provenientes da injúria tecidual provocam uma cascata de eventos fisiológicos com o objetivo de regressar à homeostase primária (LECHNER, 2022).

Após uma extração dentária o alvéolo se enche de sangue, coagula e permite migração celular principalmente de leucócitos e células mesenquimais do ligamento periodontal, produzindo um tecido de granulação. Este é gradualmente substituído por um tecido conjuntivo provisório, um tecido ósseo imaturo em 48/72h, osso imaturo em 7 dias, osso reticular em 30 dias, sendo modificado por osso lamelar e medular por remodelamento através dos osteoclastos e osteoblastos de 60 a 180 dias. (LECHNER, 2022).

A reação inflamatória local é acompanhada por uma reação sistêmica, onde na fase aguda, citocinas como a IL-1, IL-6, TNF-alfa são produzidas no

local da inflamação e induzem a produção de proteínas como a proteína C-reativa (PCR) (LECHNER, 2022).

A liberação de proteínas pela necrose, é detectada por mastócitos, que liberam mediadores químicos como a Histamina, atuando em células endoteliais aumentando a permeabilidade vascular e promovendo quimiotaxia, permitindo a saída de exsudato e atração de leucócitos (CONSOLARO, 2009).

No infiltrado inflamatório, as primeiras células de defesa, da fase inicial de inflamação, são os neutrófilos, seguidos dos macrófagos após algumas horas e depois os linfócitos (CONSOLARO, 2009).

Os neutrófilos produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana. Os macrófagos são as principais células antes dos fibroblastos, os quais contribuem na angiogênese, fibroplastia e síntese da matriz extracelular (LECHNER, 2022).

Nos casos em que o processo inflamatório agudo não é resolvido, seja por fatores locais, sistêmicos, hormonais ou alteração no metabolismo ósseo, pode se resultar em uma resposta crônica. Assim macrófagos e linfócitos T vão liberar citocinas que estimulam a proliferação de fibroblastos, levando ao aumento da produção de colágeno, que induzem a formação de um tecido conjuntivo inativo, culminando na fibrose, formando osso imaturo com células de gordura (LECHNER, 2022).

A homeostase do sistema esquelético está ligada ao equilíbrio de fatores imunológicos, hormonais e remodelação óssea balanceada através dos osteoclastos e osteoblastos. O desequilíbrio neste sistema pode levar a doenças inflamatórias (LECHNER, 2022).

Os osteoblastos constituem as principais células envolvidas na formação óssea, são células provenientes dos pré-osteoblastos, que secretam proteínas colágenas e não colágenas, os proteoglicanos da matriz óssea, como as metaloproteinases e as citocinas. Osteoblastos são responsáveis pela aposição de novo tecido ósseo e matriz extracelular óssea, bem como pelo controle da mineralização desta matriz. Estas células estão localizadas na superfície óssea e podem se diferenciar em dois tipos celulares: células ósseas de recobrimento e osteócitos. Quando os osteoblastos ficam alojados nas lacunas ósseas, que

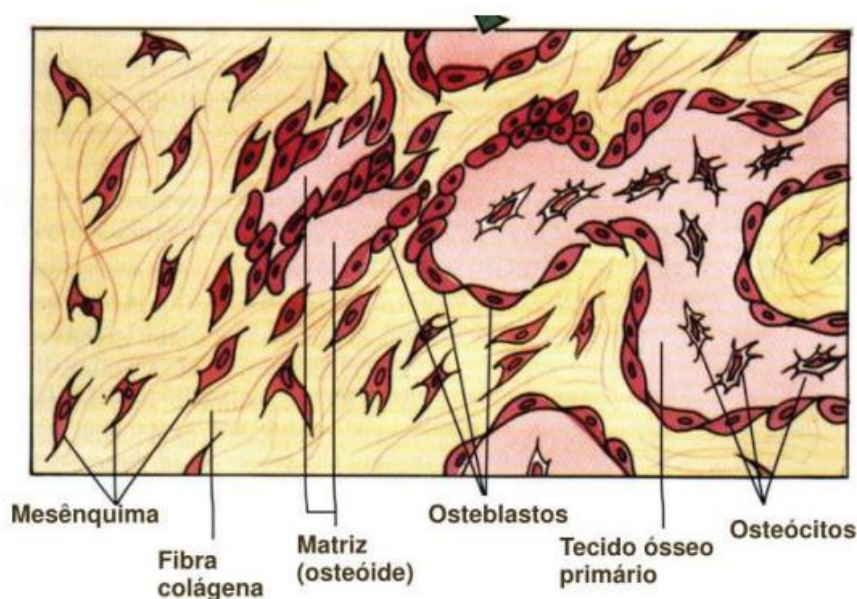
estes próprios produziram, estes perdem a capacidade de produzir matriz e se tornam osteócitos, que são células de formato estrelado, ficam ligadas entre si e conectadas aos osteoblastos. Estas são as células mais abundantes no osso (mais de 90%) e regulam a atividade de remodelação óssea local, ao coordenar a função dos osteoblastos e osteoclastos (ALLEN, 2014).

Os osteoclastos são as principais células envolvidas na reabsorção óssea, com capacidade de degradar as matrizes orgânica e inorgânica do osso. Estas são células grandes e multinucleadas derivadas de células hematopoiéticas, pertencentes à linhagem dos monócitos/macrófagos, possuem aspecto multinucleado, produzindo ácidos e colagenase para dissolver a matriz. Caso haja aumento dos índices de fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), o osteoclasto sofre apoptose, incorrendo em morte celular (ALLEN, 2014).

Células tronco mesenquimais podem diferenciar-se e proliferar-se em células formadoras de tecido ósseo, células condrogênicas, miogênicas, perióstio, endóstio e adiposas. Células tronco da medula óssea podem se diferenciar em osteócitos, osteoblastos, adipócitos e condrócitos (LECHNER, 2022).

Uma vez que o osteoblasto foi formado, pode secretar várias proteínas da matriz extracelular para controlar a mineralização óssea, estando relacionado ao crescimento ósseo a proliferação, maturação e diferenciação destas células em osteócitos (Figura1) (LECHNER, 2022).

Figura 1: Disposição das células ósseas no tecido.



Na reparação, as plaquetas e macrófagos promovem a liberação de vários fatores de crescimento que associados à IL-1 e TNF-alfa estimulam a proliferação e migração dos fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas do tecido conjuntivo vizinho para a área lesada, induzindo a síntese de nova matriz de colágeno (CONSOLARO, 2009).

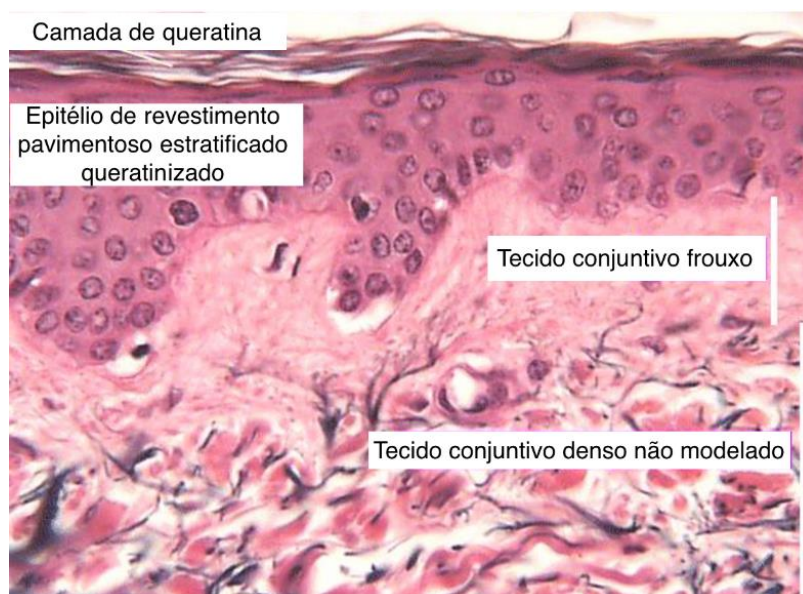
Após a limpeza da área, há início da fase proliferativa, com formação de tecido de granulação, por células endoteliais, fibroblastos jovens, células mesenquimais, neoformação de vasos sanguíneos, células inflamatórias mononucleares, que são atraídas por mediadores químicos (CONSOLARO, 2009).

Os fibroblastos iniciam gradativamente a produção da matriz celular e colágeno, que dará origem a um tecido conjuntivo fibroso e sofrerá um processo de maturação e remodelação (CONSOLARO, 2009).

A indução epitelial ocorre naturalmente nas feridas da mucosa oral através da ativação de mediadores químicos e receptores que promovem a migração celular das camadas basais (CONSOLARO, 2009).

Histologicamente a gengiva é constituída de uma camada de tecido conjuntivo denso e fibroso recoberto por um epitélio escamoso estratificado (malpighiano). O epitélio da gengiva marginal e inserida (ao redor do dente) apresenta-se queratinizado. Tal epitélio consiste de quatro camadas: basal, espinhosa, granulosa e córnea (KUCHINSKI, 1995).

Figura 2: Epitélio gengival



A queratina é uma proteína fibrosa de grande resistência produzida pelos queratinócitos, que forma uma barreira protetora e impermeável a água.

Na paraqueratinização as células apresentam núcleos picnóticos e condensados, mostrando sinais de queratinização até morrerem desaparecendo os núcleos e organelas, devido ao processo de cornificação se dar rapidamente, levando a transformação incompleta de células córneas (KUCHINSKI, 1995).

1.2 OSTEONECROSE DOS MAXILARES

Marx, RE (2003) fez o primeiro relato de osteonecrose dos maxilares pelo uso de Bisfosfonatos, identificando 36 casos de exposição óssea dolorosa na mandíbula e maxila, que não responderam à cirurgia ou tratamentos médicos. Todos os pacientes estavam recebendo BFs (Pamidronato ou Ác. Zoledrônico).

Em seguida, Migliorati, CA (2003), relatou cinco casos de pacientes medicados com BFs (Pamidronato e Ác. Zoledrônico), que apresentaram necrose óssea intraoral. Três pacientes apresentaram necrose óssea espontânea na região interna posterior da mandíbula e duas na região molar após uma extração dentária. O osso necrótico exposto em todos os casos estava infectado e a área dolorida. Os pacientes queixaram-se de dificuldade para comer, falar e realizar a higiene bucal, devido a necrose óssea avascular.

Bisfosfonatos (BFs) são medicamentos que inibem a precipitação do fosfato de cálcio, diminuem a calcificação e a reabsorção óssea, reduzindo a ação osteoclástica através da indução à apoptose (FLEIFEL, 2015).

Sua prescrição era restrita a doenças que interferiam no metabolismo ósseo, como: a doença de Paget, a hipercalemia maligna, metástases ósseas, lesões osteolíticas e o mieloma múltiplo. Porém, têm sido muito prescritos para o tratamento das osteoporoses e até mesmo de forma profilática para as osteopenias (FLIEFEL, 2015).

Os osteoblastos são responsáveis pelo recrutamento e ativação dos osteoclastos através da interação do “receptor ativador do NFκ B ligante” (RANKL), com o receptor RANK sempre presente nas células hematopoiéticas precursoras dos osteoclastos. O ativador do receptor do fator RANKL é uma

proteína solúvel transmembranal, produzida por osteoblastos e se localiza na membrana celular dos osteoclastos e no pré-osteoclastos (GUYTON, 2011).

Para manutenção desta interação, os osteoblastos também secretam a osteo-protegerina (OPG), um receptor solúvel, que compete com RANKL pelo RANK para inibir o recrutamento dos osteoclastos e controlar, portanto, o equilíbrio osteoblasto-osteoclasto (DOUGLAS, 1988).

A Osteoprotegerina (OPG) é um sinal solúvel de ocorrência natural "receptor chamariz" para RANKL e inibe atividade de osteoclastos por ligação a RANKL, impedindo sua interação com o RANK. Ambos RANKL e OPG são produzidos por osteoblastos (VIERECK, 2002).

Os bisfosfonatos inibem a expressão de RANKL, bem como estimulam a produção da OPG pelas células da medula óssea e pelos osteoblastos, inibindo a interação RANK-RANKL. Essas ações sinérgicas levam à diminuição do recrutamento dos osteoclastos e, conseqüentemente, à redução da reabsorção óssea (NISHIDA, 2005).

Os mecanismos de ação dos BFs no metabolismo ósseo são complexos e multifatoriais, reduzindo a bomba de prótons com alteração de pH e equilíbrio ácido básico. A liberação inicial de BFs ocorre por adsorção ao mineral ósseo, prolongando-se por um período de semanas a anos. Durante reabsorção óssea, o pH ácido na lacuna de reabsorção, incrementa a dissociação da droga no osso (OTTO, 2016).

Além disso, os BFs também agem, bloqueando o recrutamento ativação e diferenciação dos precursores de osteoclastos, inibindo assim a proliferação dos macrófagos e interferindo na quimiotaxia e na fixação de osteoclastos ao osso. Diminuem também, a transformação de pré-osteoclastos em osteoclastos através das células da medula óssea, pela ação indireta, via osteoblastos. Tal fato, diminui o número de osteoclastos, além de alterar seu citoesqueleto, despolimerizando os microtúbulos e retraindo a membrana rugosa, dificultando, desta maneira a sua adesão ao osso (OTTO, 2016).

Os BFs possuem baixa absorção, quando administrados por via oral, apenas 1% da dose é efetiva, devido a baixa afinidade por lipídeos e sua polaridade com carga negativa, dificultando o transporte celular. Após a

absorção a droga é distribuída por via sanguínea, armazenada nos ossos e excretada pelos rins (BARTL, 2007).

A exposição óssea e a dor são as complicações frequentes, prejudicando a função mastigatória e sobretudo reduzindo bastante a qualidade de vida dos pacientes (CAMPISI, 2020).

ON é o termo utilizado para descrever a morte das células ósseas, quando o osteócito fica necrótico. A necrose destrói, também, células do endotélio vascular no interior do tecido ósseo, prejudicando o fluxo sanguíneo dentro do vaso (RUGGIERO, 2014).

É o termo sugerido para lesões intra-bucais com exposição óssea, que simulam abscessos dentais ou osteomielites, em pacientes submetidos a terapia com bisfosfonatos e que não tenham sido submetidos a radioterapia na região de cabeça e pescoço (FLIEFEL, 2015).

Os principais aspectos clínicos da osteonecrose dos maxilares são: áreas com exposição óssea na cavidade oral, com osso desvitalizado, com coloração amarelada, inflamação tecidual ao redor da exposição óssea, presença de sintomatologia dolorosa e com odor característico (BARTL, 2007).

