



LETÍCIA GABRIELLA DE SOUZA RODRIGUES

**Uso da terapia fotodinâmica, beta-tricálcio fosfato e doxíciclina
no reparo alveolar de ratos induzidos a osteonecrose: análise por
micro-tomografia, microscopia confocal a laser e
histomorfométricas**

Araçatuba

2022

LETÍCIA GABRIELLA DE SOUZA RODRIGUES

Uso da terapia fotodinâmica, beta-tricálcio fosfato e doxíciclina no reparo alveolar de ratos induzidos a osteonecrose: análise por micro-tomografia, microscopia confocal a laser e histomorfométricas

Trabalho de conclusão de curso apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Cirurgiã Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Francisley Ávila Souza

Araçatuba

2022

Gostaria de dedicar esse trabalho primeiramente a Deus, pela sua infinita bondade e graça, e por Ele estar sempre conduzindo meus passos, e colocando em meus caminhos pessoas sensacionais. E dedico também a minha família, por todo seu amor e apoio que sempre me ofereceram, e saibam que se eu pudesse voltar no tempo, e escolher uma família para estar, eu escolheria mil vezes vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, porque sem ele nada disso seria possível, sou imensamente grata a Ele por tudo que ele tem me proporcionado e me permitido viver, pelas pessoas que ele tem colocado em meu caminho, por me direcionar a minha vida por caminhos felizes e experiências essenciais, sei que tudo é graças a Ele

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. **Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor Prof. **Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela sua dedicação, profissionalismo, que nos ofereceram por esses anos.

Agradeço também a todos **os Professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** por tudo que nos ensinaram, os profissionais que estamos nos tornando é fruto do trabalho de vocês de todos esses anos, onde juntos, e cada um com um conhecimento diferente, nos ensinaram não apenas uma profissão tão encantadora, que é a odontologia, mais também nos ensinaram a ser humanos, tratando os pacientes com todo o profissionalismo e amor que são necessários para o êxito da profissão.

A agência de Fomento **FAPESP**, Processo nº 2019/27609-1, Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo, por ter me concedido bolsas de pesquisa que foram tão importantes para mim nessa jornada.

Aos **animais**, *in memoriam*, que sacrificaram suas vidas em prol da ciência.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, pela oportunidade de ter sido aluna dessa instituição, sou imensamente grata, por tudo que pude aprender e viver dentro dessa Universidade, pelas pessoas que conheci, pelos conhecimentos que me foram passados, a linda profissão que me foi ensinada, o tratar pessoas, cuidar, conversar, são coisas que me ajudaram a construir partes da pessoa que sou, e que só me fazem sentir uma imensa alegria e gratidão

pela oportunidade de poder ter vivido tudo isso como aluna UNESP, sendo esse um lugar ao qual meu coração pertence.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Francisley Ávila Souza**, por ter me aceito como sua aluna de Iniciação Científica, por tudo que me ensinou, pela sua paciência e positividade, e por ter acreditado em mim, pelas oportunidades que o professor me proporcionou, por tudo que aprendi e vivi sendo sua aluna, essa sem dúvida, foi uma das melhores escolhas que eu já fiz em toda a minha vida. Quando o professor me abriu essa porta, me introduziu na parte científica da faculdade, que conseguiu ser ainda mais incrível do que eu imaginava, onde entrei em um grupo com pessoas sensacionais, que sempre me acrescentam e ensinam tanto.

Ao doutorando **Henrique Hadad**, que sem dúvida é uma das pessoas mais extraordinárias que eu já conheci em toda a minha vida, onde entrei como sua aluna de iniciação científica, e através dessa relação pude ser presenteada com a sua amizade, uma relação leve. Sou imensamente grata a tudo que você me ensinou e ensina a cada dia Henrique, pela sua paciência e parceria, por me orientar, me instruir, sou imensamente honrada por poder aprender com você. E também pelos nossos momentos incríveis no departamento, pelas nossas risadas, e por você acreditar mais em mim do que eu mesma, sem dúvida, só posso agradecer muito a Deus pelos nossos caminhos se cruzarem. Trabalhar com você pra mim é sensacional, assim como você é. Me faltam palavras pra te agradecer por tudo que você fez e faz por mim, apenas obrigada infinitamente.

A doutoranda **Laís Kawamata de Jesus**, por tudo que me ensinou e ensina, por também me presentear com a sua amizade e sabedoria, onde desde o meu primeiro dia como aluna de iniciação científica me acolheu e me ensinou tantas coisas, que vão muito além do conhecimento científico, com certeza, a sua presença tornou as nossas pesquisas mais leves e felizes.

Gostaria de agradecer imensamente aos meus **pais**, minha **mãe Sonia**, meu **pai José Carlos**, por serem meu apoio e referencia todos esses anos, por me ajudarem para que esse sonho se tornasse realidade, apesar de todas as dificuldades, que graças a Deus e a vocês, sempre puderem ser contornadas, vocês têm o meu respeito, minha admiração e o meu amor.

A minha irmã **Sabrina**, por ser uma pessoa sensacional e me entender e conversar sempre que eu precisei, com uma alma leve e um coração bom, sempre me ajudou e me inspira em todos os sentidos. As minhas sobrinhas **Maria Eduarda e Valentina**, que sempre alegram os meus dias e a minha vida, e também o meu cunhado **Agrício**. Agradeço também aos meus **avós, minha avó Luzia, minha avó Arayrdes, meu avô José**, por toda a experiência de vida que vocês compartilham comigo, por toda o suporte que vocês me dão, por tudo. Também agradeço a todos os meus familiares, tios e tias, primos e primas, obrigada por tudo sempre.

As minhas **amigas de faculdade, Ana Flávia Folhas, Beatriz Araújo, Izabela Delamura**, sempre eu achei que eu poderia fazer muita coisa sozinha, mas vocês me mostraram que em conjunto com pessoas sensacionais como vocês, a gente consegue chegar bem mais longe. Obrigada por fazer nossos anos de graduação anos incríveis, por tornarem dias difíceis mais leves, provas complicadas em apenas pequenos obstáculos, situações ruins em divertidas histórias. Depois foi chegando mais gente pra dividir conosco essa caminhada, **Mirela Gasperoni, Natália Moraes e Priscila Marchesini**, que são pessoas sensacionais, conseguem contagiar o lugar que elas estão com uma energia boa, sempre acrescentando nas nossas vidas. Adoro estar com vocês e rir com vocês. De alguma maneira a gente se completa e se entende, obrigada por caminharem comigo, e por fazerem esse trajeto mais feliz, dia após dia.

Á mestranda **Maisa Pereira Silva**, por toda ajuda e conhecimentos passados, a doutoranda **Ana Flavia Piquera Santos**, por tudo que me ensinou e pelas suas histórias sensacionais.

Também agradeço imensamente ao meu **grupo de pesquisa**, quando eu comecei era apenas o **Henrique Hadad, a Laís Kawamata e a Ana Flavia Piquera**, depois foi chegando mais gente, todos para acrescentar e somar conosco. Agradeço aos **pós graduandos Henrique Hadad, Laís Kawamata, Ana Flavia Piquera, Maisa Pereira, Paulo Matheus, Maria Eduarda Freitas, Harrisson, Giovani Saci**, e também aos meus amigos de iniciação científica, **Luis Fernando Alves, Olivia Maria, Kezia Mendes, Lilian Matos, Maria Carolina, Júlia Pietro, Beatriz Costa e Beatriz Medeiros**. Juntos nós aprendemos e crescemos, sempre agradeço pela nossa parceria.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

RODRIGUES, LGS. **Uso da terapia fotodinâmica, beta-tricálcio fosfato e doxiciclina no reparo alveolar de ratos induzidos a osteonecrose: análise por micro-tomografia, microscopia confocal a laser e histomorfométrica** (Trabalho de Conclusão de Curso) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

Resumo

Os bifosfonatos (BF's) são medicamentos antirreabsortivos empregados no tratamento de desordens esqueléticas, como a osteoporose, porém seu uso prolongado pode induzir a osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMIM), e o tratamento desta condição representa um desafio para odontologia. O objetivo deste projeto foi avaliar o efeito de terapias preventivas sobre a OMIM, durante o processo de reparo alveolar em ratos. Foram utilizados 72 ratos *wistar*, os quais foram tratados com 04 aplicações de 0,035 mg/kg de ácido zoledrônico (ZOL) por via caudal com intervalos de 15 dias entre as aplicações e posteriormente tiveram seus molares inferiores direitos removidos. Após a exodontia, os animais seguiram com o tratamento com ZOL no mesmo protocolo até a eutanásia. Os animais foram divididos em nove grupos (n=8) de acordo com o tratamento do alvéolo dental: GS (Sham – não foi aplicado ZOL), GC (Coágulo), G β (β -tricálcio-fosfato), GD (gel de doxiciclina a 10%), GP (terapia foto-dinâmica), GD β (gel de doxiciclina a 10% + β -tricálcio-fosfato), GP β (terapia foto-dinâmica + β -tricálcio-fosfato), GPD (terapia foto-dinâmica +gel de doxiciclina a 10%), GPD β (terapia foto-dinâmica +gel de doxiciclina a 10% + β -tricálcio-fosfato). Foi realizado análise *in vivo* e para a etapa de cortes mineralizados foram utilizados 72 animais, onde após 28 dias da data de exodontia, os animais foram eutanasiados para a avaliação através: 1) aplicação dos fluorocromos (calceína e alizarina) seguido da análise de microscopia confocal a laser, 2) análise microtomográfica e 3) análise histomorfométrica para determinação da porcentagem de osso neoformado (%NBA), tecido conjuntivo e osso sem vitalidade. A microCT demonstrou que todos os grupos apresentaram maiores médias de BV/TV quando comparados a GS (42,17% \pm 2,65) e o melhor resultado foi de GPDB (69,85% \pm 6,25), seguido por GPD e GDB (64,62 \pm 0,13 e 64,69 \pm 4,40), quando comparado ao GC, GS, GP e GPB (P < 0,05). GS demonstrou sequestros ósseos, enquanto as terapias permitiram o processo de reparo alveolar. A taxa MAR de GPDB apresentou a maior aposição diária (2,64 \pm 0,48) quando comparado a todos os grupos (p < 0,001), exceto por GDB (p = 0,359), que obteve segundo maior MAR (2,30 \pm 0,37). GPDB apresentou a maior média de %NBA (82,44 % \pm 2,69), quando comparado a todos os grupos (p < 0,05), seguido pelo grupo GDB (60,82 % \pm 4,37) e apenas GS apresentou formação de osso sem vitalidade (37,94 \pm 18,70%). Entre os tratamentos aplicados de forma isolada, GB apresentou o melhor %NBA (57,13 % \pm 5,89), principalmente quando comparado ao GP (p = 0,022) e GS (p = 0,001). Conclui-se que o protocolo de ZOL aplicado nessa pesquisa foi capaz de induzir a necrose óssea e que o uso das terapias locais no alvéolo dos ratos tratados com ZOL, isoladas ou associadas, foram capazes de prevenir a OMIM.

Palavra-Chave: Osteonecrose, Terapia fotodinâmica, Doxiciclina, Alvéolo dental.

RODRIGUES, LGS. Use of photodynamic therapy, beta-tricalcium phosphate and doxycycline in the alveolar repair of rats induced by osteonecrosis. microtomographical, laser confocal microscopy analysis end histomorphometric. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Bisphosphonates are anti-resorptive drugs used in the treatment of skeletal disorders, such as osteoporosis, but their prolonged use may induce osteonecrosis of the jaw (MRONJ), which represents a challenging treatment for dentistry. The aim of this project will be to evaluate the preventive effect of therapies on MRONJ during the alveolar repair process in rats. For this, 360 wistar rats will be used, which will be treated with 04 applications of 0.035 mg / kg of zoledronic acid (ZOE) through the caudal vein with 15 days intervals between applications and subsequently have their right lower molars removed. After extraction, the animals will continue treatment with ZOE in the same protocol until euthanasia. The animals will be divided into seven groups according to the treatment of the dental socket: GS (Sham – ZOE will apply), GC (blood clot only), G β (β -tricalcium phosphate), GD (10% doxycycline), GP (photo-dynamic therapy), GD β (10% doxycycline + β -tricalcium phosphate), GP β (photo-dynamic therapy + β -tricalcium phosphate), GPD (photodynamic therapy + 10% doxycycline), GPD β (photo-dynamic therapy + 10% doxycycline + β -tricalcium phosphate). . For in vivo analysis, in the calcified cuts will be used 72 animals, where after 36 days from the date of extraction, the animals will be euthanized for evaluation by 1) application of fluorochromes (calcein and alizarin) followed by confocal laser microscopy analysis. and 2) microtomographic analysis end 3) histomorphometric analysis to determine the percentage of newly formed bone (%NBA), connective tissue and bone without vitality, MicroCT showed that all groups had higher means of BV/TV when compared to GS (42,17% \pm 2,65) and the best results was GPDB (69,85% \pm 6,25), followed by GPD and GDB GPD e GDB (64,62 \pm 0,13 e 64,69 \pm 4,40), when compared to GC, GS, GP, and GPB (P < 0,05). GS demonstrated bone sequestration, while the therapies enabled the alveolar reoais process. The MAR rate of GPDB had the highest daily apposition (2,64 \pm 0,48) when compared to all groups (p < 0,001), except for GDB (p = 0,359), which had the second highest MAR (2,30 \pm 0,37). GPDB had the highest mean of %NBA (82,44 % \pm 2,69), when compared to all groups (p < 0,05), followed by the GDB group (60,82 % \pm 4,37) and only GS presented bone formation without vitality (37,94 \pm 18,70%). Among the treatments applied in isolation, GB presentead the best %NBA (57,13 % \pm 5,89), especially when compared to GP (p = 0,022) and GS (p = 0,001). It is concluded that the ZOL protocol applied in this research was able to induce bone necrosis and that

the use of local therapies in the alveolus of rats treated with ZOL, alone or in combination, were able to prevent OMIN.

Keywords: Osteonecrosis, Photodynamic Therapy, Doxycycline, Dental Alveolus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo Cirúrgico, A) Imagem ilustrativa e representativa do procedimento cirúrgico para extração do primeiro molar inferior direito com uso de sindesmótomo adaptado (Hollenback 3s); B) Primeiro molar inferior direito extraído.

Figura 2. Aplicação dos tratamentos nos alvéolos dos animais recém extraídos.

Figura 3. Imagem representativa das médias de porcentagem do volume ósseo em todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada.

Figura 4. Imagem representativa da média da espessura das trabéculas ósseas (em mm) de todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada. Fonte: autoria própria.

Figura 5. Imagem representativa da média do número de trabéculas / mm de todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada.

Figura 6. Imagem representativa da separação das trabéculas / mm em todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada.