Foi proposta pela primeira vez a sua nomenclatura "Bisphosphonates Related Osteonecrosis of the Jaws" (BRONJ), pela *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* - AAOMS (RUGGIERO, 2014) e posteriormente, denominado "Medication related osteonecrosis of the Jaws (MRONJ)" devido a relatos clínicos de osteonecrose da mandíbula relacionada a outros medicamentos anti-reabsortivos, como o denosumabe (OTTO, 2016).

MRONJ deve ser diagnosticada por presença de osso exposto em região intraoral que persistiu por mais de 8 semanas, com história de tratamento com medicação antirreabsortiva isolada ou associada com moduladores de imunoglobulina ou medicamentos antiangiogênicos e sem histórico de radioterapia nos maxilares (RUGGIERO, 2022).

Segundo Ruggiero (2022) foi mantida a classificação das osteonecroses de acordo com a normativa da Associação Americana de Cirurgiões Maxilo Faciais (AAOMS) de 2014.

ESTÁGIO 0, pacientes sem evidência clínica de osso necrótico, mas que apresentam sintomas inespecíficos ou e achados radiográficos.

ESTÁGIO 1, osso exposto e necrótico, assintomático, sem evidência de infecção, apresentando achados radiográficos na região óssea alveolar.

ESTÁGIO 2, osso exposto e necrótico, com ou sem fístula e evidência de infecção / inflamação, com sintomatologia e achados radiográficos locais.

ESTÁGIO 3, osso exposto e necrótico com fístula e evidências de infecção, estendendo-se além da região do osso alveolar, ou seja, borda inferior e ramo da mandíbula, seio maxilar e zigoma na maxila. Podendo apresentar fratura patológica, fístula extraoral, comunicação oro antral ou oro nasal.

Estratégias de tratamento concentram-se, principalmente, em minimizar a progressão ou ocorrência de necrose óssea, eliminando a dor, controlando a infecção e otimizando a qualidade de vida do paciente (GOKER, 2021).

Diferentes agentes biológicos entre os quais concentrados de plaquetas autólogas, fatores de crescimento e diferenciação recombinantes, hormônio da paratireóide (PTH), teriparatida, vitamina E, terapia com laser de baixa intensidade, oxigênio hiperbárico terapia e terapia com ozônio têm sido usado com sucesso para melhorar a reparação óssea e cicatrização dos tecidos moles em diferentes procedimentos cirúrgicos (GOKER, 2021).

O tratamento padrão *gold standard* para osteonecrose da mandíbula relacionada a medicamentos é a cirurgia. SUYAMA, 2023 em estudo com 206 pacientes submetidos a cirurgia, relatou 258 procedimentos com acompanhamento de três anos, com taxa de cura de 81,7%.

Pacientes sem osteólise e submetidos à remoção do sequestro ou mandibulectomia marginal tiveram prognóstico significativamente pior do que aqueles com osteoporose apresentando osteólise e submetidos à mandibulectomia segmentar (SUYAMA, 2023).

Além disso, pacientes com osteólise residual, reações periostais e osteosclerose na TC tiveram maior probabilidade de desenvolver recorrência. Assim, estas áreas também devem ser incluídas na ressecção (SUYAMA, 2023).

O tratamento cirúrgico é cada vez mais relatado como uma opção viável com alto sucesso e apresentado, como uma opção de tratamento na tentativa de reduzir a progressão da doença, com resultados benéficos ao paciente.

1.3. OSTEONECROSE EM MODELO ANIMAL

A experimentação animal permite realizar procedimentos controlados que modelam fatores de risco clínicos reais da doença. Por exemplo, estudos MRONJ publicados refletem o tratamento com fatores de risco sistêmicos, como Bisfosfonatos nitrogenados, anticorpos anti-RANKL (AGUIRRE, 2021).

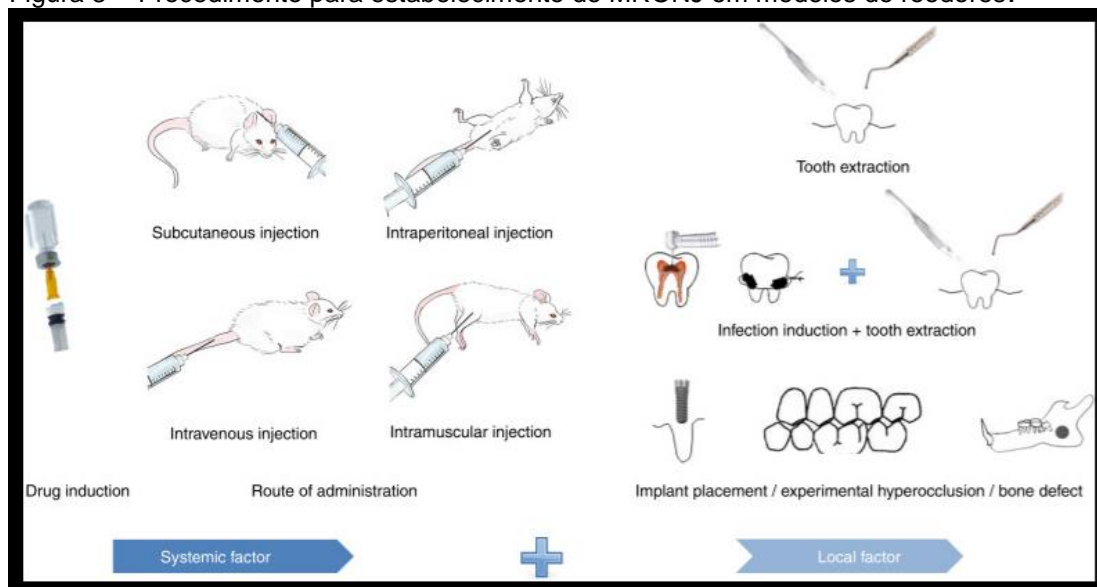
Os modelos MRONJ, também, combinaram a administração de fatores sistêmicos com fatores de risco orais específicos observados pela primeira vez em humanos, incluindo extração de dentes e doença inflamatória (AGUIRRE, 2021).

Estudos farmacológicos sugerem fortemente que o método mais confiável para determinar as doses absorvidas clinicamente relevantes de BFs em qualquer animal é primeiro entender a dose mínima absorvida que previne completamente a perda óssea em animais recém-ovariectomizados (AGUIRRE, 2021).

Em geral, a abordagem para estabelecimento de BRONJ em modelos de roedores consiste, principalmente, em duas etapas: a administração de medicamentos como fator de risco sistêmico e estimulação oral como fator de risco local. Os métodos clássicos, que combinam drogas sistêmicas com extração de dentes saudáveis, atualmente, oferecem a mais previsibilidade para a pesquisa em BRONJ (figura 3) (YAN, 2022).

Para comprovação da osteonecrose a avaliação histológica é o método mais eficaz, caracterizada, principalmente, por osteócitos vazios embora a observação clínica da exposição óssea, a avaliação radiológica e indicadores do soro, também contribuam para o diagnóstico (YAN, 2022).

Figura 3 - Procedimento para estabelecimento de MRONJ em modelos de roedores.



Fonte: de Yan R, Jiang R, Hu L, Deng Y, Wen J, Jiang X. *Establishment and assessment of rodent models of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ)*. A primeira etapa é a administração de drogas com bisfosfonatos por injeção intraperitoneal. O segundo passo é a extração dentária, seguida de mais aplicações da medicação.

Zandi et al. descreveram protocolo para indução de BRONJ com taxa de sucesso aplicada neste estudo de 83%. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 0,06 mg/kg de zoledronato (Zolena[®], Ronak Pharmaceutical, Saveh, Irã) uma vez por semana durante seis semanas, seguido pelas extrações do primeiro e segundo molar mandibular esquerdo no final da sexta semana. As extrações foram realizadas sob anestesia geral com injeção intraperitoneal de 75 mg/kg de cloridrato de quetamina (Ketamine Hydrochloride, Laboratoires Sterop, Bruxelas, Bélgica) e 7,5 mg/kg de midazolam (Midazolam, Chemidarou Industrial Company, Teerã, Irã). As injeções de zoledronato foram continuadas por mais 6 semanas após as extrações dos dentes (ZANDI, 2016).

1.4. FOTOBIMODULAÇÃO

A teoria de Emissão Estimulada do físico Albert Einstein, expôs os princípios físicos deste processo em seu artigo “Zur Quantum Theorie der Strahlung”, de 1917.

A radiação emitida pelo aparelho de Laser denota características próprias, sendo esta uma onda monocromática, coerente e colimada. Tal equipamento permite que esta energia de luz interaja com cromóforos teciduais específicos (hemoglobina e melanina), que tem afinidade pelo comprimento de onda da respectiva luz, no espectro visível do Laser emitido, principalmente, por meio da absorção (CHAVANTES, 2009).

O Laser pode ser classificado, segundo Chavantes, 2009 de acordo com sua potência, em dois grandes grupos: Laser de Alta Potência (LAP) e Laser com Potência Baixa. Em baixa intensidade a radiação óptica interage com um fotorreceptor endógeno, produzindo a biomodulação celular e tecidual.

A fotobiomodulação pode incorrer em dois tipos de ação tissular, a bioestimulação e/ou bioinibição. A ação de biomodulação provocada pelo LBI, dependendo dos parâmetros de utilização (intensidade, duração, comprimento de onda, tamanho do foco e das propriedades ópticas do tecido-alvo), pode provocar tanto estímulo positivo (bioestimulação) quanto inibição (bioinibição) no tecido-alvo irradiado (MESTER, 1985).

Devido a irradiação ser com intensidade bem baixa, a ação biológica advém da ação direta da radiação a nível de fotorreceptores celulares, sobretudo nos componentes da cadeia respiratória nas mitocôndrias, como também, em membranas celulares, a nível de canais de Ca^{++} e bombas de Na^+ e K^+ , tendo uma ação cumulativa e não incorrendo em elevação da temperatura local, sempre $\leq 1^\circ C$. (CHAVANTES, 2009).

Mester, o pioneiro na ciência da modulação biológica, concluiu que o laser empregado com uma potência baixa podia produzir efeitos biológicos, anti-inflamatórios e reparação tissular, induzindo nas células uma estimulação luminosa e observou reações graduais nos tecidos, que nomeou de "photobiostimulation".

Karu, 1988, propôs uma cadeia de eventos moleculares, começando com a absorção de luz em um fotoceptor/fotorreceptor, levando a transdução de sinal, amplificação e resultando em resposta bioelétrica e bioenergética no tecido alvo.

Os efeitos biomodulantes do laser podem auxiliar os processos de reparação, elevando a matriz inorgânica do osso e osteoblastos, estimulando o crescimento dos capilares linfáticos e sanguíneos, facilitando à proliferação celular e cicatrização dos tecidos.

Comprimentos de onda (600–1000nm) do LBI têm propriedades fotobiomoduladoras, tais como: a proliferação de osteoblastos, formação de colágeno, facilitando a regeneração óssea, alívio da dor, melhora a cicatrização de feridas, a reparação nervosa, além da reepitelização tissular.

1.5. MAGNETOTERAPIA

Em 1979, *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) aprovou pela primeira vez, o uso de um campo magnético oscilante (CMO) ou *pulsed electromagnetic field* (PEMF). Desde então, vários estudos foram realizados para demonstrar os benefícios do campo eletromagnético para o tratamento de várias condições, como: edema, osteoartrite, feridas, modulação hemodinâmica e alívio da dor, além do uso estabelecido para a formação óssea (Yoshimura, 2011).

Os mecanismos que explicam a ocorrência destes efeitos observados, no entanto, ainda não estão completamente esclarecidos, considerando os princípios que governam o campo eletromagnético (Yoshimura, 2011).

Campos eletromagnéticos pulsados de baixa frequência (CEMP-BF), são uma importante ferramenta da Fisioterapia ao redor do mundo, por tratar-se de um método não invasivo, seguro e de fácil manejo. Indicado para tratamento da dor, inflamação e regeneração tissular (Silva, 2016).

É possível inferir que, no sistema biológico e organismos vivos, os CMO são onipresentes e constantemente, criados por processos fisiológicos (movimentos celulares, fluxos iônicos, fluidos nos sistemas circulatórios, cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, potenciais de ação nas membranas e, assim, por diante (Yoshimura, 2011).

Suas principais ações são: desvio de partículas com carga elétrica em movimento, produção de correntes induzidas pelo efeito piezoelétrico em tecido ósseo e colágeno. A nível celular normaliza o potencial de membrana, incrementa a solubilidade de substâncias e estimula o metabolismo celular (Meyer, 2011).

Além disso, produz ação antiestresse celular, promove uma aceleração de todos os fenômenos reparadores com ação bio-regenerante, anti-inflamatória e antiedematosa, sem demonstrar efeitos colaterais. Portanto, efeitos biológicos podem resultar da interação desses campos com CMO exógenos (Yoshimura, 2011).

Os efeitos obtidos com CEMP na regeneração óssea não se devem apenas a energia mecânica aplicada aos íons Ca^{++} , fazendo-os vibrar em máxima frequência, transformando esta energia em eletricidade pelo fenômeno piezoelétrico, como também, às respostas dos osteócitos, que liberam por via autócrina e parócrina os fatores moduladores da atividade celular (Meyer, 2011).

Segundo Funk (2009), logo após a ocorrência de uma ferida, um campo elétrico é criado no tecido lesionado, que promove um estímulo primário nas células epiteliais para iniciar o processo de reparação. Este estímulo elétrico causado pela lesão, pode permanecer por várias horas e só cessa quando o tecido é reepitelizado.

Yoshimura (2011), no estudo em patas de camundongos com exposição aguda a campo magnético de baixa intensidade, relatou resultados positivos na regressão do edema induzido por carragenina.

Meyer (2011) em revisão sistemática na base de dados Pubmed, selecionou 36 artigos de 1981 a 2008 relacionados a PEMF, no qual relatou resultados positivos no tecido ósseo em relação a consolidação de fraturas, à osteoporose, à cicatrização, regeneração nervosa e cartilagem articular.

1.6. JUSTIFICATIVA

Com o crescente incremento do uso dos antirreabsortivos no tratamento da osteoporose e, sobretudo, em casos de mulheres na menopausa com

osteopenia, proporcionalmente, surgiu uma maior incidência do principal efeito adverso na região maxilo-mandibular desses fármacos: a osteonecrose dos maxilares.

A terapia padrão *gold standard* proposta para essa doença, é o tratamento cirúrgico, onde as complicações quando presentes são muito severas e mutiladoras, prejudicando assim, muito a qualidade de vida dessas pacientes e levando a morbidades como: extensas ressecções, infecções secundárias, ausência de tecido para fechamento primário, deiscências e fístulas, que podem evoluir para feridas mutiladoras e com graves consequências, como a sepse.

A literatura sobre a terapia de fotobiomodulação e magnetoterapia evidencia efetividade através do emprego do Laser de baixa intensidade (LBI) e vem sendo cada vez mais estudada. Além disso, trata-se de um método efetivo, indolor, seguro e não invasivo, quando usado em dosimetria adequada tanto em animais como em pacientes.

Com os dados acima expostos, terapias com aparelhos baseados em energia auxiliam no processo antiedematoso, anti-inflamatório, cicatrização tecidual e analgesia.

1.7 HIPÓTESE

A terapia de Fotobiomodulação e Magnetoterapia podem contribuir para uma melhor reparação no tecido ósseo e gengival, quando empregadas no pós-operatório do tratamento cirúrgico da osteonecrose dos maxilares, induzida pelo uso dos Bisfosfonatos.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi realizar uma comparação da resposta inflamatória entre o tratamento cirúrgico padrão-ouro e a abordagem cirúrgica combinada com a aplicação de tratamentos adjuvantes, utilizando aparelhos baseados em energia, no contexto da osteonecrose de mandíbula relacionada ao uso de bisfosfonatos, em um modelo animal induzido para replicar as condições clínicas.

2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Comparar os grupos através de análise histomorfométricas e contagem de células para avaliar a resposta celular nos tecidos gengival e ósseo bem como seus os efeitos no tecido acometido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo, foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* fêmeas nascidas entre 30 e 60 dias pesando cerca de 150-200 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Nove de Julho e mantidos alojados em gaiolas alocadas em uma sala com ar filtrado a uma temperatura de 22 °C e 50% de umidade relativa, mantendo um ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com dieta normal para roedores e água *ad libitum*.

3.1. CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA FOTOBIOMODULAÇÃO E MAGNETOTERAPIA COMO TRATAMENTO ADJUVANTE EM OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA PELO USO DE BISFOSFONATOS EM MODELO ANIMAL", protocolada sob o CEUA nº 9709130423 (ID 000350), sob a responsabilidade de **André Carvalho Rodriguez** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 19/04/2023.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram separados em 5 Grupos, como segue:

- G1 C - Controle: animal sadio, sem osteonecrose. n 5
- G2 ON - Osteonecrose + cirúrgico *gold standard* - n 18*
- G3 ON + L - Osteonecrose + cirúrgico *gold standard* + Laser - n 18*
- G4 ON + M - Osteonecrose + cirúrgico *gold standard* + Magnetoterapia - n 18*

- G5 ON + L + M - Osteonecrose + cirúrgico *gold standard* + Laser + Magnetoterapia - n 18*
- Total 77 animais (*Os animais foram eutanasiados nos tempos 24h, 7 dias e 14 dias, 6 animais por tempo experimental).

No Grupo Controle (G1), os animais estavam sadios, sem injeção de qualquer medicação e sem aplicação dos aparelhos baseados em energia. No lado direito foi realizada a extração do primeiro molar inferior e no lado esquerdo da mandíbula não foi realizado nenhum procedimento.

Todos os demais animais, receberam injeção intraperitoneal de 0,06 mg/kg de ácido zoledrônico (Eurofarma, São Paulo, Brasil), uma vez por semana, durante seis semanas, segundo protocolo de Zandi, 2016 .

Após 6 semanas de injeções do ácido zoledrônico, foi realizada uma intervenção cirúrgica sob anestesia geral intraperitoneal usando 80 mg/kg de cloridrato de cetamina e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina, para extração do elemento dentário primeiro molar inferior direito e os alvéolos deixados abertos sem suturas, para indução da osteonecrose (ON).

Os animais foram colocados em posição supina horizontal, em maca adaptada com fio barbante em hastes de metal passando pelos incisivos superiores para abrir a boca, adaptando também um afastador de *Weitlaner* como abridor de boca, realizado anestesia local com 0,5 ml/kg de lidocaína com vasoconstritor, incisão em mucosa oral com lâmina de bisturi nº15, seguida de divulsão com sonda exploradora reta, após isso, realizada luxação de primeiro molar inferior direito com alveolótomo pediátrico, geralmente apresentando fratura em alguma raiz dentária, sendo removida na sequência com sonda exploradora e *holemback*.

O alvéolo foi mantido aberto, sem sutura na mucosa oral, para auxiliar a indução da osteonecrose na mandíbula do animal.

As injeções semanais de ácido zoledrônico continuaram por mais quatro semanas e, a partir deste momento (T0), após constatada clinicamente a ON, os animais foram tratados conforme os grupos relacionados abaixo:

Após as dez semanas os animais foram novamente anestesiados e seguindo o mesmo protocolo cirúrgico acima descrito, deu-se início a pesquisa

com o tempo T0 para tratamento cirúrgico *gold standard*, onde foi realizada a raspagem da osteonecrose com alveolótomo e cureta para osso.

No Grupo Osteonecrose (**G2-ON + Cir**) foi realizado apenas o procedimento cirúrgico *gold standard*, que consiste na remoção cirúrgica da osteonecrose com alveolótomo.

No Grupo Osteonecrose + Laserterapia (**G3-ON+L**) foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico *gold standard* para remoção da osteonecrose e posterior aplicação de Laser vermelho pontual na região da ON, nos tempos POI, 24h e 7 dias.

No Grupo Osteonecrose + Magnetoterapia (**G4-ON+M**) foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico *gold standard* para remoção da osteonecrose e posterior aplicação do campo magnético pulsado extraoral, nos tempos POI, 24h e 7 dias.

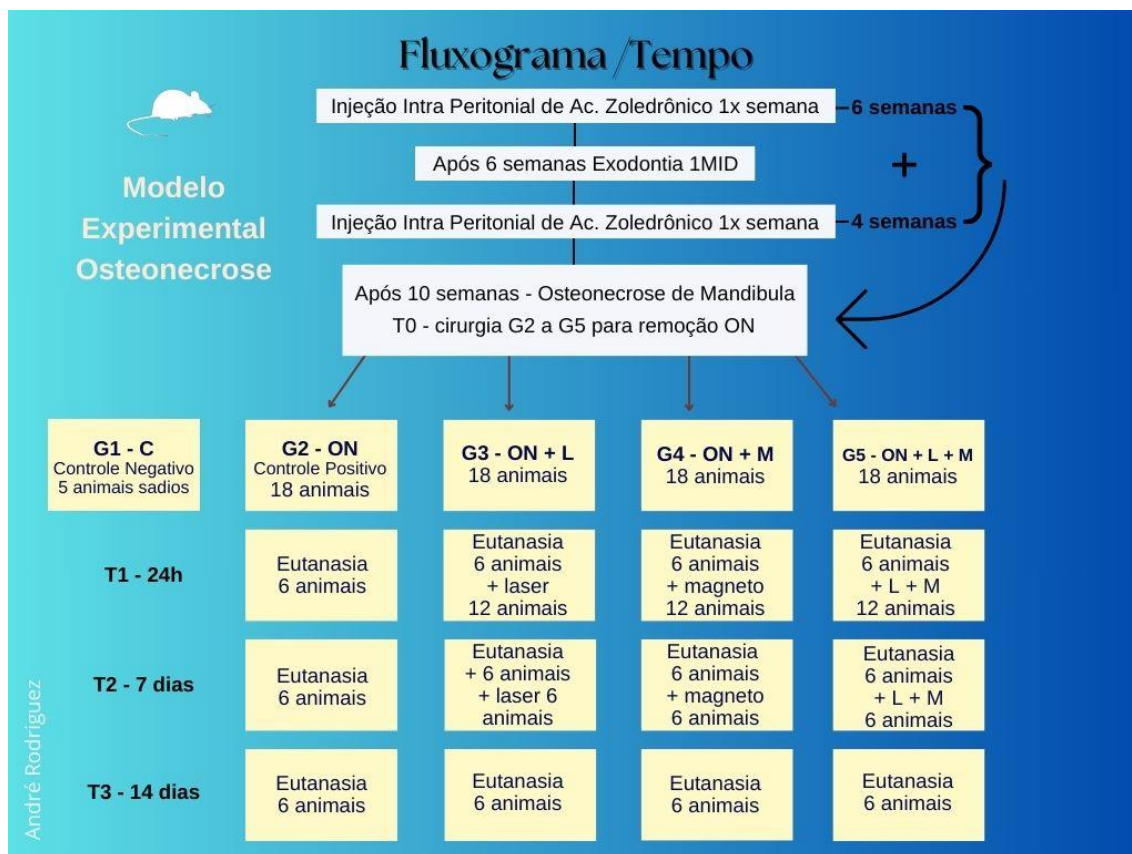
No Grupo Osteonecrose + Laserterapia + Magnetoterapia (**G5-ON+L+M**) foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico *gold standard* padrão para remoção da osteonecrose e aplicação do Laser pontual intraoral e do campo magnético pulsado extraoral, nos tempos POI, 24h e 7 dias.

Todos os animais receberam medicação (analgésicos) para controle de dor, sendo o medicamento escolhido Novalgina®, administrado via intraperitoneal com dose de 5mg/kg em intervalos de 12 horas, por 3 dias no pós-operatório.

Após os procedimentos os animais ficaram em observação em suas respectivas caixas e retornaram para o alojamento após acordarem da anestesia, seguindo aos cuidados do biotério da universidade. Foi disponibilizado em cada caixa dieta pastosa, com ração amolecida em água, por 3 dias.

Tal protocolo experimental foi desenhado em fluxograma na figura 4.

Figura 4: Fluxograma para indução de osteonecrose e tratamento.



Fonte, o Autor. T0: Tratamento transoperatório; T1: Tratamento em 24h; T2: Tratamento em 7 dias. Eutanásias em 24h; 7 dias e 14 dias.

Para o tratamento adjuvante com laser foi utilizado equipamento LASER THERAPY EC, DMC, com comprimento de onda vermelho, 660nm, potência de 100mW, energia de 2J aplicada pontualmente intra oral, sobre a lesão por 20s (figuras 5 e 6).

Figura 5: Aparelho de Laser THERAPY EC, DMC, São Carlos, SP, Brasil.



Fonte:

<https://www.dmcgroup.com.br/therapyec>

Figura 6: Dosimetria do Laser

Parâmetros	Laser
Comprimento de onda (nm)	660
Potência (mW)	100
Densidade de Energia Fluência (J/cm ²)	71,4
Energia (J)	2
Tempo de exposição (seg)	20
Tempo de tratamento	POI, 24h e 7 dias
Local da aplicação	Pontual, sobre a área da lesão. 1 ponto. (20s por ponto)
área do feixe cm ²	0,028

Fonte: o autor. parâmetros dosimétricos do Laser

Para o tratamento adjuvante com campo magnético foi utilizado o equipamento NEOSPIN, com frequência de 9 HZ, intensidade de 500 Gauss, aplicado extra oral sobre a mandíbula por 60s (figuras 7 e 8).

Figura 7: Aparelho Magnetoterapia Neospin - São Paulo, SP.



Fonte: www.neospin.com.br

Figura 8: Dosimetria da Magnetoterapia.

Parâmetros	MAGNETOTERAPIA
Frequência (Hz)	9
Intensidade (Gauss)	500
Tempo de exposição (seg)	60
Tempo tratamento	POI, 24h e 7 dias
Local da aplicação	Por área, sobre a extensão da lesão.

Fonte: o autor, parâmetros dosimétricos da Magnetoterapia

As aplicações dos aparelhos de energia nos respectivos grupos experimentais foram realizadas nos tempos: T0 pós-operatório imediato, T1 em 24h e T2 em 7 dias e as eutanásias realizadas em três tempos: 24h, 7 dias e 14 dias.

Os animais foram eutanasiados com infiltração intraperitoneal usando 400 mg/kg de cloridrato de cetamina e 40 mg/kg de cloridrato de xilazina, para a remoção de fragmento ósseo da mandíbula, o qual foi encaminhado ao laboratório de anatomia patológica, para confecção das lâminas e posterior avaliação histopatológica.

Para a avaliação histológica, fragmentos da região tratada em mandíbula foram removidos e armazenados em formalina tamponada a 10%, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina conforme protocolo para descalcificação com EDTA. ácido descalcificante (cloreto hidrogênio) ONU 1789 CL 8 GE II , marca: Allkimia , lote DESC 05/23 , validade: 05/2025, ONU 1789 CL 8 GE II. Descalcificação lenta, para preservar a morfologia das amostras.

Após a descalcificação o material passou por lavagem em água corrente por 03 minutos para retirada do excesso do ácido descalcificante e seguiu para o processamento histológico, em processador automatizado, composto pelos reagentes e protocolo à seguir:

Processador histológico, álcool absoluto, Quimesp, lote: 79.366 validade: 02/202 site: www.quimesp.com.br - 04 banhos (01 hora cada), essa etapa tem a função de fixar e desidratar o material preparando a amostra para a próxima etapa. Xilol - Quimesp lote: 80.075 validade: 05/2025 - XILOL (XILENOS) BB 5 L site: www.quimesp.com.br - 03 banhos (40 minutos cada), com a função de retirar o álcool e substituí-lo por xilol (diafanização), preparando a amostra para a próxima etapa.

Parafina - Solven - SOLVEN WAX 140 LT Kg saco 25 Kg site: www.solven.com.br - 02 banhos de 01 hora cada com a temperatura em 60°C, com a função de penetração do tecido da parafina líquida (55°C a 65°C) retirando o xilol e substituindo-o por parafina, dando a amostra consistência para o corte histológico (parafinização), preparando a amostra para a próxima etapa que será a Inclusão.

Após o processamento histológico seguimos para a etapa da inclusão, realizada com parafina líquida (55°C a 65°C), em molde próprio, conforme a necessidade do tamanho.

Após a inclusão foi realizado o corte histológico em micrótomo, de 03 a 04 micrômetros, distendida a fita de parafina com fragmento de interesse, em banho

maria histológico, com água destilada aquecida a 50°C e aderida à fita em lâmina de vidro lapidada, para microscopia óptica e colocada em estufa por 20 minutos à 65°C para o derretimento do excesso de parafina, assim seguindo para a próxima etapa.

Após o corte histológico as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H.E.), que consiste em corar estruturas basófilas (ácidas) pela Hematoxilina de Harris em cor azul arroxeadado e estruturas básicas (alcalinas) pela Eosina aquosa em cor rosa, com o seguinte protocolo utilizado na bateria de coloração.

Desparafinização em 03 cubas de xilol mergulhando as lâminas no reagente e deixando-as submersas por 3 minutos, em cada uma das cubas, deixando escorrer bem o reagente entre cada uma das passagens.

Passagem das lâminas em 4 cubas de álcool absoluto, mergulhando-as 5 vezes em cada cuba. Lavagem em água corrente por 02 minutos e, após isso, mergulhando as lâminas no primeiro corante, Hematoxilina de Harris- Merck marca: Sigma Aldrich, lote :HX 31395953 val.31/01/2025 referência: 1092531000, por 03 minutos.

Nova lavagem das lâminas em água corrente por, 02 minutos, mergulhando-as no segundo corante Eosina alcoólica marca: Allkimia lote 004/2022 Val.05/2024 site: www.allkimia.com.br, por 01 minuto.