Figura 7. Imagem representativa das médias de porcentagem de porosidade geral de todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada.

Figura 8. Imagens do grupo GC, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.

Figura 9. Imagens do grupo GS, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.

Figura 10. Imagens do grupo GP, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.

Figura 11. Imagens do grupo GB, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.

Figura 12. Imagens do grupo GD, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de

primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.

Figura 13. Imagens do grupo GPB, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.

Figura 14. Imagens do grupo GPD, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.

Figura 15. Imagens do grupo GDB, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.

Figura 16. Imagens do grupo GPDB, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.

Figura 17. Gráfico representativo das médias de mineralização óssea/dia de acordo com os grupos avaliados nesse estudo. * significa diferença estatística ($p < 0.001$) quando comparado a GPDB; # diferença estatística ($p < 0.001$) quando comparado a GDB; † diferença estatística ($p < 0.001$) quando comparado a GPD; ° diferença estatística ($p < 0.001$) quando comparado a GB; Δ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GD; □ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GPB; Φ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GP.

Figura 18. Imagens do osso alveolar do grupo GC, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

Figura 19. Imagens do osso alveolar do grupo GS, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

Figura 20. Imagens do osso alveolar do grupo GP, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

Figura 21. Imagens do osso alveolar do grupo GB, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

Figura 22. Imagens do osso alveolar do grupo GD, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

Figura 23. Imagens do osso alveolar do grupo GPB, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

Figura 24. Imagens do osso alveolar do grupo GPD, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

Figura 25. Imagens do osso alveolar do grupo GDB, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

Figura 26. Imagens do osso alveolar do grupo GPDB, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.

Figura 27. Gráfico representativa da dinâmica/composição do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo. Os componentes avaliados foram Tecido Conjuntivo, Área óssea Neoformada e Tecido necrótico (osso não vital).

Figura 28. Gráfico representativo das médias da porcentagem de área óssea neoformada de acordo com os grupos avaliados nesse estudo. * significa diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GPDB; # diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GDB; † diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GPD; ° diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GB; □ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GPB; Δ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GD; Φ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GP; ▼ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GS.

Figura 29. Gráfico representativo das médias da porcentagem da área de tecido conjuntivo de acordo com os grupos avaliados nesse estudo.

Figura 30. Fotomicrografia representativa do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo, corado em azul de Stevenel e Alizarina no aumento de 1.6x (azul – tecido conjuntivo; rosa – tecido mineralizado). Desse modo a imagem A) representa o grupo GC; B) GS; C)GP; D)GB; E)GD; F)GPB; G)GPD; H)GDB; e I) GPDB.

Figura 31. Fotomicrografia representativa do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo, corado em azul de Stevenel e Alizarina no aumento de 40x (azul – tecido conjuntivo; rosa – tecido mineralizado). Desse modo a imagem A) representa o grupo GC; B) GS; C) GP; D) GB; E) GD; F) GPB; G) GPD; H) GDB; e I) GPDB.

LISTA DE SIGLAS

%CT	tecido conjuntivo
%NBA	porcentagem de osso neoformado
%NTB	área de osso necrótico
(P =)	diferença estatística
BF's	bifosfonatos
BP	bifosfonatos
BV	volume ósseo
BV/TV	porcentagem do volume ósseo
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
G β	β -tricálcio-fosfato
GC	Coágulo
GD	gel de doxiciclina a 10%
GD β	gel de doxiciclina a 10% + β -tricálcio-fosfato
GP	terapia foto-dinâmica)
GP β	terapia foto-dinâmica + β -tricálcio- fosfato
GPD	terapia foto-dinâmica +gel de doxiciclina a 10%
GPD β	terapia foto- dinâmica +gel de doxiciclina a 10% + β -tricálcio-fosfato
GS	Sham
IP	injeção intraperitoneal
MAR	taxa de aposição mineral
MicroCT	Microtomografia Computadorizada
NaCl 0,9%	soro fisiológico
OMIM	osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos
ONJ	osteonecrose da mandíbula
Po.tot	Porosidade Total
Tb.N	Número de trabéculas
TB.Sp	Separação de trabéculas
Tb.Th	espessura do trabeculado ósseo
ZOL	ácido zoledrônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	3
3 MATERIAIS E MÉTODOS	4
3.1 Grupos experimentais	5
3.2. Análise Análise Microtomográfica (Micro-Ct).....	8
3.3 Análise de Microscopia confocal a laser.....	8
3.4 Análise Estatística.....	9
3.5 Análise Histomorfométrica.....	9
4 RESULTADOS	11
4.1. Resultados da Análise Análise Microtomográfica (Micro-Ct).....	11
4.2 Resultados da Análise de Microscopia confocal a laser.....	20
4.3 Resultados da Análise Histomorfométrica.....	29
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	40
7 REFERÊNCIAS	41
ANEXO	4

1 INTRODUÇÃO

Desde 2003 osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMIM), tem sido observada através de relatos de casos cada vez maiores. Representa uma complicação grave relacionada com pacientes que faziam uso de antirreabsortivos e sofreram trauma da extração dentária.^{1,2}

A OMIM é definida como osso exposto que persiste por mais de oito semanas em pacientes tratados com antirreabsortivos ou agentes antiangiogênicos e sem terapia de radiação prévia ou doença metastática dos maxilares.³ Essa complicação é mais frequente em mulheres do que em homens e a idade média é de 66 anos e sua incidência é mais alta na mandíbula do que na maxila, com uma proporção de 2:1.⁴

Os antirreabsortivos mais prescritos pertencem a classe dos bifosfonatos. São utilizadas em tratamentos de doenças que causam o aumento da absorção óssea, como osteoporose e metástase óssea.^{5,6} Sua forma de ação consiste em diminuir a taxa de remodelamento ósseo e impedir que os osteoclastos realizem absorção óssea e induzir apoptose.^{7,8}

Os bisfosfonatos (BP) são medicamentos, frequentemente prescritos na terapia de várias condições patológicas que afetam os ossos, como a osteoporose por exemplo. Por outro lado, o uso prolongado da medicação podem causar efeitos colaterais. Além disso, a OMIM tornou-se um tópico muito popular entre os médicos devido à sua natureza inacessível e resultado imprevisível.⁹⁻¹¹

O mecanismo de ação dos bifosfonatos ocorre de duas maneiras: pela afinidade pelo mineral ósseo, resultando em captação seletiva do órgão-alvo e atingindo alta concentração local no osso, ou inibindo a diferenciação dos osteoclastos, reduzindo a atividade dos osteoclastos, e induzindo apoptose por osteoclastos, resultando em aumentos concomitantes na densidade óssea. Os bifosfonatos contendo nitrogênio são mais potentes e se acumulam na concentração máxima na matriz e nos osteoclastos. O aumento concomitante da densidade óssea pode resultar em risco aumentado de desenvolvimento de osteonecrose da mandíbula (ONJ), pois o micro traumatismo constante do movimento da mandíbula e a falta de remodelamento adequado na presença de bifosfonatos, podem contribuir para a gênese da ONJ. O risco de desenvolver ONJ aumenta em um caso que toma o medicamento por um período mais longo, especialmente naqueles com bifosfonatos intra-venoso.^{7,8,12}

A terapia da OMIM pode ser de grande duração, por vezes deixar sequelas no

paciente ou ainda não ter sucesso. Elas podem contar com antibioticoterapia ou medidas cirúrgicas conservadoras, ou não.¹³ A taxa de sucesso em tratamentos cirúrgicos é maior do que os tratamentos feitos somente com antibioticoterapia,¹⁴ contudo o tratamento pode ser desafiador e pode afetar adversamente a qualidade de vida do paciente.¹⁵ As terapias alternativas para tratamento e prevenção da OMIM tem sido grande alvo de estudos e vem demonstrando bons resultados.

O controle da infecção é fundamental no tratamento das lesões relacionadas a OMIM, e as terapias podem envolver desde antibióticos tópicos quanto aplicação de antibioticoterapia sistêmica.¹⁶ Dentre os antimicrobianos destaca-se a doxiciclina (isômero estrutural da tetraciclina), pois apresenta ação antibacteriana, anti-inflamatória, anticolagenase, além de que, estudos prévios publicados têm demonstrado que seu ponto de atuação é a inibição da osteoclastogênese, o que favorece o processo de reparação óssea.¹⁷⁻

21

O uso da fotobiomodulação com laser de baixa potência promove a bioestimulação do processo de reparo ósseo também vem sendo descrita para o tratamento da OMIM, e os resultados demonstram uma melhora no processo de reparo alveolar, maior quantidade de osso neoformado, maior quantidade de fibras colágenas maduras, além da diminuição da imunorreatividade do TNF α e IL-1 β .¹³

Estudos com uso de cerâmicas sintéticas a base de fosfato de cálcio em modelos de OMIM demonstram redução ou ausência de toxicidade para fibroblastos.²² O β -tricálcio-fosfato é um biomaterial de origem sintética, biocompatível, bioativo que possui boa absorção e boa propriedade biológica de osteocondução.²³ Este biomaterial é progressivamente reabsorvido e substituído por osso novo, sendo capaz de atuar como um favorável meio para colonização de células osteogênicas.²⁴ Estudos prévios publicados tem demonstrado que este biomaterial reduz significativamente a perda óssea após procedimento de exodontia, modulando a remodelação óssea.²⁵

É importante salientar que os tratamentos adjuntos, em combinação ou não com as cirurgias vêm sendo descritos na literatura.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar por meio da análise microtomográfica, por microscopia confocal a laser e histomorfometria de tecido mineralizado, a prevenção da osteonecrose induzida por meio de infusão endovenosa do ácido zoledrônico, utilizando terapia fotodinâmica associada ou não ao gel de doxiciclina 10% e ao biomaterial de β -tricálcio fosfato no reparo alveolar de molares superiores de ratos.

Objetivo Específico:

Avaliar de forma comparativa, os efeitos da terapia fotodinâmica em associação ao biomaterial β -tricálcio-fosfato e/ou à doxiciclina durante o processo de reparo alveolar em ratos submetidos à terapia com ácido zoledrônico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho teve início após aprovação do Comitê de ética no uso de animais – CEUA, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho.” (ANEXO A)

Animais

Foram utilizados 72 ratos albinus wistar machos com 3 meses de idade e peso aproximado de 350-450g. Os animais foram mantidos em biotério próprio da UNESP com controle da temperatura e luz do ambiente. Os animais foram alimentados com ração e água ad libitum. Para determinação do poder da amostra foi considerado um nível de significância de 5% (com desvio padrão de 2%), e com um poder de teste de 80%, sendo definindo alpha como 0,05, e oito ratos por grupos (n=8) foram necessários com finalidade de comparar os diferentes grupos.

Aplicação do ácido zoledrônico

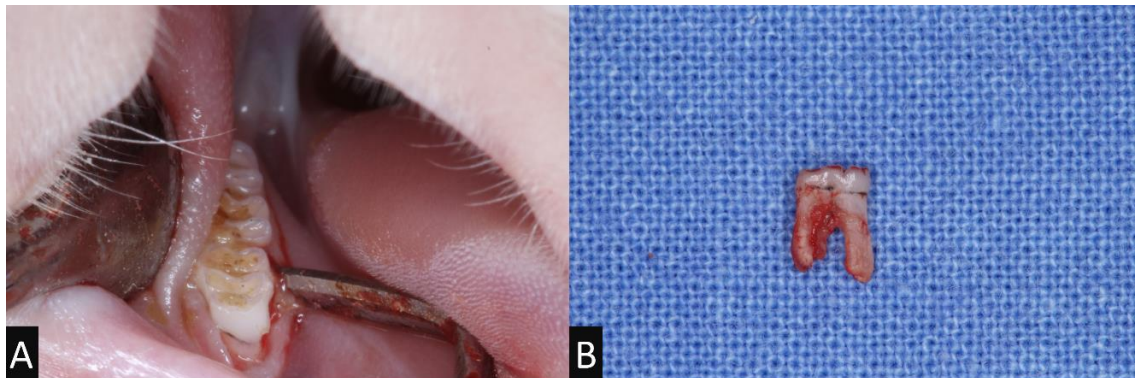
Todos os animais foram tratados com o uso do ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), exceto os animais do grupo GS (Sham). Seguindo o modelo experimental de estudo prévio publicado²⁶, onde foi administrado 04 aplicações de 0,035 mg/kg de ácido zoledrônico (ZOL) dissolvido em 0,1ml de veículo (NaCl 0,9%), por animal, através da veia caudal, com intervalos de 15 dias entre as aplicações. Uma semana após a última aplicação os animais tiveram seus molares inferiores direitos removidos e o tratamento realizado. Após a exodontia, os animais seguiram com o tratamento com a medicação, seguindo o mesmo protocolo descrito acima, até o período de eutanásia.

Extração dentária

Todos os animais tiveram seus primeiros molares superiores direitos extraídos na 8ª semana após o início do protocolo de indução de OMIM. O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia com injeção intraperitoneal (IP) de 90mg/kg de Cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil), e 10mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil)). Após anestesia se realizou a anti-sepsia com PVPI degermante e tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), seguido da aposição de campos estéreis. Como complementação anestésica os animais receberam infiltração local de 0.3 ml/Kg Cloridrato de Mepivacaína (Scandicaine 2% com adrenalina

1:100.000, Septodont, França). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal em mesa de operação personalizada. A sindesmotomia foi realizada cuidadosamente por meio de um descolador delicado (Descolador de Molt 9, Quinelato, São Paulo, Brasil) seguido da luxação e exodontia do dente (Figura 1A e 1B), seguindo o modelo de Statkiewicz et al. 2018.¹³ Após a exodontia foi realizado um descolamento dos tecidos moles da região que corresponde ao alvéolo do elemento extraído, com intuito de auxiliar na manutenção do coágulo e fechamento primário do alvéolo por tecido mole. Em seguida foi realizada a sutura com fio nylon de espessura 4.0 (Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil)). No pós-operatório os animais receberam administração IM de 15 mg/kg de cefalotina (Keflin® Neutro, Antibióticos do Brasil Ltda, Sumaré, Brasil) a cada 12h por 48 horas.

Figura 1. Modelo Cirúrgico, A) Imagem ilustrativa e representativa do procedimento cirúrgico para extração do primeiro molar inferior direito com uso de sindesmótomo adaptado (Hollenback 3s); B) Primeiro molar inferior direito extraído.