Após o processo de coloração as lâminas foram passadas em 04 cubas de álcool absoluto para desidratar a lâmina e não hidratar o xilol, o que ocasionaria um aspecto leitoso e dificultaria a leitura, na sequência, nova passagem das lâminas em 3 cubas de xilol para posterior montagem da lâmina em meio resinoso (Entelan com lamínula).

3.3. AVALIAÇÕES

Para as análises histológicas utilizamos um microscópio óptico (Olympus System) e as lâminas foram fotografadas através de sistema de fotomicrografia.

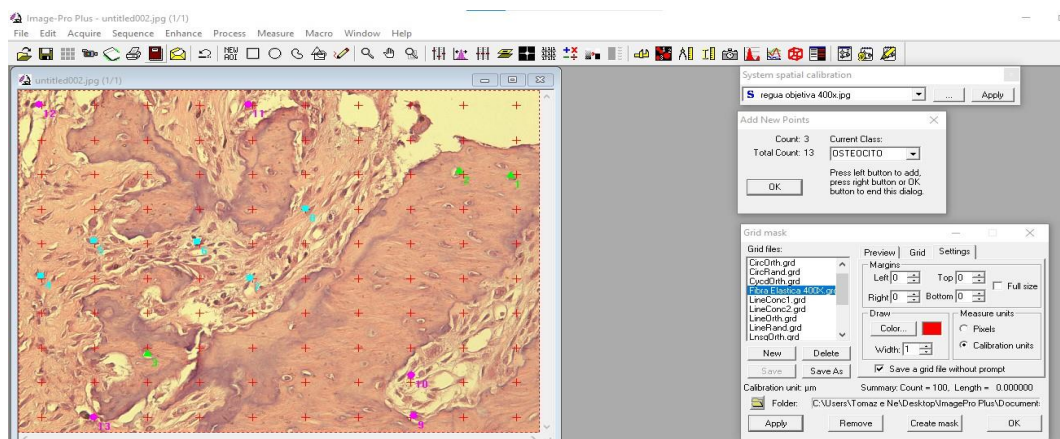
A análise histomorfométrica foi realizada por meio de um sistema de análise de imagens, através de aquisição com câmera fotográfica CCD Sony, acoplada a um microscópio Olympus BX51 (Olympus 23 Co, Tokyo, Japan), a qual captura as imagens e as envia para o monitor por um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canadá).

As imagens foram processadas por meio do software ImagePro-Plus 6.0 e as análises foram realizadas por observador, às cegas, sendo adquiridas aleatoriamente cerca de 10 imagens de cada lâmina, em aumento de 400 vezes.

A área de cada campo analisado foi medida em μm^2 , para a quantificação de células e pelo método estereológico de contagem de pontos de acordo com Gundersen et al., 1988, foi construído um retículo com 100 pontos (*GRADE MASK*), distribuídos ortogonalmente sobre a imagem adquirida e as células coincidentes com os pontos do retículo foram quantificadas (figura 9)

De cada animal foi realizada uma lâmina de gengiva e uma lâmina de osso cada uma destas lâminas foram fotografadas em média 8x gerando um total de 1232 imagens (616 osso + 616 gengiva)

Figura 9: Quantificação de células.



Fonte: O autor, imagem ilustrativa salva da tela do programa ImagePro-Plus 6.0.

3.4. LOCAL DE PESQUISA

O estudo foi desenvolvido pelo Departamento de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho, as cirurgias foram realizadas no biotério e apoio nos laboratórios da Uninove.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente os dados foram analisados por meio de medidas-resumo (média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão).

A comparação de médias das contagens das células entre dois e mais de dois por grupos foram realizadas via teste t de Student e Análise de Variâncias (ANOVA), respectivamente. Tanto o teste t de Student como a ANOVA apresentam como pressupostos a normalidade na distribuição dos dados e a homocedasticidade, os quais foram verificados utilizando-se o teste W de Shapiro-Wilk e teste de Levene, respectivamente.

Em caso de violação da suposição de homocedasticidade, os graus de liberdade da estatística foram corrigidos utilizando-se a correção de Brown-Forsythe.

No caso de violação da normalidade dos dados, as médias foram comparadas empregando-se o teste não-paramétrico de Mann – Whitney (comparação de duas médias) ou de Kruskal-Wallis (comparação de mais de duas médias).

Uma vez detectada as diferenças de médias na ANOVA ou no teste de Kruskal-Wallis, a identificação de grupos distintos de médias foi realizada via testes de Duncan e de Dunn-Bonferroni, respectivamente mantendo-se um nível de significância global de 5%.

Para todos os testes estatísticos foram utilizados um nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SPSS 20.0 e STATA 17.

4. RESULTADOS

Tabela 1- Medidas-resumo da contagem de células do Grupo Controle

	Sem procedimento (N=5)	Extração do primeiro molar inferior (N=5)	p
Gengiva, Média ± DP			
Leucócitos	1,5 ± 1,3	2,7 ± 2,5	0,373 ^a
Fibroblastos	4,3 ± 3,1	9,5 ± 5,3	0,098 ^a
Vasos sanguíneos	4,3 ± 4,9	1,3 ± 1,1	0,647 ^b
Queratinócitos	13,6 ± 7,7	9,8 ± 11,0	0,647 ^b
Osso, Média ± DP			
Osteócito	11,9 ± 3,7	10,0 ± 3,6	0,443 ^a
Osteoclasto	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,690 ^b
Osteoblasto	0,3 ± 0,4	0,1 ± 0,2	0,840 ^a

Média ± DP

p - nível descritivo do teste t de Student^(a) e de Mann-Whitney^(b).

Conforme tabela 1, não se verificaram diferenças de médias para todos os tipos de células da gengiva e osso por status do grupo controle.

Tabela 2 - Medidas-resumo da contagem de células na osteonecrose (ON) no tempo 0, por Grupos

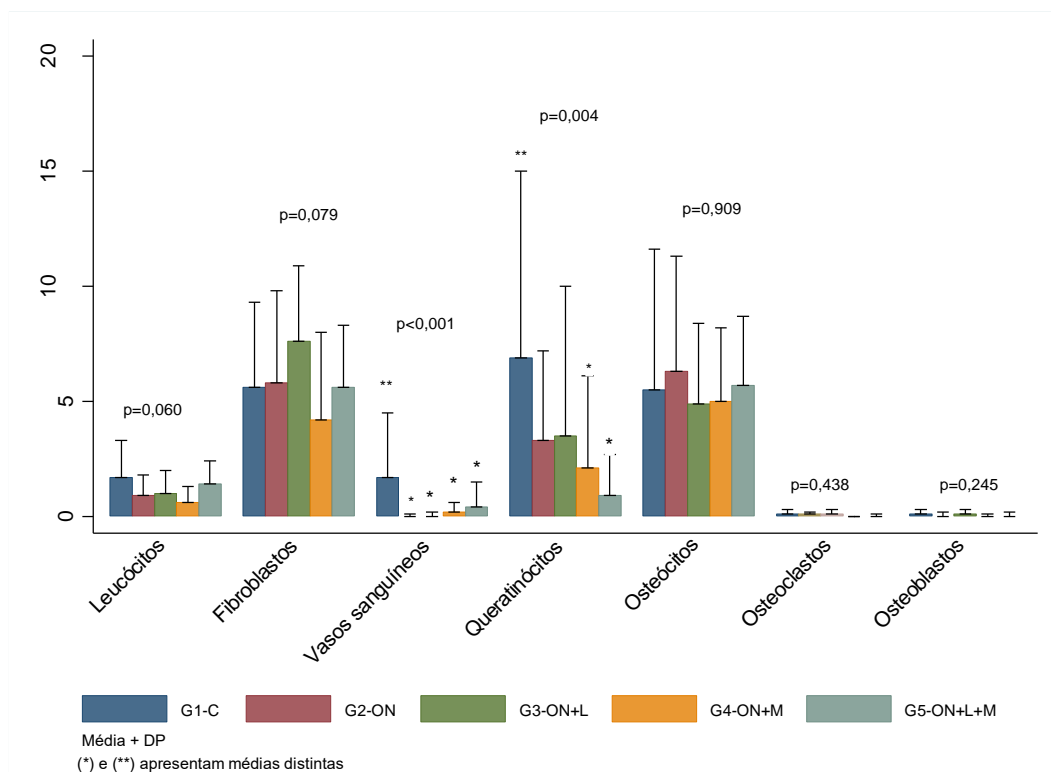
	G1 - C		G2 - ON		G3 - ON		G4 - ON		G5 - ON		p
	N	Média ± DP	N	Média ± DP	N	Média ± DP	N	Média ± DP	N	Média ± DP	
Leucócitos	10	1,7 ± 1,6	17	0,9 ± 0,9	15	1,0 ± 1,0	18	0,6 ± 0,7	17	1,4 ± 1,0	0,060
Fibroblastos	10	5,6 ± 3,7	17	5,8 ± 4,0	15	7,6 ± 3,3	18	4,2 ± 3,8	17	5,6 ± 2,7	0,079
Vasos sanguíneos	10	1,7 ± 2,8 ^A	17	0,0 ± 0,1 ^B	15	0,0 ± 0,2 ^B	18	0,2 ± 0,4 ^B	17	0,4 ± 1,1 ^B	<0,001
Queratinócitos	10	6,9 ± 8,1 ^A	17	3,3 ± 3,9	15	3,5 ± 6,5	18	2,1 ± 4,0 ^B	17	0,9 ± 1,8 ^B	0,004
Osteócito	10	5,5 ± 6,1	17	6,3 ± 5,0	15	4,9 ± 3,5	18	5,0 ± 3,2	17	5,7 ± 3,0	0,909
Osteoclasto	10	0,1 ± 0,2	17	0,1 ± 0,1	15	0,1 ± 0,2	18	0,0 ± 0,0	17	0,0 ± 0,1	0,438
Osteoblasto	10	0,1 ± 0,2	17	0,0 ± 0,2	15	0,1 ± 0,2	18	0,0 ± 0,1	17	0,0 ± 0,2	0,245

Média ± DP

p - nível descritivo do teste de Kruskal-Wallis.

(A) e (B) apresentam médias distintas segundo comparações múltiplas de Dunn-Bonferroni.

Gráfico 1 – Médias e desvio padrão da contagem de células na osteonecrose (ON) no tempo 0, por grupos



Fonte: O autor

Conforme tabela 2, na osteonecrose, verificaram-se diferenças de médias de vasos sanguíneos ($p < 0,001$) e de queratinócitos ($p = 0,004$) entre Grupos. Dessa forma, a média de vasos sanguíneos do Grupo G1-C foi superior aos dos demais Grupos, similares entre si. Além disso, a média de queratinócitos do grupo G1-C foi superior aos dos grupos G4-ON+M e G5-ON+L+M, similares entre si. Não se verificaram diferenças de médias de G2-ON e G3-ON+L e demais Grupos.

Tabela 3 - Medidas-resumo da contagem de células da gengiva por Grupo, nos tempos 1, 7 e 14 dias

	G1 - C		G2 - ON		G3 - ON + L		G4 - ON + M		G5 - ON + L + M		p
	N	Média ± DP	N	Média ± DP	N	Média ± DP	N	Média ± DP	N	Média ± DP	
1 dia pós											
Leucócitos	10	2,1 ± 2,0	5	2,7 ± 1,7	5	3,0 ± 2,3	6	3,4 ± 3,2	6	2,6 ± 2,0	0,856 ^a
Fibroblastos	10	6,9 ± 4,9 ^{A'}	5	2,4 ± 1,6	5	6,3 ± 2,7	6	4,6 ± 4,1	6	2,1 ± 1,4 ^{B'}	0,034^a
Vasos sanguíneos	10	2,8 ± 3,7 ^A	5	0,2 ± 0,4 ^B	5	1,4 ± 1,0	6	1,0 ± 1,4	6	0,2 ± 0,4 ^B	0,018^b
Queratinócitos	10	11,7 ± 9,2	5	5,4 ± 7,4	5	14,1 ± 10,3	6	7,3 ± 5,8	6	17,5 ± 11,3	0,186 ^a
7 dias pós											
Leucócitos	10	2,1 ± 2,0 ^A	6	0,0 ± 0,1 ^B	5	1,5 ± 1,9	6	1,7 ± 1,0 ^A	5	2,2 ± 2,3 ^A	0,024^b
Fibroblastos	10	6,9 ± 4,9	6	5,6 ± 3,8	5	9,4 ± 2,0	6	8,0 ± 2,9	5	6,5 ± 3,1	0,530 ^a
Vasos sanguíneos	10	2,8 ± 3,7 ^A	6	0,1 ± 0,3 ^B	5	1,6 ± 1,4	6	0,7 ± 0,7	5	0,7 ± 1,0	0,042^b
Queratinócitos	10	11,7 ± 9,2 ^{B'}	6	10,7 ± 6,6 ^{B'}	5	2,6 ± 1,8 ^{B'}	6	8,5 ± 4,4 ^{B'}	5	24,7 ± 12,0 ^{A'}	0,008^a
14 dias pós											
Leucócitos	10	2,1 ± 2,0	6	0,8 ± 1,1	5	0,8 ± 1,3	6	0,5 ± 0,7	6	2,7 ± 1,8	0,073 ^b
Fibroblastos	10	6,9 ± 4,9	6	6,7 ± 3,3	5	6,6 ± 1,5	6	9,1 ± 2,4	6	8,1 ± 5,2	0,710 ^a
Vasos sanguíneos	10	2,8 ± 3,7	6	1,1 ± 1,4	5	1,2 ± 1,4	6	1,9 ± 1,0	6	1,1 ± 0,9	0,708 ^b
Queratinócitos	10	11,7 ± 9,2	6	14,0 ± 6,4	5	14,4 ± 6,4	6	7,0 ± 6,7	6	14,0 ± 12,2	0,562 ^a

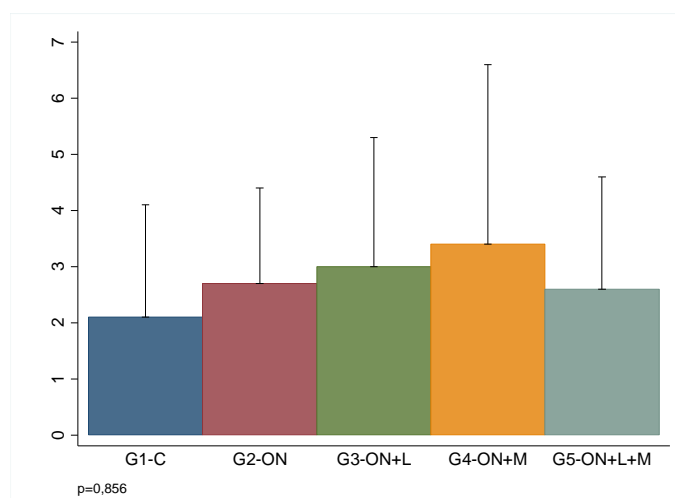
Média ± DP

p - nível descritivo da ANOVA^(a) e do teste de Kruskal-Wallis^(b).