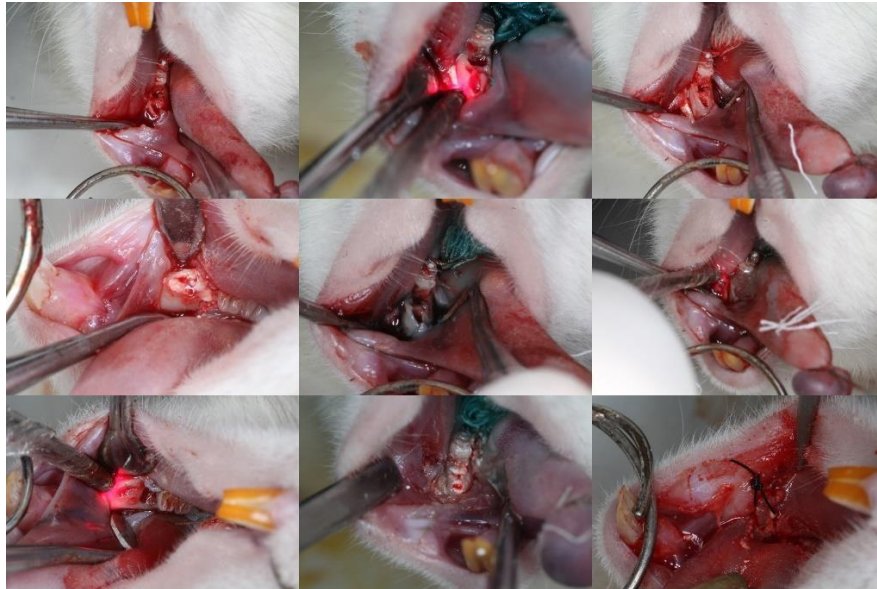


Fonte: autoria própria.

Grupos experimentais

Após a exodontia do primeiro molar inferior direito, os animais foram divididos aleatoriamente em 9 grupos, de acordo com o tratamento que os alvéolos iriam receber (Figura 2).

Figura 2. Aplicação dos tratamentos nos alvéolos dos animais recém extraídos.



Fonte: autoria própria.

Grupo Sham (GS): Foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior direito após o tratamento simulação de tratamento. Nesse grupo foi aplicado o 0,1 ml de soro fisiológico (NaCl 0,9%) no mesmo protocolo de aplicação dos grupos experimentais. Não foi realizado tratamento no alvéolo, ele foi preenchido apenas por coágulo.

Grupo Controle (GC): Foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior direito após o tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), porém nenhum outro tratamento foi realizado e o alvéolo foi preenchido apenas por coágulo sanguíneo;

Grupo Biomaterial (Gβ): Foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior direito após o tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil) e os animais foram tratados com o preenchimento do alvéolo por β- tricálcio fosfato em pasta (Graftys HBS, Latin American Solutions - LAS Brazil);

Grupo Doxíciclina (GD): Foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior direito após o tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), e os animais foram tratados com o preenchimento do alvéolo por gel de doxíciclina a 10%;

Grupo PDT (GP): Foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior direito após o tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), e os animais foram tratados com PDT. O protocolo empregado foi descrito por Ervolino et al. (2019)⁵⁵;

Grupo Doxíciclina + Biomaterial (GDB): Foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior direito após o tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), e os animais foram tratados com o preenchimento do alvéolo por gel de doxíciclina

a 10%, e na sequência pelo biomaterial β -tricálcio fosfato em pasta (Graftys HBS, Latin American Solutions - LAS Brazil);

Grupo PDT + Biomaterial (GP β): Foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior direito após o tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), e os animais foram tratados com PDT.

Grupo PDT + Doxíciclina (GPD): Foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior direito após o tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil) e os animais receberam o protocolo de PDT como descrito anteriormente. Em sequência, os alvéolos, foram preenchidos por gel de doxíciclina a 10%;

Grupo PDT + Doxíciclina + Biomaterial (GPD β): Foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior direito após o tratamento com ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil) e os animais receberam o protocolo de PDT como descrito anteriormente. Em sequência, os alvéolos, foram preenchidos por biomaterial β -tricálcio fosfato em pasta (Graftys HBS, Latin American Solutions - LAS Brazil) e por gel de doxíciclina a 10%;

Aplicação de Fluorocromos

Nesta metodologia de cortes calcificados, foram empregados 8 animais por período, totalizando 72 animais. A aplicação dos fluorocromos foi de acordo com a metodologia empregada em estudos prévios.^{27,28,29} Para análise de epifluorescência, no período de 15 dias após a exodontia dos molares, foi administrado pela via intramuscular 20 mg/kg de calceína. Passados mais 25 dias das exodontias, foi administrado 20 mg/kg de vermelho de alizarina para cada animal.

Eutanásia

Passados 28 dias das exodontias de todos os animais pertencentes a metodologia de cortes calcificados, os animais foram submetidos a eutanásia com dose excessiva de anestésico, tiopental sódico (150 mg/kg) e lidocaína 2% (10 mg/kg). Foi realizada a ressecção em bloco da região alveolar dos molares para análise de epifluorescência, microtomográfica e histométrica.

Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

Após a eutanásia dos animais, as maxilas dos animais dos 9 grupos experimentais foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 24 horas, seguidos de banho em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças foram armazenadas em álcool 70%, para a realização da análise microtomográfica. A análise microtomográfica foi realizada de acordo com metodologia descrita por Bouxsein et al., (2010).³⁰

Por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) as peças foram escaneadas utilizando cortes de 6 μ m de espessura (90Kv e 111 μ A) com filtro de Al. 0,5mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0.5mm, tamanho do pixel de 2016x1344 μ m e com tempo de aquisição de 52min. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas, determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com smoothing de 1, correção dos anéis de artefato de 8, correção de Beam Hardening de 24% e a faixa de conversão de imagem podendo variar de 0,0 – 0,14. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit), as imagens foram reconstruídas para serem observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0) foi avaliado e mensurado³¹ o volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (Tb.Sp e Tb.N), para então realizar a reconstrução em 3D pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

Análise de Microscopia confocal a laser

As maxilas dos animais dos 9 grupos experimentais após a análise microtomográfica passaram pela etapa de desidratação a partir de uma sequência crescente de álcoois 70, 90 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 5 dias, em agitador orbital (KLine CT – 150, Cientec - Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas. Ao término da desidratação, as peças foram imersas em uma mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D- 61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até que foi utilizado apenas a resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit, fotopolimerizadas e submetidas ao protocolo para processamento para corte e desgaste de peças em cortes calcificados empregando-se o micrótopo do tipo Exakt (Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha). As peças foram obtidas no plano mesio-distal com secção de aproximadamente 50 μ m de espessura. Sendo obtidos cortes longitudinais na região do alveolo. Estes cortes foram capturados pelo microscópio a

laser confocal Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando uma objetiva de 10X (original aumentar 100) no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Araraquara, UNESP. Sendo obtidas assim, imagens dos fluorocromos calceína e vermelho de alizarina separadamente (osso velho/osso novo) e por fim, estas imagens foram reconstruídas, fornecendo a sobreposição dos fluorocromos utilizados para avaliação do turnover ósseo pela taxa de aposição mineral (MAR).

As imagens foram transportadas para o programa computacional analisador de imagens Image J (Software de Processamento e Análise de Imagem, Ontario, ON, Canadá). Através da ferramenta “free hands”, a área de precipitação dos fluorocromos (calceína/alizarina) foi mensurada. Na análise da aposição óssea mineral, a partir da ferramenta straight foram traçadas 5 medidas estendendo-se da margem externa da calceína em direção a margem externa da alizarina, sendo o valor obtido, dividido por 28, que representa o intervalo de dias entre as injeções dos dois fluorocromos analisados.³²

Análise Estatística

Esses dados foram submetidos a análise estatística no Programa SigmaPlot 12.0 (Exakt Graph and Data Analysis). Primeiramente, foi realizado o teste de concordância one-way ANOVA, teste de homogeneidade (Shapiro-Wilk) para verificação da distribuição dos dados. O teste one-way ANOVA foi realizado para verificar a diferença entre as médias entre os grupos, seguido de um teste Tukey's post hoc para múltiplas comparações.

Análise Histomorfométrica

Todas as lâminas contendo as mandíbulas em tecido calcificado dos nove grupos experimentais foram coradas com azul de Estevenel e fucsina ácida. As imagens foram analisadas em microscópio óptico (Diastar, Leica Reichert & Jung products, Alemanha) e capturadas por meio de uma câmera fotográfica digital (Leica Microsystems DFC300-FX, Alemanha), com resolução de 1.3 megapixels, acoplada ao microscópio de luz. As análises histométricas foram realizadas por meio do software de análise de imagens IMAGELAB 2000, versão 2.4. As medidas foram obtidas em micrometros e convertidas para porcentagem, para se obter a porcentagem da área de osso neoformado (%NBA), tecido conjuntivo (%CT) e a área de osso necrótico (%NTB) localizada no interior do alvéolo distal na região do primeiro molar.

4 RESULTADOS

Resultados da Análise de Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)

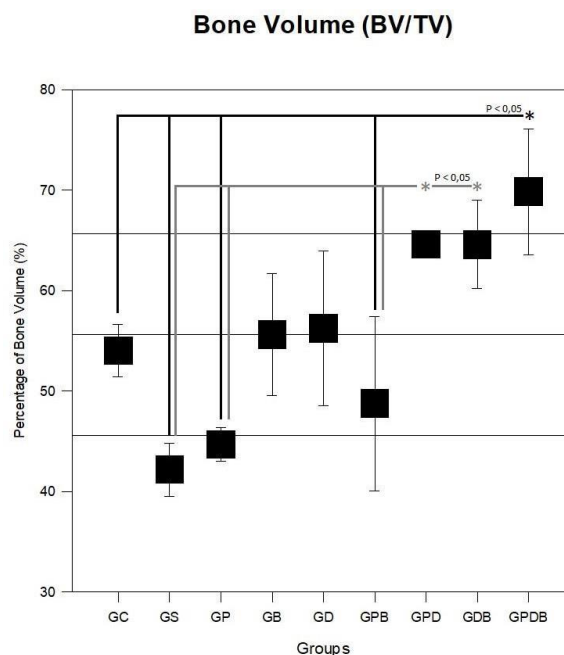
Após escaneamento das peças microtomógrafo Skyscan e análise pelo software CTAnalyser – CTAn os valores de 1) Porcentagem do volume ósseo (BV/TV); 2) Espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th); 3) Separação de trabéculas (TB.Sp); 4) Número de trabéculas (Tb.N); e 5) Porosidade Total (Po.tot) foram obtidos e tabulados.

Porcentagem de volume ósseo (BV/TV):

O grupo controle (GC, tratado com NaCl e apenas coágulo sanguíneo no alvéolo) apresentou uma média de $54,01\% \pm 2,60$ de volume ósseo, enquanto o grupo sham (GS, tratado com ácido zoledrônico e apenas coágulo sanguíneo no alvéolo) $42,17\% \pm 2,65$, contudo sem diferença estatística ($P = 0,193$). Contudo, todos os tratamentos apresentaram maiores médias de BV/TV quando comparados a GS (Figura 5).

O grupo GPDB apresentou a maior média de BV/TV ($69,85\% \pm 6,25$) e com diferença estatística quando comparado ao GC, GS, GP e GPD ($P = 0,034$, $P < 0,001$, $P < 0,001$, $P = 0,003$, respectivamente). Contudo não houve diferença quando comparados aos grupos GB, GD, GPD, GDB ($P > 0,05$). Os grupos, GPD e GDB apresentaram médias semelhantes de BV/TV ($64,62 \pm 0,13$ e $64,69 \pm 4,40$, respectivamente) e com diferença estatística quando comparados aos grupos GS, GP e GPB ($P = 0,002$, $P = 0,005$, $P = 0,034$).

Figura 3. Imagem representativa das médias de porcentagem do volume ósseo em todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada.



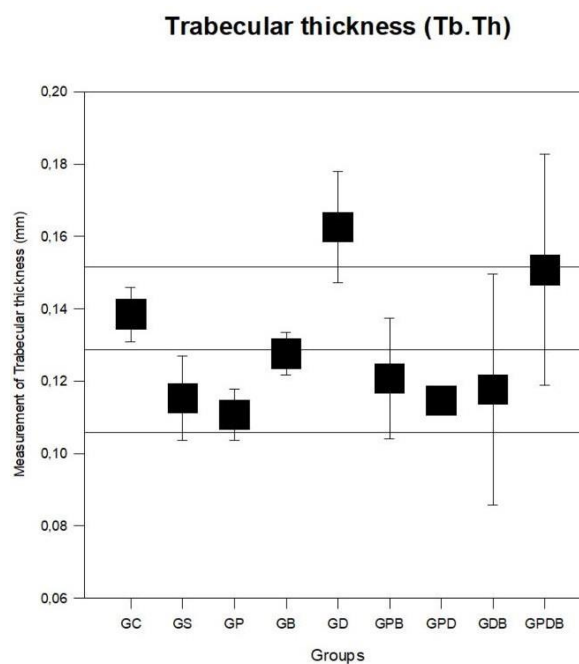
Fonte: autoria própria.

Espessura trabecular (Tb.Th):

O grupo GC, apresentou uma média de $0,138\text{mm} \pm 0,0074$ de espessura trabecular, enquanto GS $0,115\text{mm} \pm 0,016$, contudo sem diferença estatística ($P = 0,792$).

Houve diferença estatística ($P = 0,043$) apenas quando comparado maior média de Tb.Th obtido em GD (tratado com ácido zoledrônico e apenas doxiciclina no alvéolo) no valor de $0,163\text{ mm} \pm 0,015$, com GP no valor de $0,111\text{mm} \pm 0,0070$ (Figura 6).

Figura 4. Imagem representativa da média da espessura das trabéculas ósseas (em mm) de todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada.

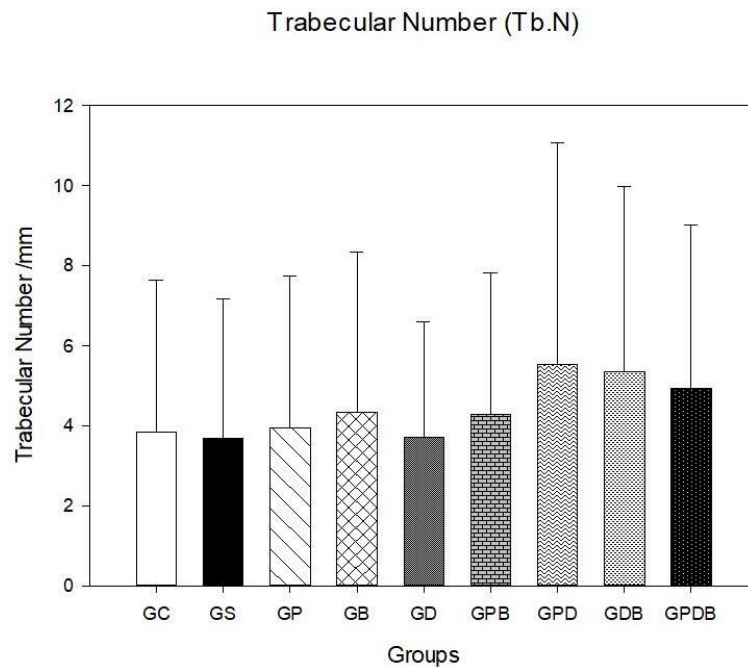


Fonte: autoria própria.