(A) e (B) apresentam médias distintas segundo comparações múltiplas de Dunn-Bonferroni.

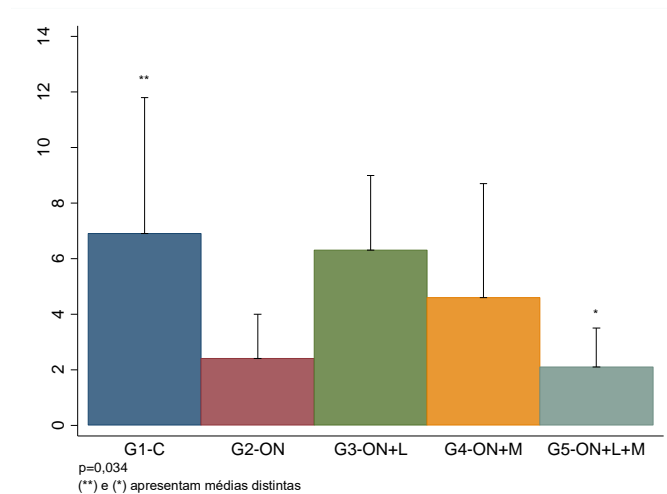
(A') e (B') apresentam médias distintas segundo comparações múltiplas de Duncan.

Gráfico 2 – Médias e desvio padrão da contagem de leucócitos da gengiva por Grupo - 1 dia pós intervenção



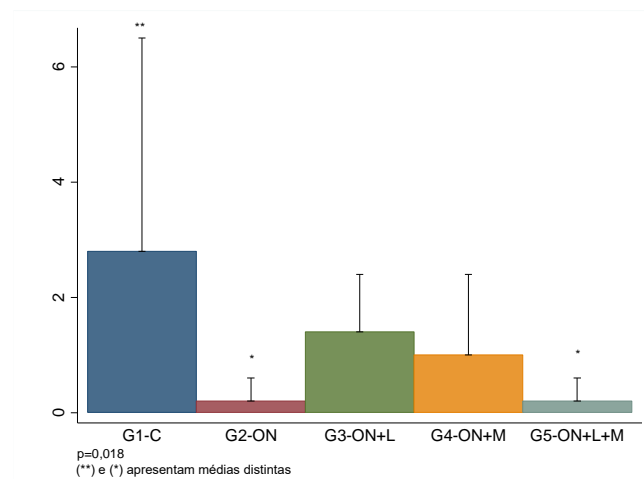
Fonte: O autor

Gráfico 2 – Médias e desvio padrão da contagem de fibroblastos da gengiva por Grupo - 1 dia pós intervenção



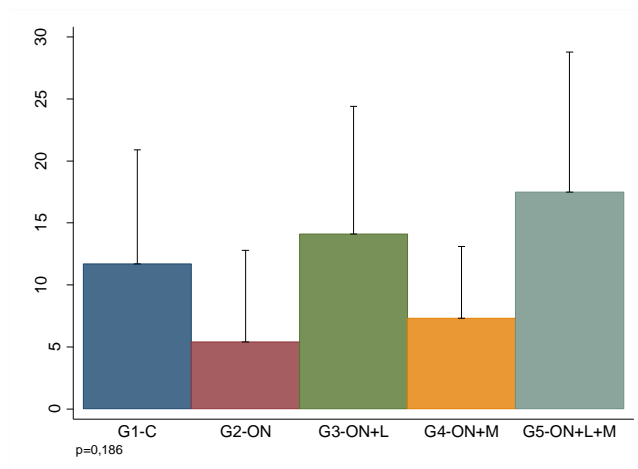
Fonte: O autor

Gráfico 4 – Médias e desvio padrão da contagem de vasos sanguíneos da gengiva por Grupo - 1 dia pós intervenção



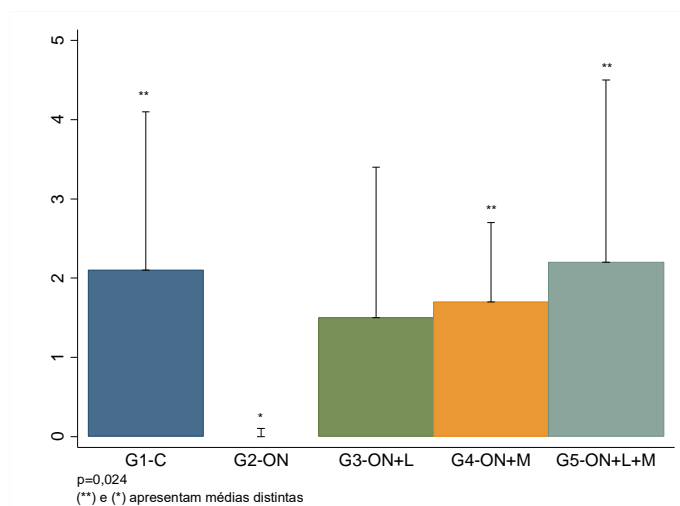
Fonte: O autor

Gráfico 5 – Médias e desvio padrão da contagem de queratinócitos da gengiva por Grupo - 1 dia pós intervenção



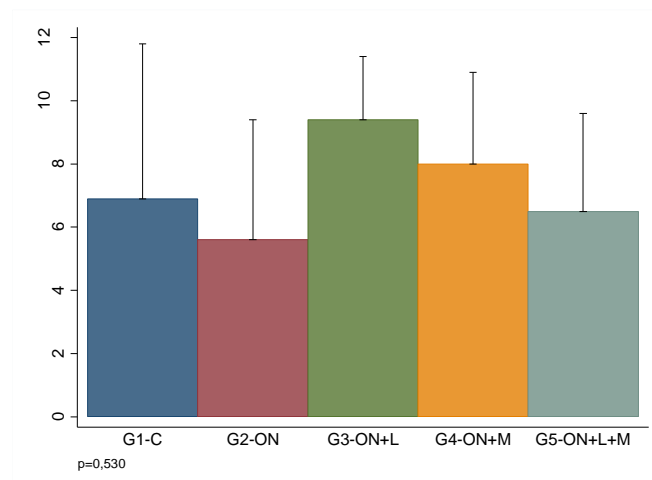
Fonte: O autor

Gráfico 6 – Médias e desvio padrão da contagem de leucócitos da gengiva por Grupo - 7 dias pós intervenção



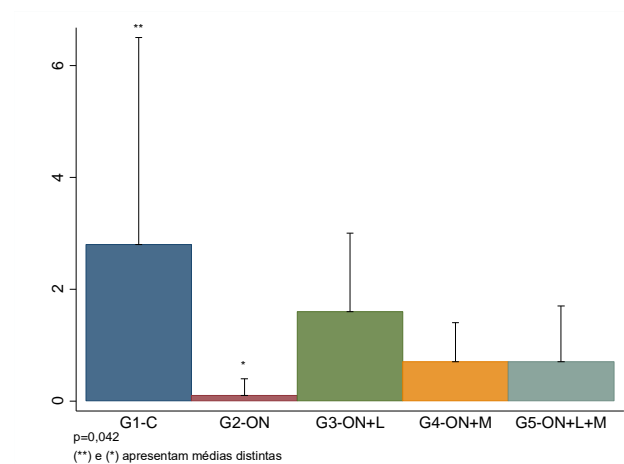
Fonte: O autor

Gráfico 7 – Médias e desvio padrão da contagem de fibroblastos da gengiva por Grupo - 7 dias pós intervenção



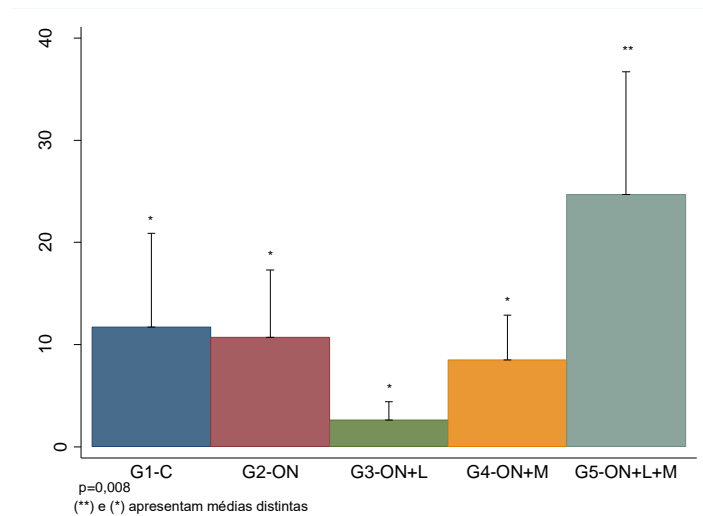
Fonte: O autor

Gráfico 8 – Médias e desvio padrão da contagem de vasos sanguíneos da gengiva por Grupo - 7 dias pós intervenção



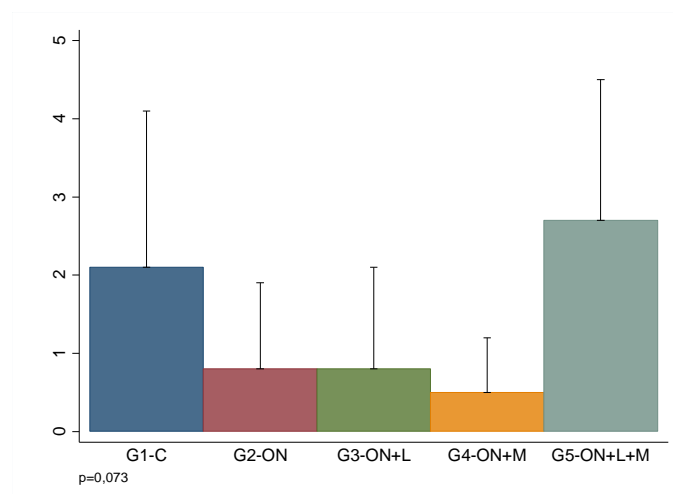
Fonte: O autor

Gráfico 9 – Médias e desvio padrão da contagem de queratinócitos da gengiva por Grupo - 7 dias pós intervenção



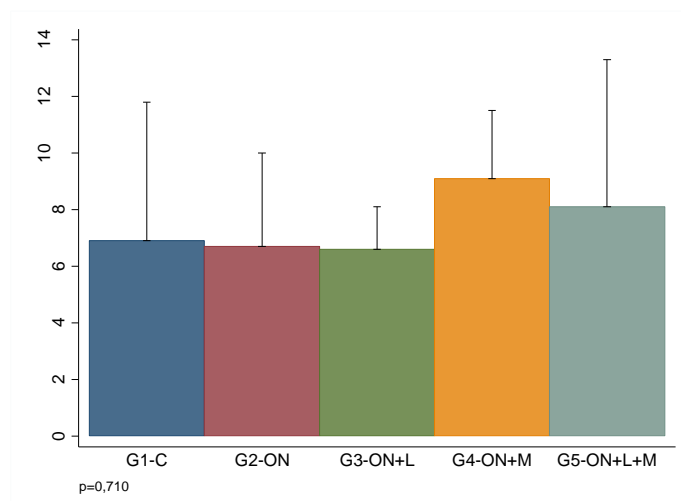
Fonte: O autor

Gráfico 10 – Médias e desvio padrão da contagem de leucócitos da gengiva por Grupo - 14 dias pós intervenção



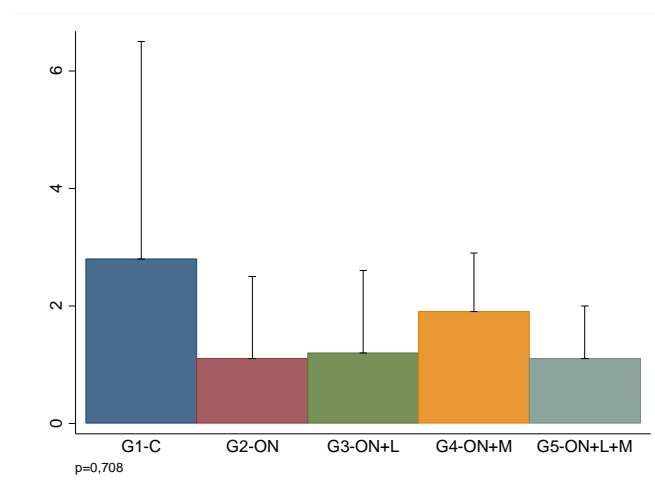
Fonte: O autor

Gráfico 11 – Médias e desvio padrão da contagem de fibroblastos da gengiva por Grupo – 14 dias pós intervenção



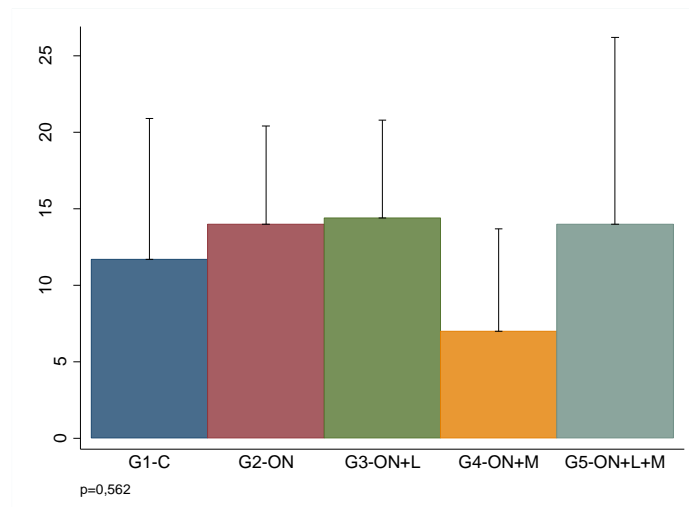
Fonte: O autor

Gráfico 12 – Médias e desvio padrão da contagem de vasos sanguíneos da gengiva por Grupo - 14 dias pós intervenção



Fonte: O autor

Gráfico 13 – Médias e desvio padrão da contagem de queratinócitos da gengiva por Grupo – 14 dias pós intervenção



Fonte: O autor

Conforme tabela 3 e gráficos 2 a 13, verificaram-se diferenças de médias de fibroblastos – 1 dia pós ($p=0,034$), vasos sanguíneos – 1 dia pós ($p=0,018$); leucócitos ($p=0,024$), vasos sanguíneos ($p=0,042$) e queratinócitos ($p=0,008$) – 7 dias pós entre grupos. Dessa forma, observou-se para:

- **fibroblastos – 1 dia pós:** a média do Grupo G1 - C foi superior ao de G5 – ON+L+M. Não se verificou diferenças de médias entre G2-ON, G3-ON+L e G4-ON+M e demais Grupos;
- **vasos sanguíneos – 1 dia pós:** a média do Grupo G2 - ON e G5-ON+L+M foram similares e inferiores ao de G1-C. Não se verificaram diferenças de médias entre G3-ON+L e G4-ON+ M e demais Grupos;
- **leucócitos – 7 dias pós:** a média do Grupo G2-ON foi inferior aos dos Grupos G1-C, G4 – ON+M e G5-ON+L+M, similares entre si. Não se verificaram diferenças de médias entre os Grupos G3 – ON+L e demais grupos;
- **vasos sanguíneos – 7 dias pós:** a média do Grupo G2 - ON foi inferior ao de G1-C. Não se verificaram diferenças de médias entre G3-ON+L, G4-ON+M, G5-ON+L+M e demais Grupos;
- **queratinócitos – 7 dias pós:** a média do Grupo G5-ON+L+M foi superior aos dos demais, similares entre si.