Número de trabéculas (Tb.N):

Houve diferença estatística ($P < 0,05$) apenas quando comparado maior média de Tb.N obtido em GPD (tratado com ácido zoledrônico e apenas terapia fotodinâmica e doxiciclina no alvéolo) no valor de $5,53\text{ mm} \pm 5,53$, com GS no valor de $3,68\text{mm} \pm 3,48$ (Figura 7).

Figura 5. Imagem representativa da média do número de trabéculas / mm de todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada.

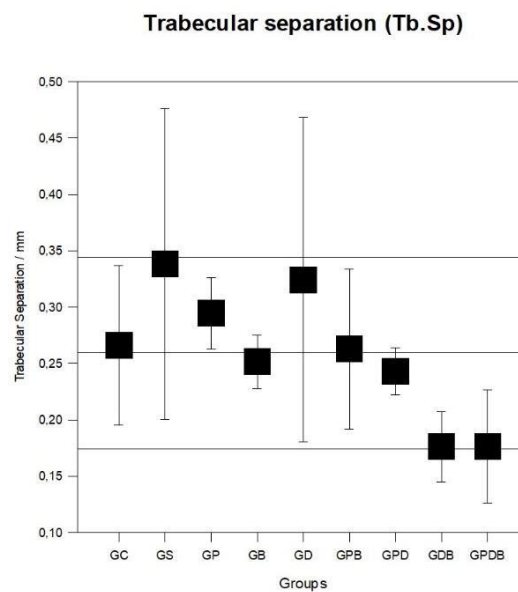


Fonte: autoria própria.

Separação trabecular (Tb.Sp):

De modo invertido ao BV/TV, os grupos (GPDB, GDB, GDP) que apresentaram o maior volume ósseo, nessa análise apresentaram menor Tb.Sp ($0,177 \pm 0,05$, $0,176 \pm 0,03$ e $0,243 \pm 0,02$, respectivamente), contudo todos os grupos se mantiveram dentro da média geral (Figura 8).

Figura 6. Imagem representativa da separação das trabéculas / mm em todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada.



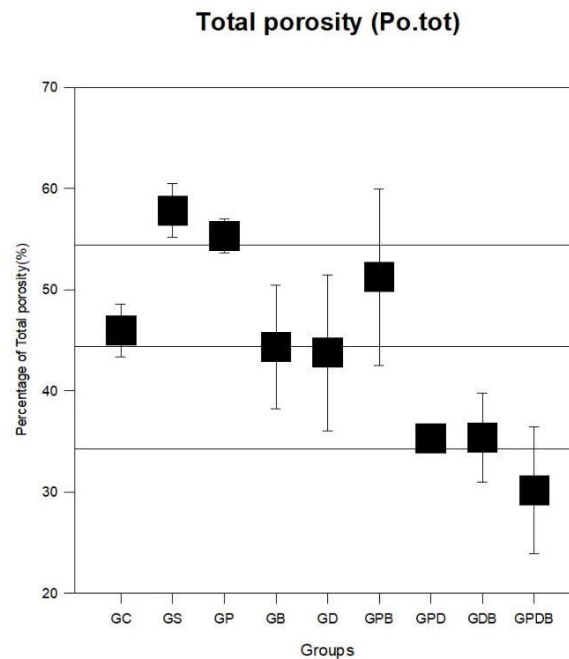
Fonte: autoria própria.

Porcentagem de porosidade total (Po.tot):

O grupo GC apresentou média de 45,98% \pm 2,60 de porosidade total, enquanto GS 57,82% \pm 2,65, contudo sem diferença estatística (P =0.193).

O grupo GS apresentou a maior média de Po.tot (57,82% \pm 2,65) e com diferença estatística quando comparado aos grupos GPDB, GPD, GDB (P <0,001, P =0,001, P =0,002, respectivamente), seguido pelo grupo GP com média de 55,31% \pm 1,67 também estatisticamente diferente quando comparado aos grupos GPDB, GPD, GDB (P <0,001, P =0,005, P =0,005, respectivamente) (Figura 9).

Figura 7. Imagem representativa das médias de porcentagem de porosidade geral de todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada.



Fonte: autoria própria.

Análise qualitativa dos alvéolos:

Nos ratos, o processo final de reparo do alvéolo ocorre no 21º dia pós-operatório, nesse caso os animais dessa pesquisa foram eutanasiados no 28º dia pós-operatório. Os resultados obtidos através da análise micro tomográfica possibilitaram observar que no grupo controle (GC) o processo de reparo alveolar ocorreu normalmente, com formação óssea de apical para coronal e com característica de trabeculado ósseo maduro (Figura 10).

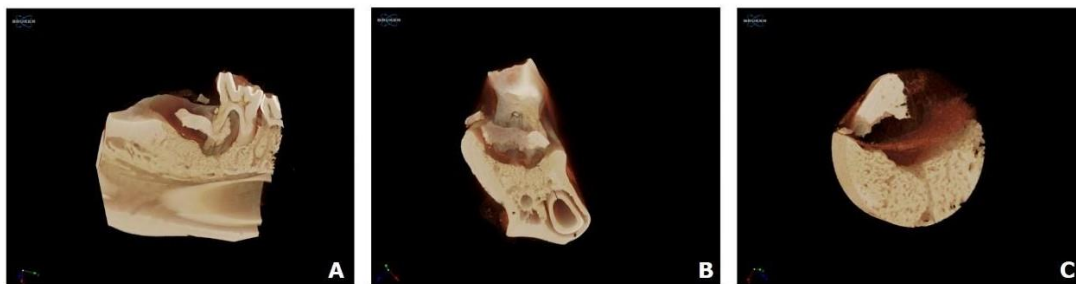
Figura 8. Imagens do grupo GC, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.



Fonte: autoria própria.

De maneira contrária, no Grupo Sham (GS) houve formação de sequestros ósseos após o procedimento de exodontia dos primeiros molares inferiores. Devido a formação dos sequestros não é possível observar a anatomia do alvéolo. Destaca-se o atraso no processo de reparo do alvéolo e osso com a característica mais compacta (Figura 11).

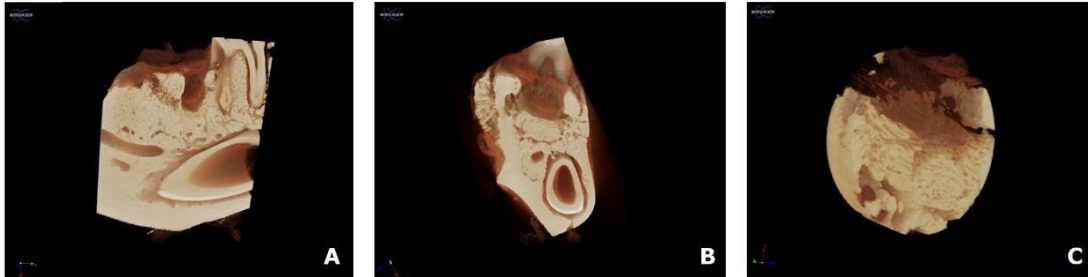
Figura 9. Imagens do grupo GS, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.



Fonte: autoria própria.

De modo comparativo todos os tratamentos aplicados nos alvéolos dos animais tratados com ácido zoledrônico e submetidos a exodontia resultaram em bons resultados. Como terapia isolada para prevenção da osteonecrose a aPDT, (GP) foi capaz de prevenir a osteonecrose dentro do alvéolo, mantendo a sua anatomia e permitindo o reparo, contudo não houve uma boa manutenção de volume ósseo (Figura 10).

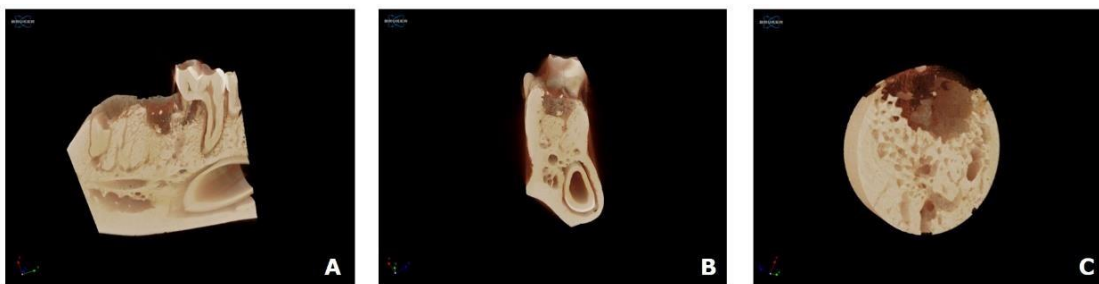
Figura 10. Imagens do grupo GP, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.



Fonte: autoria própria.

Já o grupo tratado isoladamente com biomaterial na forma de pasta a base de beta tricálcio fosfato (GB), a imagem obtida através da reconstrução dos cortes demonstra melhor reparo ósseo no interior do alvéolo, sem presença de sequestros ósseos. Nota-se manutenção do volume alveolar e ainda pode ser observado algumas partículas do biomaterial no interior do alvéolo (Figura 11).

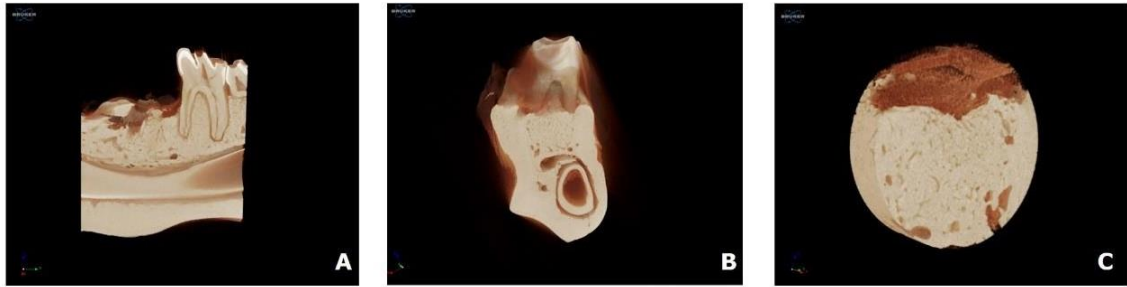
Figura 11. Imagens do grupo GB, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.



Fonte: autoria própria.

De modo semelhante, os alvéolos tratados com a pasta de doxiciclina (GD) também apresentaram bons resultados no reparo ósseo alveolar e com a formação de osso maduro e com manutenção do volume alveolar (Figura 12).

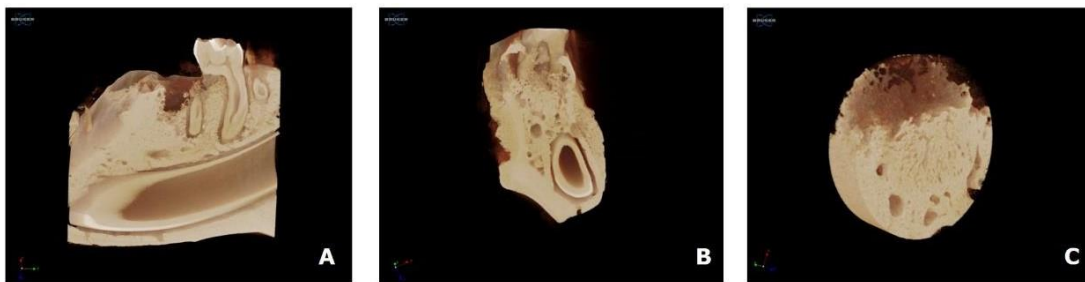
Figura 12. Imagens do grupo GD, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.



Fonte: autoria própria.

Como esperado, as terapias conjuntas geraram resultados positivos para a prevenção da osteonecrose. No grupo GPB, percebe-se que ao associar a pasta de biomaterial com a aPDT houve melhora no reparo alveolar, contudo não como era esperado com base nos resultados individuais desses grupos (Figura 13).

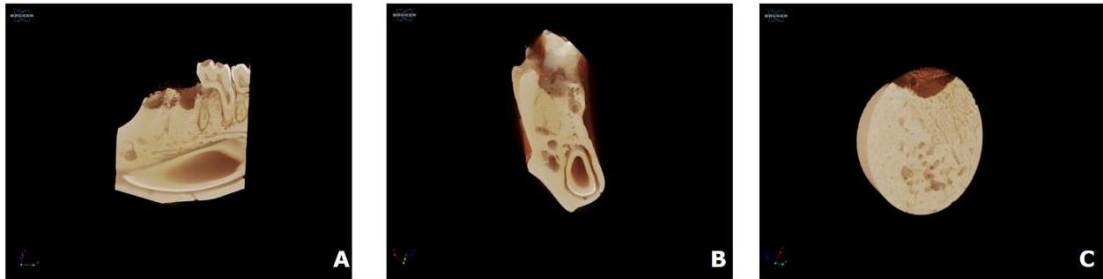
Figura 13. Imagens do grupo GPB, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.



Fonte: autoria própria.

Os melhores resultados entre as associações foram encontrados para os grupos GPD (Figura 14) e GDB (Figura 15), que apresentaram bom reparo alveolar, manutenção do volume ósseo e tecido ósseo com trabeculado semelhante a ósseo maduro.

Figura 14. Imagens do grupo GPD, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo daraiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.



Fonte: autoria própria.

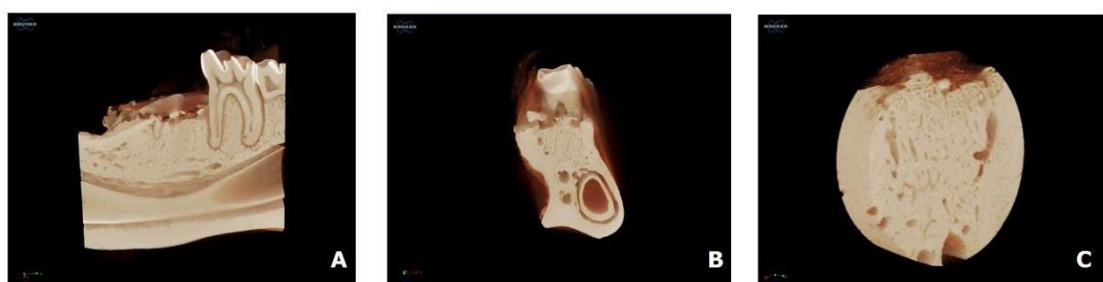
Figura 15. Imagens do grupo GDB, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo daraiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.



Fonte: autoria própria.

De acordo com o esperado a associação dos três métodos de prevenção (GPDB) apresentou o melhor resultado entre todos os grupos. O reparo alveolar ocorreu quase a totalidade do alvéolo, apresentando as paredes lingual e vestibular mantidas e sem presença de sequestro ósseo e tecido ósseo dentro de todo alvéolo (Figura 16).

Figura 16. Imagens do grupo GPDB, obtidos no software NRecon. A) Corte sagital na região de primeiro molar inferior; B) Corte Parassagital na região central do alvéolo daraiz distal do primeiro molar inferior; C) Reconstrução do volume obtido na região do alvéolo distal do primeiro molar inferior.



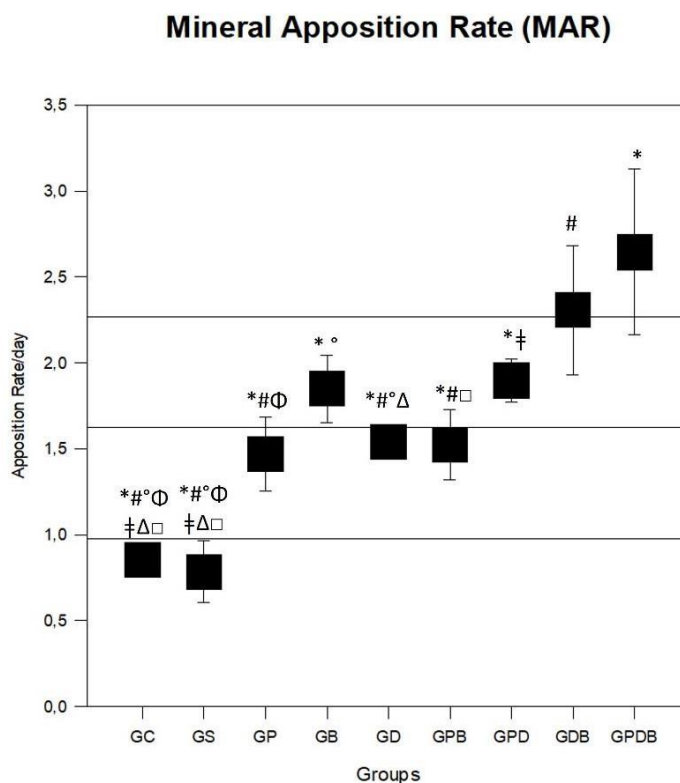
Fonte: autoria própria.

Microscopia confocal a laser

Taxa de Mineralização diária (MAR)

A avaliação da taxa de aposição mineral (MAR), demonstrou que o grupo GPDB apresentou a maior taxa de aposição diária ($2,64 \pm 0,48$) quando comparado a todos os grupos ($p < 0,001$), exceto por GDB ($p = 0,359$), que obteve segundo maior MAR ($2,30 \pm 0,37$). Todos os grupos apresentam maior MAR quando comparado aos grupos GC e GS ($p < 0,05$) (Figura 17).

Figura 17. Gráfico representativo das médias de mineralização óssea/dia de acordo com os grupos avaliados nesse estudo. * significa diferença estatística ($p < 0.001$) quando comparado a GPDB; # diferença estatística ($p < 0.001$) quando comparado a GDB; † diferença estatística ($p < 0.001$) quando comparado a GPD; ° diferença estatística ($p < 0.001$) quando comparado a GB; Δ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GD; □ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GPB; Φ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GP.



Fonte: Autoria Própria.

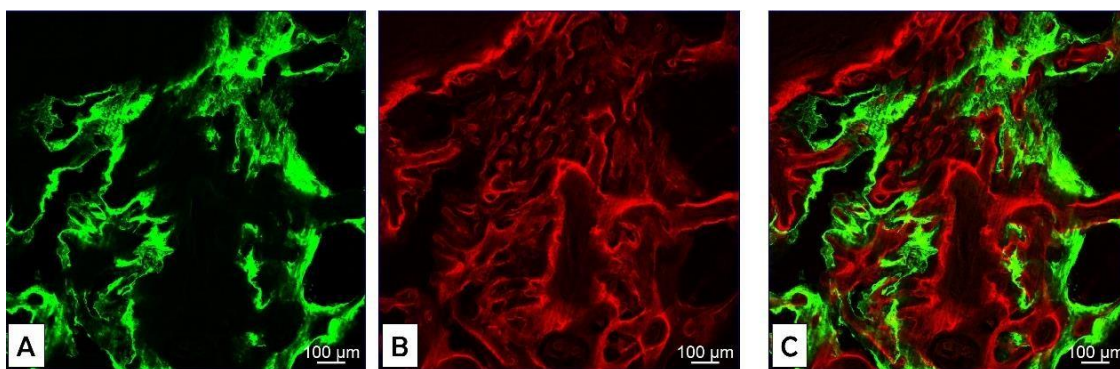
Análise qualitativa:

A precipitação do cálcio na matriz orgânica ao lado da calceína e da alizarina é observada

nas imagens na forma de linhas fluorescentes. Nesse estudo os fluorocromos foram injetados 15 (calceína) e 25 (alizarina) dias após as exodontias.

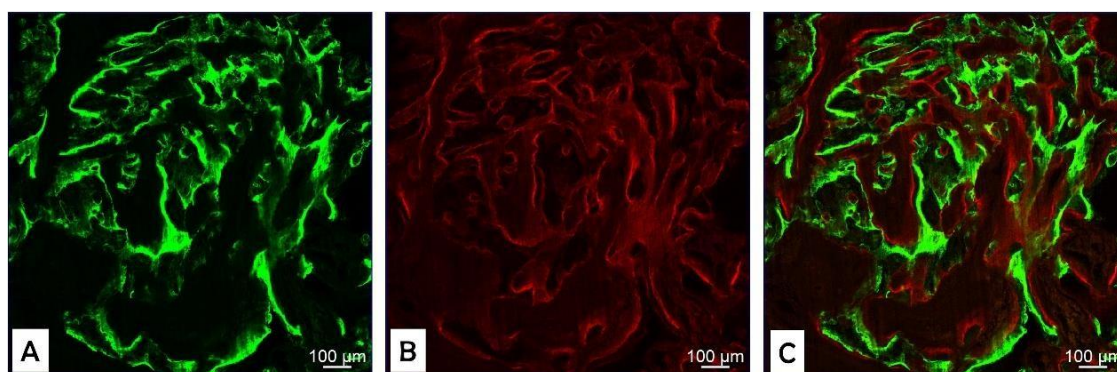
É importante ressaltar que a linha verde (calceína) marca o osso mais velho, enquanto a alizarina (vermelho) marca o novo osso. A observação concomitante das imagens mostrou a quantidade de osso velho versus osso novo (Figuras 20-28).

Figura 18. Imagens do osso alveolar do grupo GC, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.



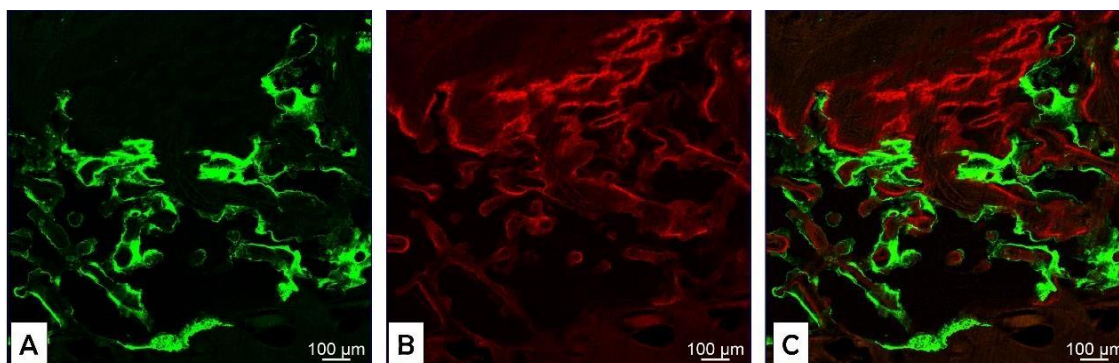
Fonte: Autoria própria.

Figura 19. Imagens do osso alveolar do grupo GS, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.



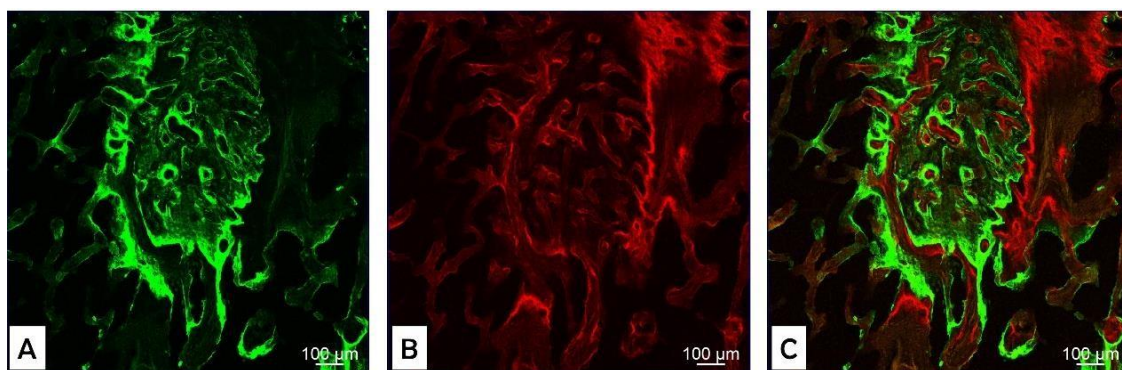
Fonte: Autoria própria.

Figura 20. Imagens do osso alveolar do grupo GP, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.



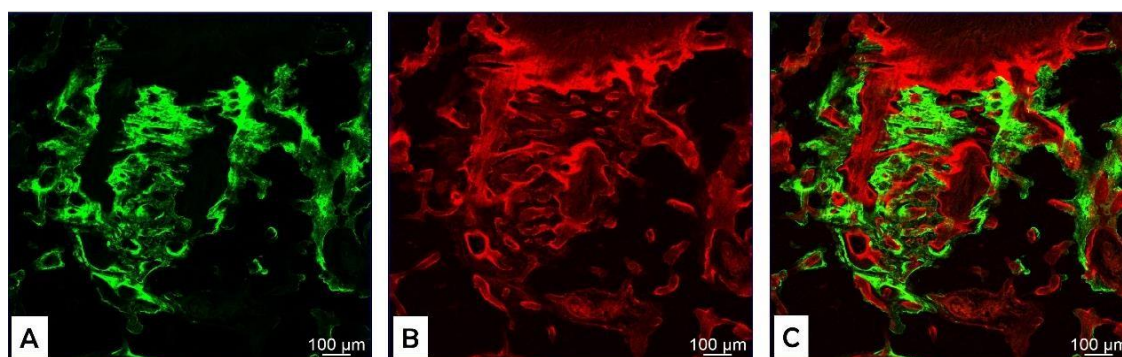
Fonte: Autoria própria.

Figura 21. Imagens do osso alveolar do grupo GB, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.



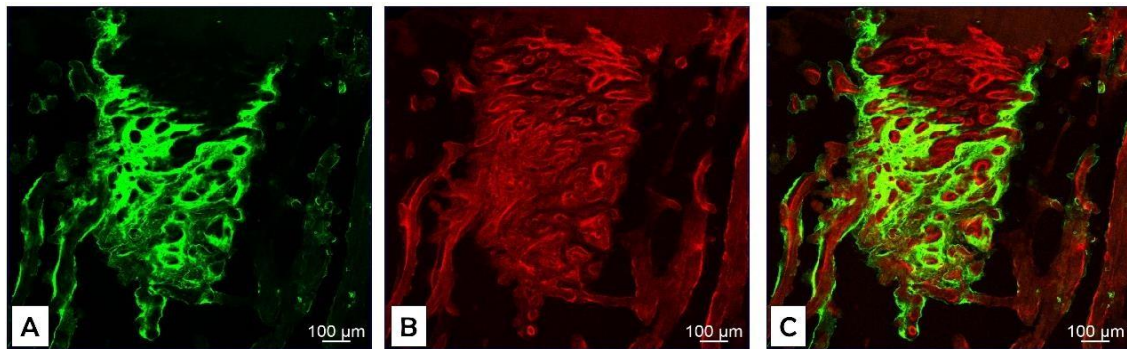
Fonte: Autoria própria.

Figura 22. Imagens do osso alveolar do grupo GD, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.



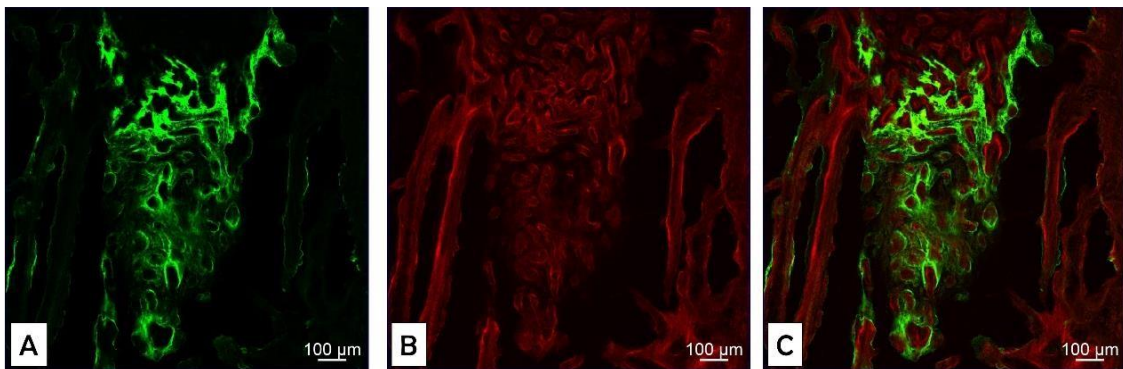
Fonte: Autoria própria.

Figura 23. Imagens do osso alveolar do grupo GPB, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.



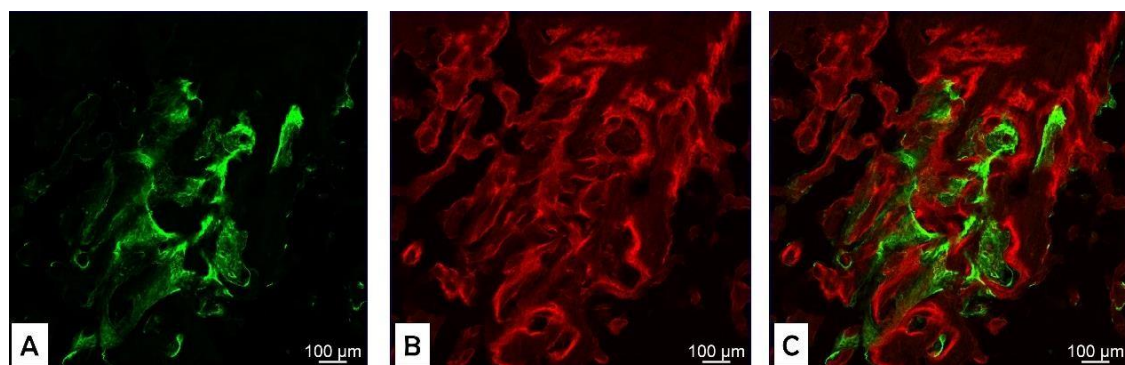
Fonte: Autoria própria.