Para as demais variáveis, não se verificaram diferenças de médias.

Tabela 4 - Medidas-resumo da contagem de células do osso por Grupo, nos tempos 1, 7 e 14 dias

	G1 - C		G2 - ON		G3 - ON + L		G4 - ON + M		G5 - ON + L + M		p
	N	Média ± DP	N	Média ± DP	N	Média ± DP	N	Média ± DP	N	Média ± DP	
1 dia pós											
Osteócito	10	11,0 ± 3,6 ^A	5	5,5 ± 1,1 ^B	5	10,0 ± 2,6	6	7,1 ± 2,0	6	8,0 ± 2,5	0,013 ^b
Osteoclasto	10	0,2 ± 0,2 ^{B'}	5	0,4 ± 0,2 ^{A'}	5	0,7 ± 0,3 ^{A'}	6	0,6 ± 0,5 ^{A'}	6	0,4 ± 0,3 ^{A'}	0,043 ^a
Osteoblasto	10	0,2 ± 0,3 ^B	5	1,4 ± 0,7 ^A	5	2,8 ± 0,7 ^A	6	0,8 ± 0,8	6	0,5 ± 0,3	<0,001 ^b
7 dias pós											
Osteócito	10	11,0 ± 3,6 ^A	6	5,5 ± 1,2 ^B	5	6,1 ± 1,4	6	8,7 ± 1,4	5	5,9 ± 1,4 ^B	0,001 ^b
Osteoclasto	10	0,2 ± 0,2 ^B	6	0,5 ± 0,2	5	1,4 ± 0,5 ^A	6	0,9 ± 0,3 ^A	5	0,5 ± 0,4	0,001 ^b
Osteoblasto	10	0,2 ± 0,3 ^{B'}	6	1,4 ± 0,8 ^{A'}	5	1,9 ± 1,0 ^{A'}	6	1,3 ± 0,4 ^{A'}	5	0,5 ± 0,4 ^{B'}	<0,001 ^a
14 dias pós											
Osteócito	10	11,0 ± 3,6 ^A	6	5,8 ± 1,8	5	3,9 ± 1,2 ^B	6	6,4 ± 2,6	6	7,7 ± 1,7	0,002 ^b
Osteoclasto	10	0,2 ± 0,2 ^B	6	1,1 ± 0,7 ^A	5	1,1 ± 0,7 ^A	6	1,0 ± 0,5 ^A	6	0,5 ± 0,4	0,004 ^b
Osteoblasto	10	0,2 ± 0,3 ^B	6	1,6 ± 1,2 ^A	5	1,8 ± 1,1 ^A	6	0,8 ± 0,4	6	0,8 ± 0,6	0,003 ^b

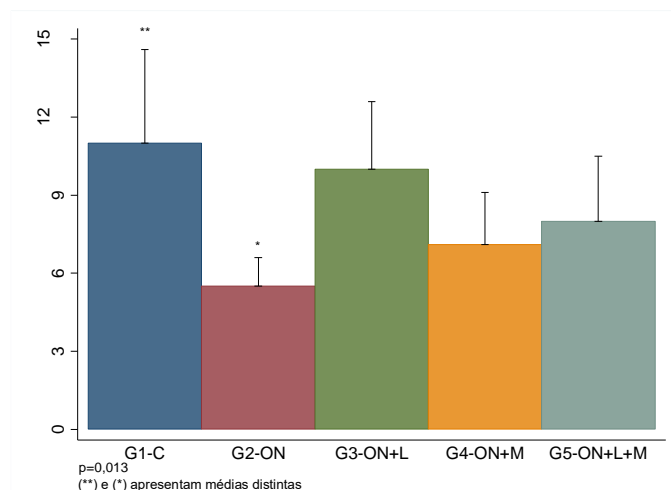
Média ± DP

p - nível descritivo da ANOVA^(a) e do teste de Kruskal-Wallis^(b).

(A) e (B) apresentam médias distintas segundo comparações múltiplas de Dunn-Bonferroni.

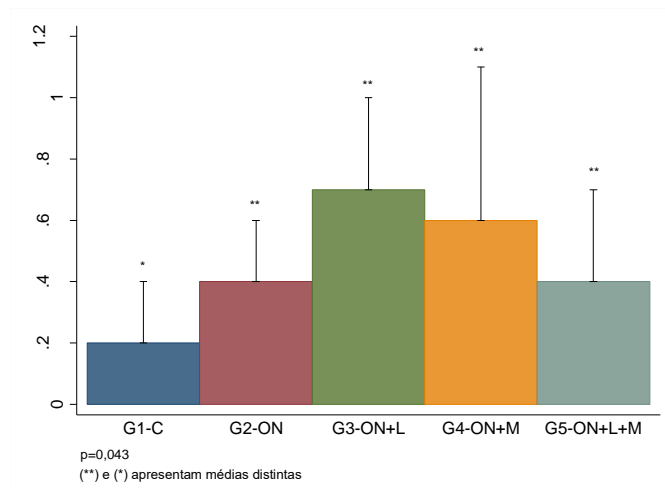
(A') e (B') apresentam médias distintas segundo comparações múltiplas de Duncan.

Gráfico 14 – Médias e desvio padrão da contagem de osteócitos por Grupo - 1 dia pós intervenção



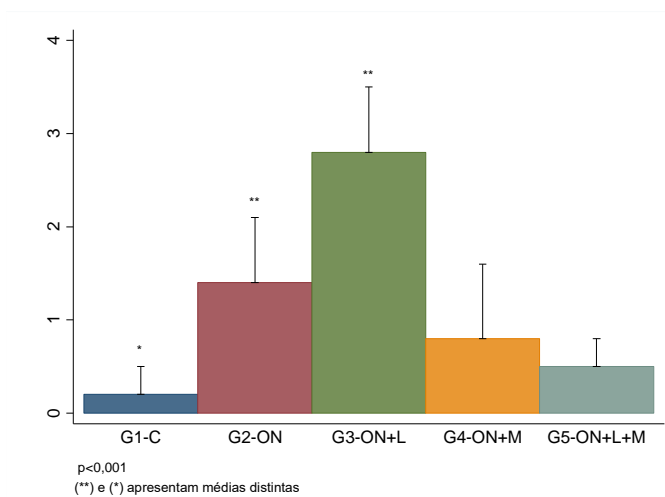
Fonte: O autor

Gráfico 15 – Médias e desvio padrão da contagem de osteoclastos por Grupo - 1 dia pós intervenção



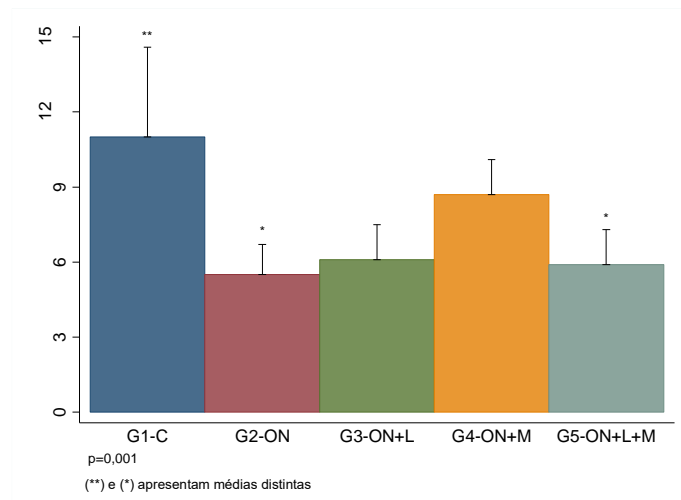
Fonte: O autor

Gráfico 16 – Médias e desvio padrão da contagem de osteoblastos por Grupo - 1 dia pós intervenção



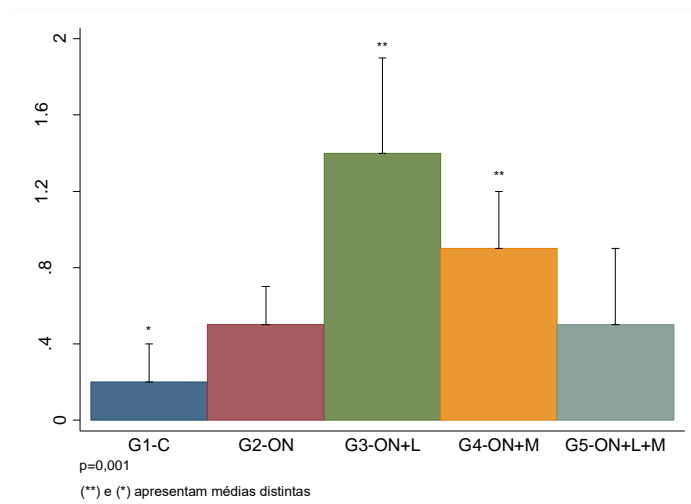
Fonte: O autor

Gráfico 17 – Médias e desvio padrão da contagem de osteócitos por Grupo – 7 dias pós intervenção



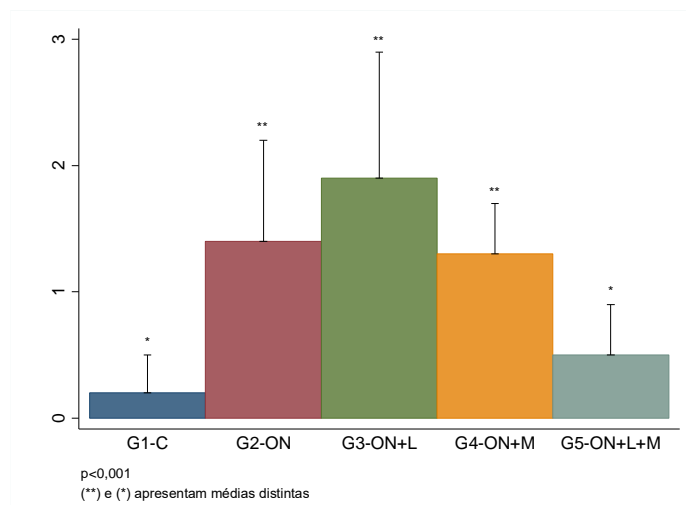
Fonte: O autor

Gráfico 18 – Médias e desvio padrão da contagem de osteoclastos por Grupo – 7 dias pós intervenção



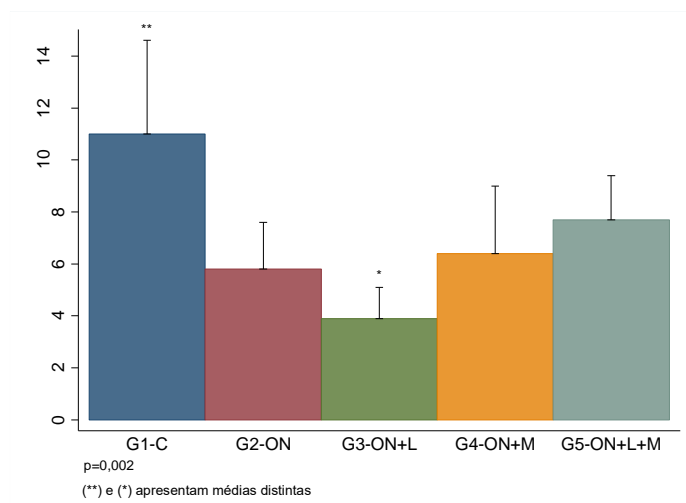
Fonte: O autor

Gráfico 19 – Médias e desvio padrão da contagem de osteoblastos por Grupo – 7 dias pós intervenção



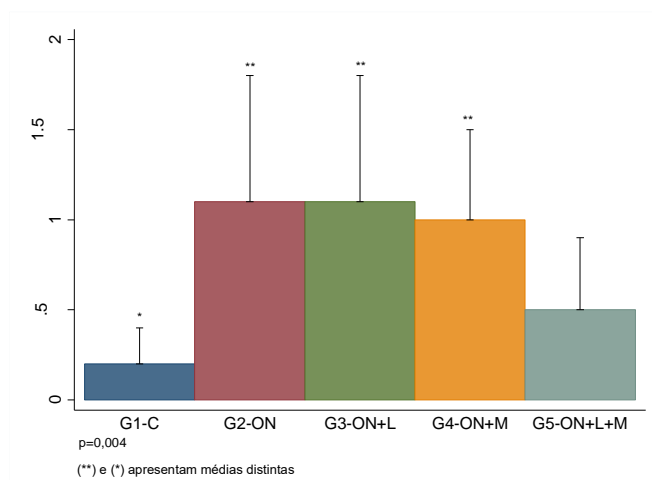
Fonte: O autor

Gráfico 20 – Médias e desvio padrão da contagem de osteócitos por Grupo – 14 dias pós intervenção



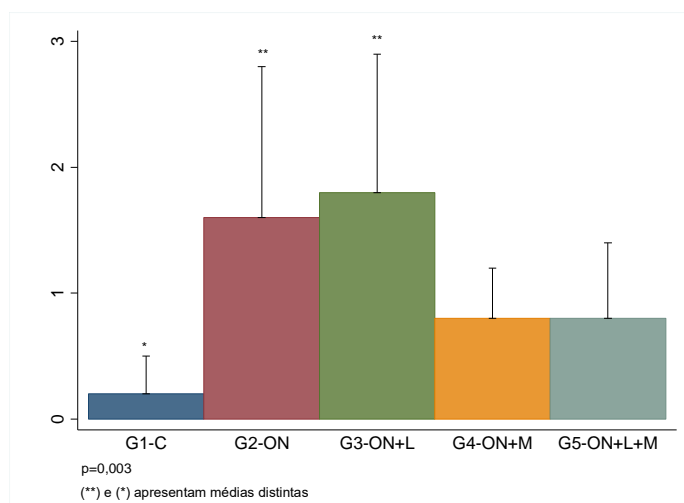
Fonte: O autor

Gráfico 21 – Médias e desvio padrão da contagem de osteoclastos por Grupo – 14 dias pós intervenção



Fonte: O autor

Gráfico 22 – Médias e desvio padrão da contagem de osteoblastos por Grupo – 14 dias pós intervenção



Fonte: O autor

Conforme tabela 4 e gráficos 14 a 22, verificaram-se diferenças de médias de contagem para todos os tipos de células e em todos os momentos de avaliação. Dessa forma, observou-se para:

- **osteócitos – 1 dia pós:** a média do Grupo G2-ON foi inferior ao de G1-C. Não se verificaram diferenças de médias entre os Grupos G3-ON+L, G4-ON+M, G5-ON+L+M e demais Grupos;

- **osteoclastos – 1 dia pós:** a média de G1-C foi inferior aos dos demais grupos, similares entre si;
- **osteoblastos – 1 dia e 14 dias pós:** a média do grupo G2-ON e G3-ON+L foram similares e superiores ao do G1-C. Não se verificaram diferenças de médias entre os Grupos G4-ON+M, G5-ON+L+M e demais Grupos;
- **osteócitos – 7 dias pós:** a média do Grupo G2-ON foi inferior ao de G1-C. Não se verificaram diferenças de médias entre os Grupos G3-ON+L, G4 -ON+M, G5-ON+L+M e demais grupos;
- **osteoclastos – 7 dias pós:** as médias dos Grupos G3-ON+L e G4-ON+M foram similares e superiores ao do G1-C. Não se verificou diferença de médias entre os Grupos G2-ON, G5-ON+L+M e demais Grupos;
- **osteoblastos – 7 dias pós:** as médias de G1-C e G5-ON+L+M foram similares e inferiores aos dos demais Grupos, similares entre si;
- **osteócitos – 14 dias pós:** a média do grupo G3-ON+L foi inferior ao de G1-C. Não se verificaram diferenças de médias entre os Grupos G2-ON, G4 -ON+M, G5-ON+L+M e demais Grupos;
- **osteoclastos – 14 dias pós:** a média do grupo G1-C foi inferior aos dos Grupos G2-ON, G3-ON+L e G4-ON+M, similares entre si. Não se verificaram diferenças de médias entre o Grupo G5-ON+L+M e demais Grupos.