Figura 24. Imagens do osso alveolar do grupo GPD, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.



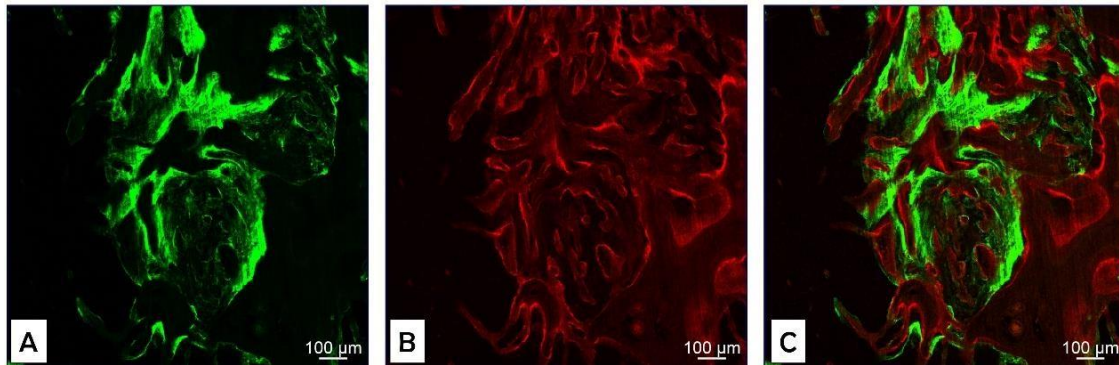
Fonte: Autoria própria.

Figura 25. Imagens do osso alveolar do grupo GDB, obtidas através da análise de microscopia confocal alaser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.



Fonte: Autoria própria.

Figura 26. Imagens do osso alveolar do grupo GPDB, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. A) Área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde); B) Área óssea mineral corada com fluorocromo alizarina (vermelho); e C) Fusão das imagens com os dois fluorocromos.



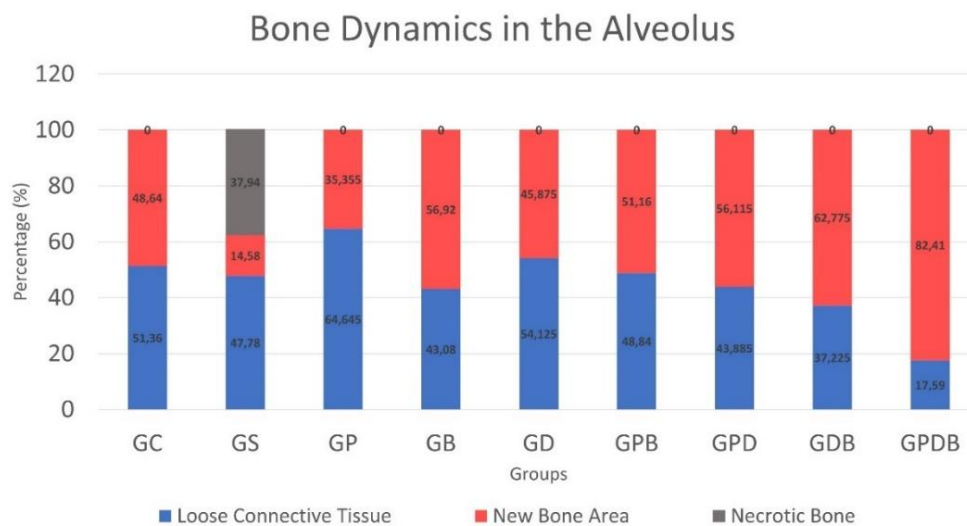
Fonte: Autoria própria.

Resultados da Análise Histomorfométrica

Dinâmica Óssea:

A dinâmica dos tecidos presentes no interior do alvéolo da raiz distal do primeiro molar inferior direito foi quantificada e organizada em 1) área óssea neoformada (%NBA), 2) tecido conjuntivo e 3) osso necrótico (Figura 27).

Figura 27. Gráfico representativa da dinâmica/composição do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo. Os componentes avaliados foram Tecido Conjuntivo, Área óssea Neoformada e Tecido necrótico (osso não vital).



Fonte: Elaboração Própria.

Porcentagem de área óssea neoformada (%NBA):

Os dados obtidos através da histometria foram organizados na forma de gráfico (Figura 30). Pode-se observar que GC (tratado sistemicamente com NaCl e coágulo no alvéolo) apresentou $47,16\% \pm 4,03$ de %NBA, enquanto GS (tratado sistemicamente com ZOL e coágulo no alvéolo), apresentou a menor quantidade de %NBA $11,15\% \pm 7,45$ ($p < 0,007$).

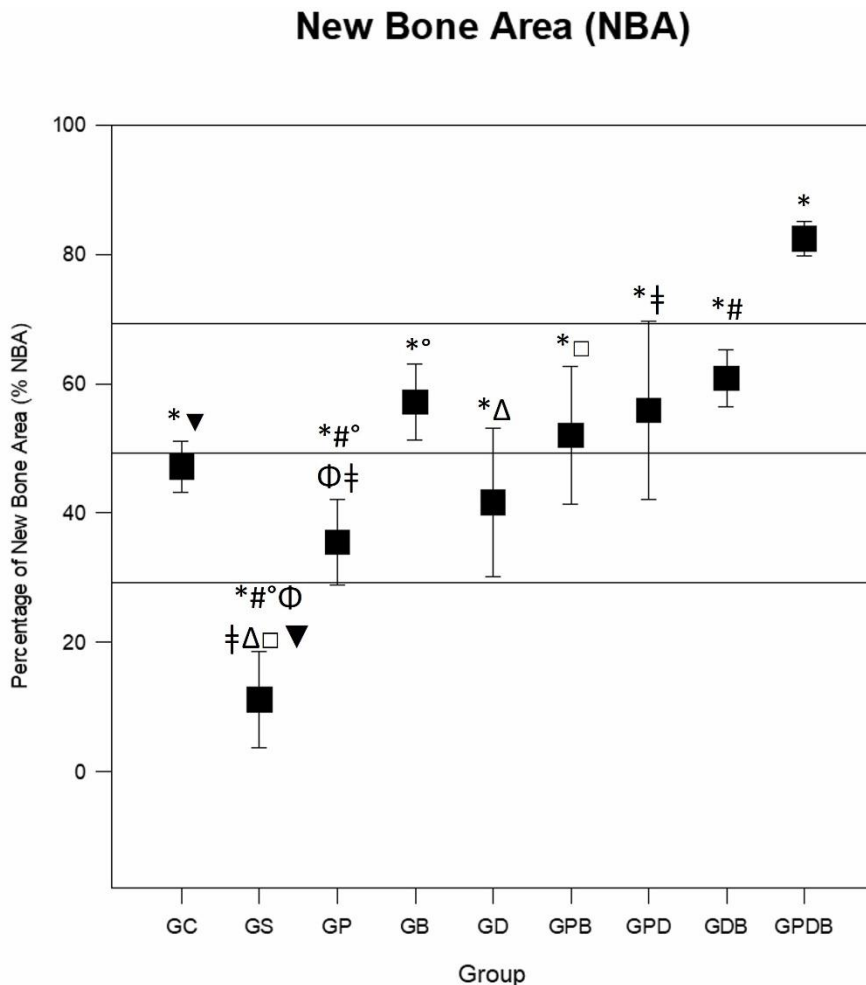
Quando avaliado os tratamentos locais para prevenção da OMIM, o grupo GPDB apresentou a maior média de %NBA ($82,44\% \pm 2,69$), quando comparado a todos os grupos ($p < 0,05$), seguido pelo grupo GDB ($60,82\% \pm 4,37$).

As associações entre fotobiomodulação + biomaterial (GPB) e fotobiomodulação + doxiciclina (GPD) demonstraram bons resultados para osso neoformado ($52,08\% \pm 10,70$ e $55,90\% \pm 13,78$), e foram diferentes de GS ($p < 0,001$). Além disso, GPD foi superior quando comparado com GP ($p = 0,037$).

Dos tratamentos do alvéolo de forma individualizada, GB apresentou o melhor resultado ($57,13\% \pm 5,89$), principalmente quando comparado ao GP ($p = 0,022$) e GS ($p = 0,001$). Os grupos GD e GP apresentaram %NBA, $41,64\% \pm 11,46$ e $35,48\% \pm 6,58$ (respectivamente), e ambos foram superiores a GS ($p < 0,001$ e $p = 0,007$, respectivamente).

Figura 28. Gráfico representativo das médias da porcentagem de área óssea neoformada de acordo com os grupos avaliados nesse estudo. * significa diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GPDB; # diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GDB; † diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GPD; ° diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GB; □ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GPB; Δ diferença

estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GD; Φ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GP; ∇ diferença estatística ($p < 0.05$) quando comparado a GS.



Fonte: Aatoria Própria.

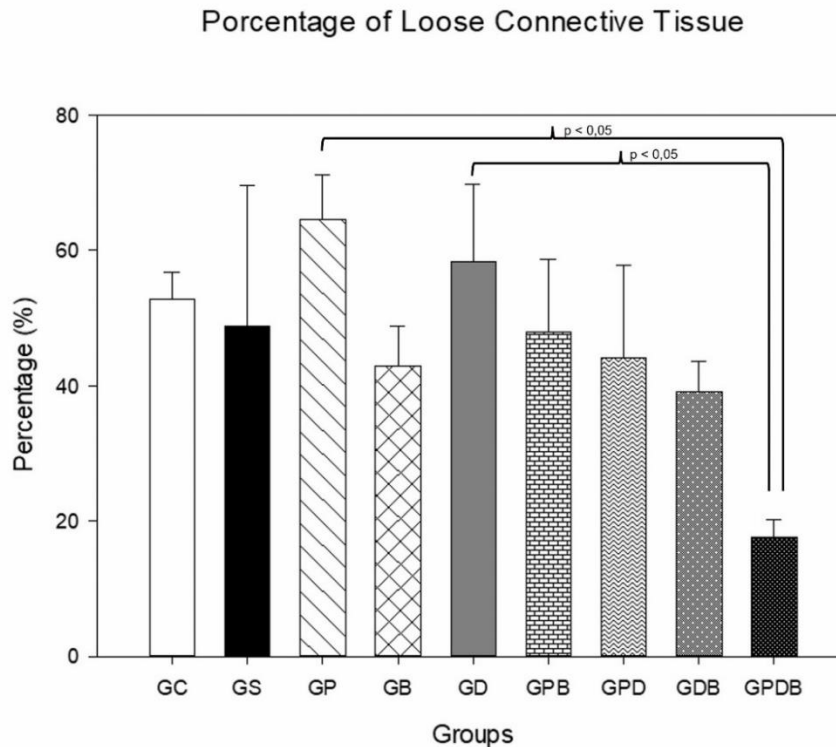
Porcentagem de tecido conjuntivo:

Os dados obtidos através da histometria foram organizados na forma de gráfico (Figura 31). Notou-se que GC (tratado sistemicamente com NaCl e coágulo no alvéolo) apresentou 51,36 % \pm 4,03 de %NBA, enquanto GS (tratado sistemicamente com ZOL e coágulo no alvéolo), apresentou uma menor quantidade, 47,78 % \pm 20,73 ($p = 0,688$).

De modo inverso a %NBA, GPDB apresentou a menor média de porcentagem de tecido conjuntivo (17,59 % \pm 2,69), principalmente quando comparado a GP e GD ($p < 0,05$, ambos).

Para GDB, GPD, GPB a porcentagem de tecido conjuntivo foi de 39,17 % \pm 4,37, 44,10 % \pm 13,78 e 47,92 % \pm 10,70, respectivamente ($p > 0,05$). O grupo GB apresentou a menor média de tecido conjuntivo, entre os tratamentos que foram aplicados de forma isolada, com 42,86 % \pm 5,89, seguido por GD 58,35 % \pm 11,46 e GP 64,52 % \pm 6,58 ($p > 0,05$).

Figura 29. Gráfico representativo das médias da porcentagem da área de tecido conjuntivo de acordo com os grupos avaliados nesse estudo.



Fonte: Autoria Própria.

Análise qualitativa:

Nessa análise observou-se formação óssea que ocorreu através do processo de remodelação, de modo contínuo, envolvendo reabsorção de osso antigo pela ação osteoclástica e subsequente formação de osso novo pela ação osteoblástica (Figura 32 e 33).