Tabela 5: Resumo dos resultados em gengiva

GENGIVA 1 dia	G2 ON	G3 ON + L	G4 ON + M	G5 ON + L + M
Leucócitos	—	—	—	—
Fibroblastos	—	—	—	↓
Vasos Sanguíneos	↓	—	—	↓
Queratinócitos	—	—	—	—

GENGIVA 7 dias	G2 ON	G3 ON + L	G4 ON + M	G5 ON + L + M
Leucócitos	↓	—	↑	↑
Fibroblastos	—	—	—	—
Vasos Sanguíneos	—	↓	—	—
Queratinócitos	—	—	—	↑

GENGIVA 14 dias	G2 ON	G3 ON + L	G4 ON + M	G5 ON + L + M
Leucócitos	—	—	—	—
Fibroblastos	—	—	—	—
Vasos Sanguíneos	—	—	—	—
Queratinócitos	—	—	—	—

Fonte: O autor

↓ - diminuiu, ↑ aumentou, — não alterou

Tabela 6: Resumo dos resultados em osso.

OSSO 1 dia	G2 ON	G3 ON +L	G4 ON +M	G5 ON + L + M
Osteócitos	↓	—	—	—
Osteoclastos	↑	↑	↑	↑
Osteoblastos	↑	↑	—	—

OSSO 7 dias	G2 ON	G3 ON +L	G4 ON +M	G5 ON + L + M
Osteócitos	↓	—	—	↓
Osteoclastos	—	↑	↑	—
Osteoblastos	↑	↑	↑	—

OSSO 14 dias	G2 ON	G3 ON +L	G4 ON +M	G5 ON + L + M
Osteócitos	—	↓	—	—
Osteoclastos	↑	↑	↑	—
Osteoblastos	↑	↑	—	—

Fonte: O autor

↓ - diminuiu, ↑ aumentou, — não alterou

5. DISCUSSÃO

A terapia da MRONJ é um problema desafiador e, de acordo com o relatório AAOMS atualizado em 2022, os principais escopos de tratamento para pacientes com diagnóstico estabelecido de MRONJ devem ser: eliminar a dor, controlar a infecção e minimizar a progressão ou ocorrência de nova necrose óssea. Embora existam recomendações de terapias por vários autores, não há consenso em relação a melhor estratégia de tratamento padrão para MRONJ (RUGGIERO, 2014).

Contudo, existem estudos, citados nesta revisão sistemática, sugerindo que o tratamento cirúrgico é o mais eficaz que o tratamento não cirúrgico em pacientes com MRONJ. (GOKER, 2021)

Weber, 2016 em revisão sistemática sobre a eficácia da laserterapia no manejo de osteonecrose da mandíbula relacionada aos bisfosfonatos (BRONJ), pode concluir que o tratamento combinado com antibióticos, cirurgia minimamente invasiva, incluindo cirurgia com o laser com alta potência (Er:YAG) e terapia a laser de baixa intensidade nos estágios iniciais da doença, devem ser o padrão-ouro para Osteonecrose da mandíbula relacionada aos Bisfosfonatos.

Porém, observamos na prática clínica uma incidência de deiscências no pós-operatório cirúrgico com recidivas da osteonecrose, havendo necessidade de realizar algum tratamento adjuvante para melhorar a reparação tecidual. Portanto o desenvolvimento de um modelo animal para MRONJ seria importante para estabelecer estratégias de tratamentos baseadas em evidências e associadas a dados e resultados válidos, permitindo realizar procedimentos controlados que modelam fatores de risco clínicos reais da doença.

Utilizamos os modelos animais com a finalidade de biopsiar e estudar histologicamente as lâminas, já que não seria possível realizar tais procedimentos em pacientes. Então para induzir a osteonecrose em animais estabelecemos o modelo descrito por Zandi, 2016, onde a aplicação intraperitonal de ácido zoledrônico associado a extração de elemento dentário, mostrou taxa de sucesso aplicada de 83%.

Assim este protocolo em nosso estudo demonstrou na Tabela 1 e 2, resultado estatisticamente significativo na diminuição dos vasos sanguíneos e nos queratinócitos o que sugere, definitivamente, a necrose no tecido gengival reduzindo a vascularização e a proteção da gengiva. Observamos ainda, a diminuição das células ósseas como os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos, indicando a necrose óssea.

Jang, 2015, também em estudo com objetivo de desenvolver um modelo de osteonecrose em mandíbula de ratos relacionada a bisfosfonatos (BRONJ), injetou ácido zoledrônico intraperitoneal por 4 semanas e posteriormente realizou as exodontias dos 1º e 2º molares esquerdos da mandíbula.

Injeções consecutivas foram realizadas, por mais 2, 4 e 8 semanas e então, os ratos foram eutanasiados e avaliados clínica, radiológica e histologicamente, apresentando características histológicas nos locais de extração com células inflamatórias (neutrófilos), circundando o osso alveolar necrótico com lacunas vazias, formação de sequestros além do osso alveolar com lacunas vazias, mucosa ulcerativa sobrejacente invaginando no alvéolo de extração. (JANG, 2015)

Obtivemos Imagens similares nas lâminas preparadas a partir do tratamento *gold standard* cirúrgico para remoção da osteonecrose de mandíbula.

Conforme a Tabela 2, na osteonecrose, verificou-se diferenças de médias de vasos sanguíneos ($p < 0,001$) e de queratinócitos ($p = 0,004$) entre Grupos tratados em relação ao controle. Isto se deu devido a dificuldade do organismo em resolver o processo inflamatório agudo frente a ação dos BFs, visto que esta fase aconteceu 4 semanas antes no momento das extrações dentárias.

Portanto verificamos no T0 a diminuição da vascularização local e falta de queratina para fechamento primário do tecido gengival e proteção ao osso adjacente. Fato este observado clinicamente com deiscência gengival e exposição de osso com coloração necrótica.

A partir da osteonecrose, foi relevante que pudemos comparar o tecido a nível histopatológico com os outros animais estudados, no pós-operatório do tratamento cirúrgico *gold standard* com o tratamento cirúrgico associado aos tratamentos adjuvantes com emprego dos aparelhos baseados em energia.

Segundo Yoshimura, 2011 em estudo piloto para avaliar os efeitos da exposição aguda a um campo magnético oscilante, do edema em um modelo animal, induzido através de injeção subcutânea de carragenina, mostrou com uma relevância estatística que a frequência de 9 Hz, durante 60s promoveu efeitos positivos na regressão deste edema induzido. Assim utilizamos os mesmos parâmetros dosimétricos em nosso estudo.

Já em relação ao laser, segundo Aguiar, 2020 em estudo com cultura de osteoblastos, após a adição do LPS, com uma irradiação da placa 24 horas após, utilizando Laser de Baixa Intensidade (λ : 660nm, P: 100mW, DE: 3,54J/cm², E:1J, T 10s), observou que a fotobiomodulação denotou resultados positivos na proliferação celular de osteoblastos, mostrando a viabilidade e a adesão celular.

Com objetivo de avaliar os resultados do tratamento cirúrgico e terapia adjuvante com laser de baixa intensidade (Low Level Laser Therapy - LLLT), 11 pacientes com BRONJ em estágio II ou III (AAOMS) receberam aplicações de LLLT durante o pós-operatório de tratamento cirúrgico. A aplicação de LLLT proporcionou resultados favoráveis com eliminação dos sintomas previamente registrados e o fechamento primário da mucosa em todos os pacientes, sugerindo que o LLLT serviu como um complemento seguro e eficaz ao tratamento cirúrgico das lesões de MRONJ (ALTAY, 2014)

A terapia com laser de baixa intensidade tem sido utilizada no tratamento adjuvante para MRONJ, seus benefícios positivos na terapêutica tecidual regula a absorção de edema intra e extracelular, elimina a dor, promove a cicatrização de feridas. Além de impactos bioestimulantes através revelam também o que aumento da quantidade e atividade de osteoblastos auxiliando na síntese de fibroblastos e na reparação óssea, demonstrando ação anti-inflamatória e analgésica e sendo minimamente invasiva. Além de estimular a síntese de fibroblastos e a atividade osteoblástica, melhorando assim a cicatrização do tecido ósseo (WEBER, 2016).

Pinheiro, et al, 2012, avaliaram picos de hidroxiapatita de cálcio em defeitos ósseos enxertados com agregado de trióxido mineral (MTA), proteínas morfogenéticas ósseas e regeneração óssea guiada. Os defeitos foram irradiados com luz LED (comprimento de onda 850±10 nm) em intervalos de 48

horas durante 15 dias. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos picos de CHA entre os defeitos não irradiados em nenhum dos momentos experimentais. Por outro lado, houve diferenças significativas entre os defeitos preenchidos com coágulo sanguíneo e os defeitos irradiados em todos os momentos. Os resultados deste estudo utilizando análise espectral Raman indicam que a irradiação infravermelha de luz LED melhora a deposição de CHA na cicatrização óssea enxertada ou não com MTA.

No presente estudo, segundo Gráfico 2 a resposta inflamatória nos animais foi identificada inicialmente sem diferença estatística entre os grupos em relação a contagem de leucócitos, assim acreditamos que visualizamos um processo inflamatório crônico, sinalizando normalidade nas células de defesa, já que a fase aguda foi há 30 dias no momento das extrações dentárias.

Acompanhando o processo inflamatório até o sétimo dia, observamos uma acentuada leucopenia com diferença estatística significativa ($p=0,024$) no Grupo 2 ON + Cirurgia em relação aos Grupos 4 ON+M E 5 ON+L+M, denotando bioestimulação destes Grupos.

Nos fibroblastos houve bioestimulação no grupo laser e grupo magneto em relação ao grupo osteonecrose + cirurgia, onde, foi encontrado um aumento na vascularização da gengiva quando empregamos o laser e o magneto isoladamente.

Contudo, quando empregados os dois aparelhos, tivemos um processo de bioinibição devido a quantidade de energia entre os dois aparelhos baseados em energia, demonstrando desta maneira uma ação antagônica.

Segundo o Gráfico 5, em relação a contagem de queratinócitos, foi encontrado nos Grupos 3 e 5 mais que o dobro de células em relação ao Grupo 2, mostrando importante bioestimulação para o fechamento da mucosa, bem como na proteção do osso exposto.

Fato este observado em estudo piloto, evidenciando que os pacientes que receberam tratamento adjuvante a cirurgia com laser de baixa intensidade apresentaram cicatrização por primeira intenção, sem deiscência, ausência de sinais flogísticos e melhor analgesia. (RODRIGUEZ, 2019)

A sequência de eventos que levaram ao desenvolvimento da ON não é clara, não se sabe se a necrose precede ou segue a infecção ou vice-versa., contudo sabe-se que a doença dentária é um fator de risco bem estabelecido para ON durante o processo patogênico. Agregados de bactérias e leucócitos polimorfonucleares são comumente observados no tecido ON e a presença de microfílmes bacterianos foi descrita em estreita associação com a reabsorção osteoclástica ativa na superfície óssea. Sabe-se que as bactérias estimulam a reabsorção, portanto, os microrganismos presentes podem contribuir diretamente para a necrose óssea. Além do trauma, os efeitos inibitórios dos BPs na proliferação e viabilidade dos queratinócitos orais, podem danificar ainda mais a integridade da mucosa oral e aumentar o risco de infecção. (KHAN, 2015)

Ao olharmos os resultados dos fibroblastos na gengiva após uma semana, conseguimos identificar uma bioestimulação ascendente tanto no Grupo laser quanto no Grupo magneto, não obstante notamos uma discreta bioestimulação no grupo laser e magneto em relação ao grupo osteonecrose + cirurgia.

Já ao identificarmos os vasos sanguíneos no 7º dia do estudo, encontramos acentuada bioestimulação no Grupo laser sobre o Grupo osteonecrose + cirurgia, o qual apresentou queda significativa em relação ao Grupo 2 ON + cirurgia ($p=0,042$). Já os Grupos magneto e Grupo laser + magneto apresentaram uma estimulação mais discreta.

No Gráfico 9, em relação aos queratinócitos no 7º dia, observou-se bioestimulação estatisticamente significativa $p=0,008$ no Grupo laser + magneto, o que confere uma maior proteção da gengiva ao tecido ósseo, explicando uma melhor cicatrização gengival, como observado em estudo anterior, com fechamento da mucosa oral em pacientes, sem a presença de qualquer deiscência. (RODRIGUEZ, 2020)

Nos animais, após 14 dias, a resolução do processo inflamatório de reparação tecidual gengival já está completa, portanto, em relação aos leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e vaso sanguíneos, observamos normalização em relação ao grupo controle sadio sugerindo homeostasia tecidual. Embora em relação aos fibroblastos no grupo magneto, é identificada uma bioestimulação sugerindo uma melhora na avaliação do tecido ósseo.

É relevante observarmos todo o processo de reparação induzida por aparelhos baseados em energia, especialmente em relação a resposta do tecido ósseo.

No primeiro dia encontramos uma bioestimulação nos osteoblastos, sobretudo, no grupo laser quando comparado com osteonecrose + cirurgia, porém, não sendo equilibrado nos Grupos magneto e laser + magneto em relação ao Grupo controle sadio com $p < 0,001$ (Gráfico 16).

Ainda no primeiro dia pode-se observar que a contagem de osteócitos foi estimulada em todos os aparelhos baseados em energia com um $p = 0,013$, assim também observados bioestimulação nos osteoclastos com $p = 0,043$ (Gráficos 14 e 15).

A supressão da remodelação óssea também pode desempenhar um papel no desenvolvimento de ON, desenvolvendo áreas de necrose na mandíbula, com osteócitos inviáveis no osso afetado. No entanto, a baixa renovação óssea não é caracteristicamente observada no tecido afetado de pacientes com ON. (KHAN, 2015)

No 7º dia do estudo, todos os aparelhos baseados em energia conseguiram estimular osteoblastos e aumentar a contagem de células em relação ao grupo controle sadio, não obstante o grupo laser + magneto talvez tenha inibido as células devido ao excesso de energia $p < 0,001$ (Gráfico 19).

No 7º dia, os osteócitos apresentaram estímulo de formação óssea na mandíbula quando comparado com o Grupo osteonecrose + cirurgia $p = 0,001$. Contudo é relevante mencionar que o Grupo magneto quase alcança o Grupo controle sadio, com resposta mais rápida do que os demais equipamentos.

O mesmo ocorreu nos osteoclastos neste período, com aumento nos Grupos laser e magneto isolados ($p = 0,001$), denotando aumento da atividade óssea sobre o grupo controle (Gráfico 18).

Já aos 14 dias, encontramos a fase de maturação óssea, levando o tecido ósseo para a homeostase como encontrado nos pacientes. Observamos nos osteoblastos ($p = 0,003$), osteócitos ($p = 0,002$) e osteoclastos ($p = 0,004$) resultados estatisticamente significantes entre os grupos, sinalizando melhor ossificação comparado ao Grupo controle sadio (Gráficos 20,21,22).

Tal fato respalda os resultados que obtivemos durante o tratamento com aparelhos baseados em energia em pacientes, com aumento da densidade óssea mensurados pela escala Hounsfield na tomografia de controle após 60 dias de tratamento. (RODRIGUEZ, 2020)

Os resultados relevantes que prevalecem na resposta do tecido gengival e ósseo, com o uso de aparelhos baseados em energia, apresentaram-se diferentes em tempos distintos. Porém, é importante mencionar que os tempos foram significantes nos primeiros dias dos tratamentos.

O uso da magnetoterapia foi fundamental para a recuperação do tecido ósseo em menor tempo, para sua reparação de forma extremamente eficiente, sem apresentar qualquer efeito adverso durante a primeira fase, ainda durante o processo hemorreológico, assim como na fase inflamatória através da redução do processo celular e amadurecimento na resposta de maturação das células no tecido gengival, em particular pela fotobiomodulação durante a aplicação da laserterapia (vasos sanguíneos e queratinócitos), uma vez que estes são encontrados na última fase da cicatrização.

Foi significativa a resposta rápida do tecido ósseo, inclusive quanto ao tempo de resolução das células de linhagem óssea que, em geral recua durante o tempo da cicatrização óssea. Entretanto, no último caso, foi possível observar a efetividade do tempo de reparação celular (fibroblasto e osteócito), bem menor durante o uso da magnetoterapia, facilitando inteiramente a homeostase celular/tecidual.

A aplicação de Laser de baixa intensidade proporcionou efeitos favoráveis com eliminação dos sintomas, previamente, referidos e o fechamento primário da mucosa em todos os pacientes, conforme já demonstrado em trabalhos de diversos profissionais da área médica e odontológica, segundo Chavantes, 2022 e Nunez, 2022, demonstrando que a Laserterapia funcionou, adequadamente, além de servir como um complemento seguro e eficaz ao tratamento cirúrgico das lesões de MRONJ.

Em nosso estudo verificamos que tanto a terapia com o emprego do Laser quanto a Magnetoterapia foram eficientes na redução do processo inflamatório quanto na reparação tecidual tanto em animais quanto em nossos pacientes.

Creemos que tais tratamentos podem vir a beneficiar pacientes acometidos de MRONJ ao aplicarmos estas novas possibilidades terapêuticas reduzindo o tempo de internação e beneficiando tais pacientes devido a todo processo cicatricial e analgesia.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que as terapias adjuvantes, utilizando dispositivos baseados em energia, como a Fotobiomodulação e a Magnetoterapia, separadamente, demonstraram uma resposta mais eficaz em atenuar o processo inflamatório, quando comparadas ao grupo submetido à osteonecrose + cirurgia padrão-ouro em animais com BRONJ.

Destacamos ainda, a seguir:

- O Grupo Laser denotou resultados superiores no tecido gengival nos períodos de 1º e 7º pós-operatório.
- Tanto o Grupo Laser quanto o Grupo Magneto utilizados separadamente exibiram maior atividade óssea, evidenciada sobretudo pelo aumento de osteoblastos e de osteoclastos no dia 7, favorecendo a ossificação da região afetada e a restauração da homeostase dos Grupos analisados.
- Encontramos no Grupo Laser + Magneto uma possível bioinibição, sugerindo um potencial excesso de energia devido à combinação de ambos os dispositivos. No entanto, destaca-se um incremento na camada protetora de queratina e na redução de células inflamatórias já no 7º dia.
- Após 14 dias, todos os Grupos denotaram higidez
- Em suma, o estudo demonstrou que a utilização separada dos equipamentos foi melhor.

7. CONSIDERAÇÕES FUTURAS

Se faz necessário um novo estudo em humanos. com maior número de pacientes, a fim de que se possa reproduzir esta pesquisa e avaliar os resultados.

A prescrição de alendronato seria desnecessária, se ocorresse a prevenção, contudo encontramos profissionais que desconhecem os efeitos adversos desta classe de medicamentos.

Demonstrar a importância de intervir precocemente, tratando de maneira correta e eficaz, através de um protocolo bem definido com aparelhos baseados em energia.

O tratamento precoce é muito relevante, podendo evitar a progressão da doença, reduzindo as complicações e incorrendo em melhor qualidade de vida para estes pacientes.

Se faz necessário um novo estudo em humanos. com maior número de pacientes, a fim de que se possa reproduzir esta pesquisa e avaliar definitivamente os resultados.

8. REFERÊNCIAS

1. Abreu, D. F. Participação do macrófago e mediadores inflamatórios em modelo experimental de osteonecrose em camundongos swiss tratados com ácido zoledrônico. 2019. 59 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
2. Aguirre, J. I., E. J. Castillo, and D. B. Kimmel. "Preclinical models of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ)." *Bone* 153 (2021): 116184.
3. Altay, M. A., Tasar, F., Tosun, E., & Kan, B. (2014). Low-level laser therapy supported surgical treatment of bisphosphonate related osteonecrosis of jaws: a retrospective analysis of 11 cases. *Photomedicine and laser surgery*, 32(8), 468-475.
4. Allen, M. R., & Burr, D. B. (2014). Bone modeling and remodeling. In *Basic and applied bone biology* (pp. 75-90). Academic Press.
5. Bartl R, Frisch B, von Tresckow E, Bartl C. Bisphosphonates in medical practice actions, side effects, indications, strategies. Berlin/New York: Springer; 2007
6. Bassett CA, Donath A, Macagno F, Preisig R, Fleisch H, Francis MD. Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans. *Lancet*. 1969;2(7625):845.
7. Campisi, G.; Mauceri, R.; Bertoldo, F.; Bettini, G.; Biasotto, M.; Colella, G.; Consolo, U.; Di Fede, O.; Favia, G.; Fusco, V.; et al. Medication-Related Osteonecrosis of Jaws (MRONJ) Prevention and Diagnosis: Italian Consensus Update 2020. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, 17, 5998.
8. Carmo Filho, J. R. L. Avaliação temporal da migração de neutrófilos e mediadores inflamatórios em mandíbulas de camundongos swiss tratados com ácido zoledrônico. 2018. 50 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
9. Chavantes M.C. Laser em Biomedicina. 2009. Ed Atheneu
10. Consolaro, A. (2009). Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. Maringá: Dental Press 2009. ISBN 978-85-88020-48-1
11. Douglas CR. Fisiologia aplicada a odontologia 2º ed. São Paulo, Pancast, 1988
12. Fleisch HA, Russell RG, Bisaz S, Mühlbauer RC, Williams DA. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals

in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest.* 1970;1(1):12–8

13. Fleisher, K. E., Kontio, R., & Otto, S. (2016). *Antiresorptive drug-related osteonecrosis of the jaw (ARONJ): a guide to research* (pp. 45-55). Davos Platz: AO Foundation.

14. Fliefel, R., M. Troltsch, J. Kuhnisch, M. Ehrenfeld, S. Otto: Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2015;

15. Funk, R. H., Monsees, T., & Özkucur, N. (2009). Electromagnetic effects—From cell biology to medicine. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 43(4), 177-264.

16. Goker, F., Grecchi, E., Grecchi, F., Francetti, L., & Del Fabbro, M. (2021). Treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). A systematic review. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*

17. Guyton, A. C., Hall, J. E. (2011). *Tratado de fisiologia médica*. Elsevier Brasil. 12 ed

18. Jang, H. W., Kim, J. W., & Cha, I. H. (2015). Development of animal model for Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Maxillofacial plastic and reconstructive surgery*, 37(1), 1-7.

19. Karu TI (1988) Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci* 2:53–74

20. Khan, A. A., Morrison, A., Hanley, D. A., Felsenberg, D., McCauley, L. K., O’Ryan & International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw. (2015). Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(1),3-23.

21. Kuchinski, F.B. Glossário de Histologia Dental e Periodontal, 7ª edição, 1995, Mogi das Cruzes, SP

22. Lechner, J., Kaniak, R., Osteonecrose cavitação dos maxilares: de inflamação bucal assintomática as doenças sistêmicas. Maringá: Massoni Gráfica e Editora 2022. ISBN 978-65-87542-42-3

23. Lesclous P, Grabar S, Abi Najm S, Carrel JP, Lombardi T, Saffar JL, et al. Relevance of surgical management of patients affected by bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. A prospective clinical and radiological study. *Clin Oral Investig.* 2014;18(2):391–9. PubMed PMID: 23604698.

24. Marx, RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis Treatment strategies and outcomes of BRONJ 579 of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1115–7

25. Mester E, Mester AF, Mester A (1985) The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med* 5:31–39
26. Meyer, P. F., Paiva, A., Cavalcanti, S., da Silva, E. M., da Silva, R. M. V., de Souza Costa, L., & Ronzio, O. A. (2011). Magnetoterapia: é possível este recurso fazer parte da rotina do fisioterapeuta brasileiro?. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*, 36(1).
27. Miachon, M. D., Pinto, N. C., Zamuner, S. R., & Chavantes, M. C. (2022). Analysis of the Potential of Blood Transvascular Sublingual with Light-Emitting Diode Irradiation in COVID-19 Patients: A Pilot Clinical Study. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 40(9), 622-631.
28. Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003 Nov;21(22):4253-4254. DOI: 10.1200/jco.2003.99.132. PMID: 14615459.
29. Nishida S, Tsubaki M, Hoshino M, Namimatsu A, Uji H, Yoshioka S, et al. Nitrogen-containing bisphosphonate, YM529/ONO-5920 (a novel minodronic acid), inhibits RANKL expression in a cultured bone marrow stromal cell line ST2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Mar 4; 328(1):91-7.
30. Nunez, S. C., Garcez, A. S., & Ribeiro, M. S. (2022). Aplicações clínicas do laser na odontologia. Livro Editora Manole, São Paulo
31. Otto, S Medication related osteonecrosis of the jaws 2016. ISBN 978-3-662-43732-2. DOI 0.1007/978-3-662-43733-9. Springer Heidelberg New York Dordrecht London
32. Pinheiro, A. L., Soares, L. G., Cangussú, M. C. T., Santos, N. R., Barbosa, A. F. S., & Júnior, L. S. (2012). Effects of LED phototherapy on bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: a Raman spectroscopic study. *Lasers in medical science*, 27, 903-916.
33. Rodriguez, A. C., Silva, C. E. X. S. R., Costa, D. M., Martins, M., Oliveira, V., Neto, R. M. S. & Chavantes, M. C. (2019). Low level laser therapy as coadjuvant in bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws: a pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 48, 103.
34. Rodriguez, A. C. (2020). Ensaio clínico piloto na avaliação da resposta à terapia de fotobiomodulação e magnetoterapia em osteonecrose dos maxilares induzida pelo uso do alendronato de sódio.
35. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw—2014 update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Oct; 72(10):1938–1956.
36. Ruggiero, S. L., Dodson, T. B., Aghaloo, T., Carlson, E. R., Ward, B. B., & Kademani, D. (2022). American Association of Oral and Maxillofacial

Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2022 Update. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.

37. Silva, R. M. V. D., Xavier, W. J. C., Dantas Neto, R. G., Azevedo, V. M. D., Nascimento, B. J. R. D., Oliveira, J. F. D., & Meyer, P. F. (2016). Efeitos da magnetoterapia no tratamento da dor na osteoartrose de joelho. *ConScientiae Saúde*, 15(2), 281-287.
38. Suyama, K., Otsuru, M., Nakamura, N., Morishita, K., Miyoshi, T., Omori, K., Umeda, M. (2023). Bone resection methods in medication-related osteonecrosis of the jaw in the mandible: An investigation of 206 patients undergoing surgical treatment. *Journal of Dental Sciences*.
39. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Gründker C, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Mar 1; 291(3):680-6.
40. Yan R, Jiang R, Hu L, Deng Y, Wen J, Jiang X. Establishment and assessment of rodent models of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). *Int J Oral Sci*. 2022 Aug 10;14(1):41. doi: 10.1038/s41368-022-00182-4. PMID: 35948539; PMCID: PMC9365764.
41. Yoshimura TM, Meneguzzo DT, Lopes-Martins RA. A pilot study – acute exposure to a low-intensity, low-frequency oscillating magnetic field: effects on carrageenan-induced paw edema in mice, *Revista Brasileira de Fisica Medica*.2011;5(1):53-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.29384/rbfm.2011.v5.n1.p53-56>
42. Weber, J. B. B., Camilotti, R. S., & Ponte, M. E. (2016). Efficacy of laser therapy in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): a systematic review. *Lasers in medical science*, 31, 1261-1272.,
43. Zandi M, Dehghan A, Malekzadeh H, Janbaz P, Ghadermazi K, Amini P. Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model. *J Craniomaxillofac Surg*. 2016;44(3):271–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.12.010>.