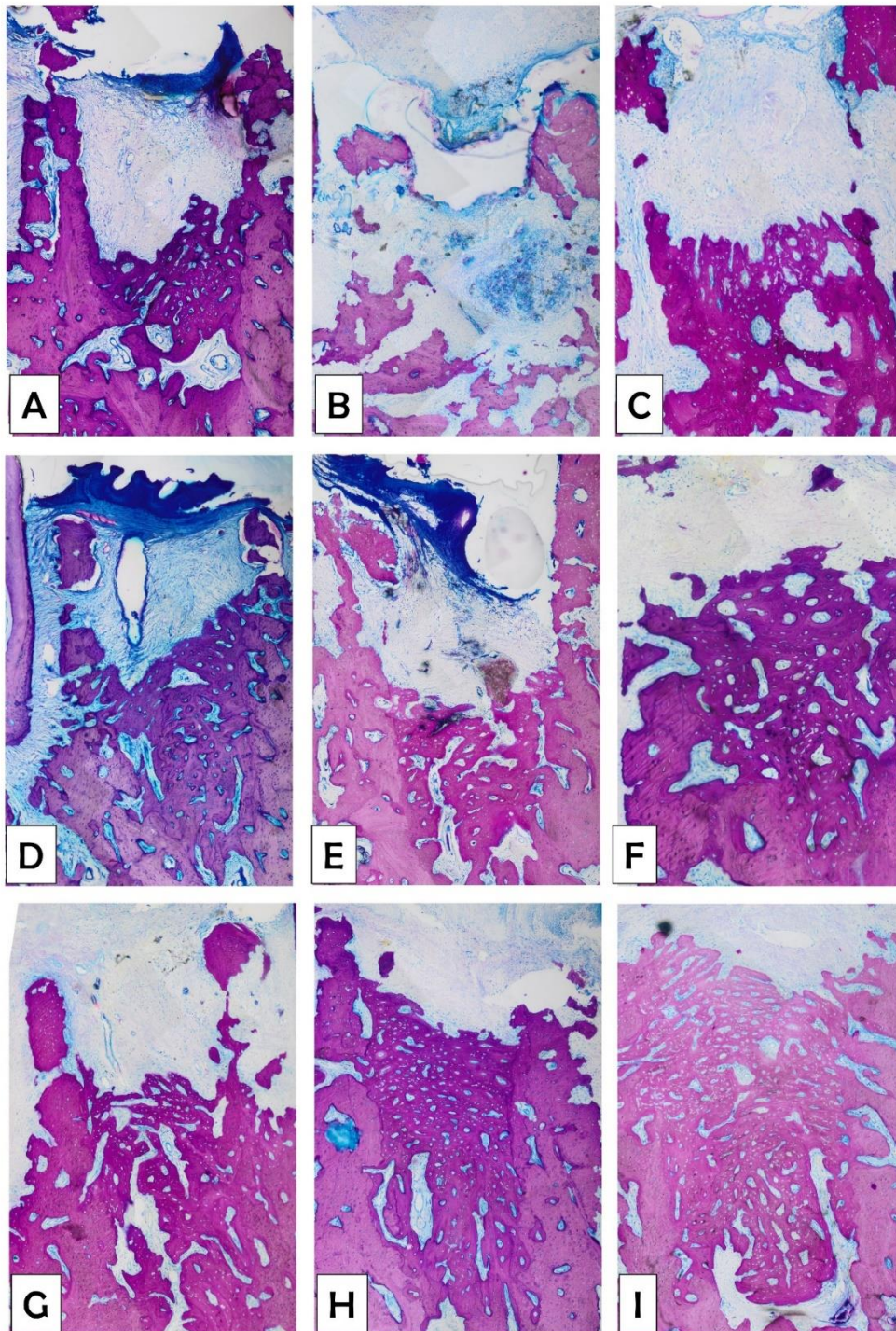
Notou-se que em GC (tratado sistematicamente com NaCl e apenas coágulo no alvéolo), presença da cortical alveolar com reparo ósseo no terço apical e médio do alvéolo (Figura 32A), com característica de tecido ósseo maduro, presença de lamelas concêntricas e lacunas com osteócitos no seu interior (Figura 33A).

No grupo GS (tratado sistematicamente com ZOL e apenas coágulo no alvéolo), notou-se irregularidades na superfície das trabéculas ósseas, ausência da continuidade da lâmina cortical e fragmentos ósseos soltos pelas lâminas, caracterizando sequestros ósseos (osso necrótico) (Figura 32B). Em maior aumento, presença de osteoplastos (célula sem núcleo corado) e canal de Havers vazios. (Figura 33B).

De modo bem semelhante os tratamentos na forma isolada (GP, GB, e GD) permitiram neoformação óssea nos terços média e apical, com osso vital entremeado por tecido conjuntivo (Figura 32C, 32D e 32E, respectivamente), com maior quantidade de área óssea para o grupo GB. Destaca-se que GB e GD um osso mais trabeculado (Figura 33D e 33E), enquanto GP (Figura 33C) parece demonstrar um osso mais denso.

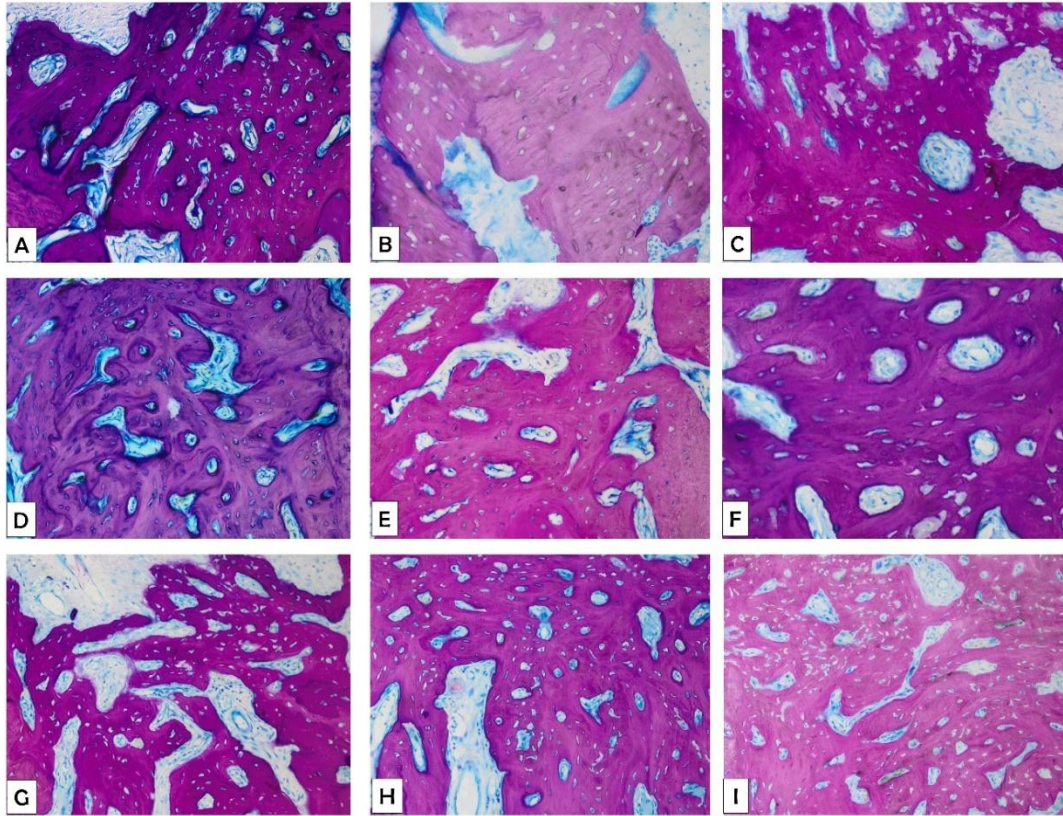
As associações das terapias (GPB, GPD, GDB e GPDB) demonstraram ser eficazes no processo do reparo ósseo. Notou-se neoformação óssea nos terços apicais e médio dos alvéolos, e para GDB e GPDB no terço cervical. Os grupos GPB (Figura 32F) e GPD (Figura 32G) demonstraram um tecido ósseo com característica mais trabecular com várias ilhas de tecido conjuntivo ao redor (Figura 33F e 33G, respectivamente), enquanto GDB (Figura 32H) e GPDB (Figura 32I) um tecido ósseo mais organizado e com menor quantidade de tecido conjuntivo (Figura 33H e 33I, respectivamente).

Figura 30. Fotomicrografia representativa do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo, corado em azul de Stevenel e Alizarina no aumento de 1.6x (azul – tecido conjuntivo; rosa – tecido mineralizado). Desse modo a imagem A) representa o grupo GC; B) GS; C)GP; D)GB; E)GD; F)GPB; G)GPD; H)GDB; e I) GPDB.



Fonte: Autoria Própria.

Figura 31. Fotomicrografia representativa do alvéolo distal do primeiro molar inferior direito de acordo com cada grupo, corado em azul de Stevenel e Alizarina no aumento de 40x (azul – tecido conjuntivo; rosa – tecido mineralizado). Desse modo a imagem A) representa o grupo GC; B) GS; C) GP; D) GB; E) GD; F) GPB; G) GPD; H) GDB; e I) GPDB.



Fonte: Autorial Própria.

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo, a hipótese de que o efeito de terapias locais auxiliaria na prevenção da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMIM) e favoreceriam o processo de reparo ósseo foi comprovada. As terapias aqui utilizadas, de modo isolado ou associadas permitiram a formação de um tecido ósseo vital e organizado (Figuras 32 e 33). Destaca-se que os grupos GPDB, GDB e GPD apresentaram os melhores resultados, como demonstrado pela BV/TV da microtomografia (Figura 5), na MAR (Figura 19), na dinâmica do tecido ósseo (Figura 29) e %NBA (Figura 30), diferente dos resultados encontrados em GS (tratado sistemicamente com ZOL e apenas coágulo no alvéolo) que apresentou $37,94 \pm 18,70\%$ de osso sem vitalidade (Figura 29), imerso em um estroma de tecido conjuntivo frouxo (Figura 32B e 33B).

A análise de precipitação (MAR) representa a quantidade de osso que se formou após a precipitação do cálcio na matriz óssea de colágeno, uma vez que os fluorocromos têm a propriedade de se ligar ao cálcio, quando ele vai precipitar na matriz e por causa dessa relação direta, a quantidade de fluorescência representa a quantidade de osso formado.^{28,29,33,34} Destaca-se que o biomaterial (GB) apresentou a taxa mais alta entre as terapias aplicadas de modo isolado (Figura 19), e que a associação entre todos os métodos apresentou a maior taxa MAR ($p < 0,05$).

Acredita-se que a supressão excessiva dos osteoclastos prejudique o turnover ósseo, ou seja, os traumas causados no tecido ósseo impedem que haja reparação tecidual e resultam em necrose óssea.³ Além disso, alguns bifosfonatos como o ácido zoledrônico, apresentam efeitos antiangiogênicos que diminuem a expressão de fatores de crescimento endoteliais na circulação, levando a áreas de isquemia.^{35,36} Como demonstrado neste presente estudo, o resultado desse mecanismo de ação resulta na formação de fragmentos ósseos sem vitalidade (Figura 33B), caracterizando os sequestros ósseos (Figura 10). O uso do ZOL permite que esse tecido apresente uma taxa de aposição mineral diária intensa, como demonstrou os dados de MAR

(Figura 19), uma vez que o mecanismo ósseo é alterado, favorecendo a deposição do tecido mineral.^{7,8}

A presença e a viabilidade dos fibroblastos e células endoteliais são essenciais para o processo de reparo alveolar.³⁷⁻³⁹ O ácido zoledrônico é capaz de inibir osteoclastos, alterar a migração celular, suprimir angiogênese e osteogênese, além de apresentar toxicidade para células epiteliais e fibroblastos.⁴⁰⁻⁴⁶ A inibição dessas células impede a formação de um tecido vascularizado e permite a formação de um tecido ósseo denso, excessivamente corticalizado (Figura 32B), deste modo aumentando a probabilidade da formação de sequestros ósseos com processo inflamatório na região, bem como o aumento da possibilidade de uma infecção local,^{47,48} como demonstrado no presente estudo em GS (Figura 33B).

Desde então, pesquisas em modelo animal vêm sendo realizadas para demonstrar as repercussões do uso dos bifosfonatos no tecido ósseo, que resultam no aumento da densidade óssea e diminuem os espaços entre as trabéculas, causando diminuição dos canais nutritivos do tecido ósseo.^{26,49-50} No presente estudo, avaliou-se a área do interior do alvéolo da raiz distal do primeiro molar e não foram encontrados resultados sugestivos de aumento de densidade óssea (Tb.th, $p = 0,792$; Tb.N, $p = 1,901$; Tb.sp, $p = 0,199$; e Po.tot, $p = 0,109$). Contudo, destaca-se que a análise de MicroCT, através da ferramenta NRcon demonstrou em GS áreas de irregularidades ósseas, sequestros e ausência de osso dentro do alvéolo, como demonstrado em estudos previamente publicados em animais tratados com ácido zoledrônico.^{51,52-56}

Recentemente, um estudo *in vitro* demonstrou que o uso de cerâmicas sintéticas a base de fosfato de cálcio quando associados ao zoledronato proporcionou uma redução ou ausência de toxicidade para fibroblastos,²² o que favoreceu o processo de reparo alveolar em GB, GDB e GPB, como demonstrado pela %NBA (Figura 30) e BV/TV (Figura 5), destacando-se quando comparado com as terapias locais aplicadas de modo isolado dinâmica óssea (Figura 29). Biomateriais bifásicos (HA / β -TCP - 60% / 40%) apresentam alta biocompatibilidade e bioatividade, além da capacidade de osteoindução^{23,24,57} e são indicados para preenchimento de cavidades.⁵⁸ Estudos vem demonstrando efeitos benéficos para o crescimento das células e podem ser considerados bons candidatos para aplicações de engenharia de tecido ósseo^{25,59}, além de demonstraram a capacidade de formação óssea ectópica mesmo em grandes modelos animais, com um padrão de formação óssea tão rápido quanto o osso autógeno.⁶⁰

Estudo prévio publicado²⁷ demonstrou que a aplicação de múltiplas sessões de aPDT em alvéolos recém extraídos de ratas senis tratadas com ácido zoledrônico foi capaz de prevenir a OMIM,

como também demonstrado nesse presente estudo (Figura 11). A biomodulação com laser de baixa potência apresenta efeitos bio-estimulantes em osteoblastos, mesmo durante o tratamento com zoledronato⁶¹ e que quando associado a um agente fotossensibilizador (azul de metileno) reduz a quantidade de cargas bacterianas,⁶² o que foi observado neste estudo em GP (Figura 33C), que permitiu osso neoformado vital nos terços média e apical do alvéolo.

O controle da infecção é fundamental no tratamento das lesões relacionadas à OMIM, e as terapias podem envolver desde antibióticos tópicos quanto aplicação de antibioticoterapia sistêmica.¹⁶ Vários antimicrobianos podem ser utilizados em conjunto com as terapias coadjuvantes, e entre eles destaca-se a doxiciclina que é um isômero estrutural da tetraciclina, e apresenta ação antibacteriana, anti-inflamatória, anticolagenase. Estudos prévios publicados¹⁷⁻¹⁹ têm demonstrado que seu ponto de atuação é a inibição da osteoclastogênese, o que favorece o processo de reparação óssea. A aplicação de uma esponja de colágeno com doxiciclina sobre o alvéolo após tratamento com ácido zoledrônico em ratos apresentou efeitos positivos na redução de tecido ósseo necrótico⁶³, como demonstrado nesse estudo onde a presença do gel de doxiciclina a 10% (GD) foi capaz de prevenir a OMIM (Figura 14) e contribuiu na manutenção do volume ósseo (Figuras 31E e 33E).

As associações entre os tratamentos locais no interior do alvéolo também demonstraram bons resultados, uma vez que o objetivo principal desse estudo foi prevenção da osteonecrose, e pareceram apresentar efeitos sinérgicos (Figura 29). Mesmo que o uso isolado da aPDT (GP) não tenha demonstrado grandes quantidades de ganho ósseo em %NBA, os autores acreditam que o seu potencial antimicrobiano e bioestimulador é essencial para contribuir na prevenção da osteonecrose e quando associado a doxiciclina (GPD) e biomaterial (GPB), uma quantidade maior de volume ósseo foi observado em %NBA. A associação da doxiciclina com o biomaterial (GDB) já vem sendo discutida na literatura, uma vez que gel de doxiciclina 10% isolado apresentou bons resultados no processo de reparação de defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos,²⁰ porém foi observado resultados melhores quando esse gel foi associado ao osso autógeno particulado.⁶⁴ Acredita-se que o efeito anti-osteoclastogênico da doxiciclina permita que o biomaterial inserido no interior do alvéolo continue exercendo sua função de osteocondução. Desse modo, a associação entre os três métodos locais (GPDB) permitiu a prevenção da OMIM (Figura 18), favoreceu o processo de reparo (Figura 32I e 33I) com maior %NBA, BV/TV e MAR, sendo o grupo de tratamento local que permitiu melhor processo de reparo alveolar e concomitante prevenção da OMIM.

Diante da metodologia e resultados encontrados no presente estudo, os autores acreditam que a

dose de ZOL utilizada nessa pesquisa (0,035mg/kg de ácido zoledrônico) possa ser um fator limitante, uma vez que a dose utilizada é uma dose com menor concentração, que se assemelha a dose utilizada em casos de prevenção de osteoporose^{26,64} e não doses com altas concentrações como utilizadas em alguns estudo que simulam a utilização por pacientes em tratamento oncológicos.^{13,27} Neste sentido, estudos futuros para avaliar as diferentes doses de ácido zoledrônico, assim como metodologias para avaliação em tecidos desmineralizados como análise imunoistoquímica, RT-PCR entre outras tornam-se necessários.

6 CONCLUSÃO

O protocolo de ZOL aplicado nessa pesquisa foi capaz de induzir a necrose óssea e que quando as terapias foram aplicadas a prevenção aconteceu.

7 REFERÊNCIAS

- 1) Wang, Q., Liu, J., Qi, S., Liao, X., Liu, D., & Pan, J. (2018). Clinical analysis of medication related osteonecrosis of the jaws: A growing severe complication in China. *Journal of Dental Sciences*, 13(3), 190-197.
- 2) Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 61 (2003) 1115– 1117.
- 3) Ruggiero SI, 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* 72:1938, 2014
- 4) Santos, M., Silveira, K., Souza, N., Costa, D., & Inaoka, S. (2019). Extensive osteonecrosis of the maxilla caused by bisphosphonates: Report of a rare case. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 11(2), e203.
- 5) Hagiwara M, Delea TE, Cong Z, Chung K: Utilization of intravenous bisphosphonates in patients with bone metastases secondary to breast, lung, or prostate cancer. *Support Care Cancer* 22:103, 2014.
- 6) Zhang J, Wang R, Zhao YL, et al: Efficacy of intravenous zoledronic acid in the prevention and treatment of osteoporosis: A meta-analysis. *Asian Pac J Trop Med* 5:743, 2012.
- 7) Russell RG: Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone*4:2, 2011.
- 8) Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ: Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 19:733, 2008
- 9) Petrovic, M., Jelovac, D. B., Antic, S., Antunovic, M., Lukic, N., Sabani, M., ... & Kuzmanovic, C. (2019). Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws: Two Center Retrospective Cohort Studies. *BioMed research international*, 2019.

- 10) Fung P, Bedogni A, et al: Time to onset of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a multicentre retrospective cohort study. *Oral Dis* 23:477, 2017
- 11) Mamias A, Kastritis E, Mamia , et al: Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: Incidence and risk factors. *L Clin Oncol* 23:8580, 2005
- 12) Jain, V., Seith, A., Manchanda, S., Pillai, R., Sharma, D. N., & Mathur, V. P. (2019). Effect of intravenous administration of zoledronic acid on jaw bone density in cases having skeletal metastasis: A prospective clinical study. *The Journal of Indian Prosthodontic Society*, 19(3), 203.
- 13) Statkiewicz, C., Toro, L. F., de Mello-Neto, J. M., de Sá, D. P., Casatti, C. A., Issa, J. P. M., ... & Theodoro, L. H. (2018). Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 184, 7- 17.
- 14) Rupel K, Ottaviani G, Gobbo M, Contardo L, Tirelli G, Vescovi P, et al: A systematic review of therapeutical approaches in bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Oncol* 50: 1049e1057, 2014.
- 15) King, O. J., Halai, T., & Eyeson, J. (2019). Case report of atypical osteonecrosis of the jaws: a clinical dilemma. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 57(4), 371-373.
- 16) Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, Watts NB. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2015; 30(1), 3-23.
- 17) Yagan A, Kesim S, Liman N. Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2014;85: 478-489.
- 18) Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Takahashi N. Minocycline to be used a potential anti bone resorption agent due to the suppression of osteoclastic bone resorption. *J Oral Biosci* 2013;55:16-22.
- 19) Kinugawa S, Koide M, Kobayashi Y, et al. Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. *J Immunol* 2012;188:1772-1781.

- 20) Silva AC, Oliveira MR, Amaral LF, Ferreira S, Garcia Jr IR, Mariano RC. Effect of Doxycycline in Gel Form on Bone Regeneration: Histomorphometric and Tomographic Study in Rat Calvaria. *Journal of periodontology*, 2016; 87(1), 74-82.
- 21) Lucateli RL, Marciano MA, Ferreira S, Júnior IRG, Camilleri J, Mariano RC. Doxycycline and Autogenous Bone in Repair of Critical-Size Defects. *Implant dentistry*, 2018; 27(4), 461-466.
- 22) Paulo, S., Laranjo, M., Abrantes, A. M., Casalta-Lopes, J., Santos, K., Gonçalves, A. C., Serra, A. (2019). Synthetic Calcium Phosphate Ceramics as a Potential Treatment for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Materials*, 12(11), 1840.
- 23) Boyne PJ. Current developments with growth factors and bone proteins. *Dent Implantol Update*. 1999 Apr; 10(4): 25-7.
- 24) Daculsi G, Jegoux F, Layrolle P. The micro macroporous biphasic calciumphosphate concept for bone reconstruction and tissue engineering. In: Basu B, Katti DS, Kumar A, editors. *Advance biomaterials: fundamentals processing and applications*. New York: Wiley-American Ceramic Society; 2009. p.101–42.
- 25) Bodde EW, Wolke JG, Kowalski RS, Jansen JA. Bone regeneration of porous beta-tricalcium phosphate (conduict TCP) and biphasic calcium phosphate ceramic (Biosel) in trabecular defects in sheep. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Sep; 82(3):711-22.
- 26) Curra, C., Cardoso, C. L., Ferreira Júnior, O., Curi, M. M., Matsumoto, M. A., Cavenago, B. C., ... & Ferreira, J. (2016). Medication-related osteonecrosis of the jaw. Introduction of a new modified experimental model. *Acta cirurgica brasileira*, 31(5), 308-313.
- 27) E. Ervolino, C. Statkiewicz, L.F. Toro, J.M. Mello-Neto, T.P. Cavazana, J.P.M. Issa, R.C.M. Dornelles, J.M. Almeida, M.J.H. Nagata, R. Okamoto, C.A. Casatti, V.G. Garcia, L.H. Theodoro, Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate, *Bone* 120 (2019) 101-113. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.10.014>.
- 28) Luvizuto ER, Dias SS, Okamoto T, Dornelles RC, Okamoto R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Archives of oral biology*, 2011; 56(10), 984-990.

- 29) Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *Journal of biomedical optics*, 2015; 20(3), 038003.
- 30) Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia Jr IR, Okamoto R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 2015; 44(6), 798-805.
- 31) Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of bone and mineral research*, 2010; 25(7), 1468-1486.
- 32) Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of bone and mineral research*, 2013; 28(1), 2-17.
- 33) Wang, N., Docherty, F. E., Brown, H. K., Reeves, K. J., Fowles, A. C., Ottewell, P. D., ... & Eaton, C. L. (2014). Prostate cancer cells preferentially home to osteoblast-rich areas in the early stages of bone metastasis: evidence from in vivo models. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(12), 2688-2696.
- 34) Hassler, N., Roschger, A., Gamsjaeger, S., Kramer, I., Lueger, S., Van Lierop, A.,... & Papapoulos, S. (2014). Sclerostin deficiency is linked to altered bone composition. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(10), 2144-2151.
- 35) Soares MQS, Van Dessel J, Jacobs R, da Silva Santos PS, Cestari TM, Garlet GP, Rubira-Bullen IRF. Zoledronic Acid Induces Site-Specific Structural Changes and Decreases Vascular Area in the Alveolar Bone. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2018.
- 36) Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, Green JR. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002;302(3):1055-61.
- 37) Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Araçatuba* 1973; 2:153-69.

- 38) Okamoto T, Okamoto R, Alves Rezende MC, Gabrielli MF. Interference of the blood clot on granulation tissue formation after tooth extraction: histomorphological study in rats. *Braz Dent J* 1994; 5(2): 85-92.
- 39) Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. 2006. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 117(7 Suppl):1e-S-32e-S.
- 40) Walter, C., Pabst, A., Ziebart, T., Klein, M. O., & Al-Nawas, B. (2011). Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral diseases*, 17(2), 194-199.
- 41) Gao, S. Y., Zheng, G. S., Wang, L., Liang, Y. J., Zhang, S. E., Lao, X. M., Liao, G. Q. (2017). Zoledronate suppressed angiogenesis and osteogenesis by inhibiting osteoclasts formation and secretion of PDGF-BB. *PloS one*, 12(6), e0179248.
- 42) Lang, M., Zhou, Z., Shi, L., Niu, J., Xu, S., Lin, W., Wang, Y. (2016). Influence of zoledronic acid on proliferation, migration, and apoptosis of vascular endothelial cells. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 54(8), 889-893.
- 43) Abdik, H., Abdik, E. A., Demirci, S., Doğan, A., Turan, D., & Şahin, F. (2019). The effects of bisphosphonates on osteonecrosis of jaw bone: a stem cell perspective. *Molecular biology reports*, 46(1), 763-776.
- 44) Scheper, M. A., Badros, A., Chaisuparat, R., Cullen, K. J., & Meiller, T. F. (2009). Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *British journal of haematology*, 144(5), 667-676.
- 45) Pabst, A. M., Ziebart, T., Koch, F. P., Taylor, K. Y., Al-Nawas, B., & Walter, C. (2012). The influence of bisphosphonates on viability, migration, and apoptosis of human oral keratinocytes—in vitro study. *Clinical oral investigations*, 16(1), 87-93.
- 46) Basso, F. G., Pansani, T. N., Oliveira, C. F. D., Turrioni, A. P. S., Soares, D. G., Hebling, J., Costa, C. A. D. S. (2013). Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. *Brazilian dental journal*, 24(6), 551-558.
- 47) Reid, I. R., Bolland, M. J., & Grey, A. B. (2007). Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone*. 318-320.

- 48) Yuan, A., Munz, A., Reinert, S., & Hoefert, S. (2019). Gingival fibroblasts and medication-related osteonecrosis of the jaw: results by real-time and wound healing in vitro assays. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*.
- 49) Poubel VLN, Silva CAB, Mezzomo LAM, Canto GDL, Rivero ERC. The risk of osteonecrosis on alveolar healing after tooth extraction and systemic administration of antiresorptive drugs in rodents: a systematic review *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2018; 46:245:256.
- 50) Yang H, Pan H, Yu F, Chen K, Shang G, Xu Y: A novel model of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw in rats. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 5161e5167, 2015.
- 51) Minamisako MC, Ribeiro GH, Lisboa ML, Cordeiro MR, Grandó LJ. Medication-related osteonecrosis of jaws: a low-level laser therapy and antimicrobial photodynamic therapy case approach. *Case reports in dentistry*, 2016.
- 52) Williams DW, Lee C, Kim T, Yagita H, Wu H, Park S, et al. Impaired bone resorption and woven bone formation are associated with development of osteonecrosis of the jaw-like lesions by bisphosphonate and anti-receptor activator of nf-kappaB ligand antibody in mice. *Am J Pathol* 2014; 184: 3084e3093.
- 53) Kolpakova ME, Zubareva AA, Artamonova TD, Lisovskaya EK, Chefu SG, Yagmurov OD, Vlasov TD. Experimental model of osteonecrosis of the jaw in rats treated with zoledronic acid. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2017; 55(2), 156-159.
- 54) Howie RN, Borke JL, Kurago Z, Daoudi A, Cray J, Zakhary IE, et al: A model for osteonecrosis of the jaw with zoledronate treatment following repeated major trauma. *PLoS One* 10: e0132520, 2015.
- 55) Janovszky A, Szabo A, Varga R, Garab D, Boros M, Mester C, et al: Periosteal microcirculatory reactions in a zoledronate-induced osteonecrosis model of the jaw in rats. *Clin Oral Investig* 19: 1279e1288, 2015.
- 56) Pacheco VN, Langie R, Etges A, Ponzoni D, Puricelli E: Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in rats e a blind randomized controlled trial. *Int J Exp Pathol* 96: 255e260, 2015.
- 57) Bucholz, R.W. Non allograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002, 395, 44–52.

- 58) Schmidt, L. E., Hadad, H., Vasconcelos, I. R., Colombo, L. T., da Silva, R. C., Santos, A., Cervantes, L., Poli, P. P., Signorino, F., Maiorana, C., Carvalho, P., & Souza, F. Á. (2019). Critical Defect Healing Assessment in Rat Calvaria Filled with Injectable Calcium Phosphate Cement. *Journal of functional biomaterials*, 10(2), 21. <https://doi.org/10.3390/jfb10020021>.
- 59) Wang, Y.; Wang, K.; Li, X.; Wei, Q.; Chai, W.; Wang, S.; Zhang, B. 3D fabrication and characterization of phosphoric acid scaffold with a HA/beta-TCP weight ratio of 60:40 for bone tissue engineering applications. *PLoS ONE* 2017, 12, e0174870.
- 60) Yuan, H.; Fernandes, H.; Habibovic, P.; de Boer, J.; Barradas, A.M.; de Ruiter, A.; de Bruijn, J.D. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 13614–13619.
- 61) Bayram, H., Kenar, H., Taşar, F., & Hasırcı, V. (2013). Effect of low level laser therapy and zoledronate on the viability and ALP activity of Saos-2 cells. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 42(1), 140-146.
- 62) Hafner, S., Ehrenfeld, M., Storz, E., & Wieser, A. (2016). Photodynamic Inactivation of *Actinomyces naeslundii* in Comparison With Chlorhexidine and Polyhexanide—A New Approach for Antiseptic Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw?. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 74(3), 516-522.
- 63) Çapar GD, Sapmaz-Metin M, Kütan E, Tomruk CO, Yalcin GM, Er N, Ozfidan GK. Preventive effect of doxycycline sponge against bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an animal study. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2016; 30(4), 752-761.
- 64) Bigueti CC, De Oliva AH, Healy K, Mahmoud RH, Custódio IDC, Constantino DH, Ervolino E, Duarte MAH, Fakhouri WD, Matsumoto MA. Medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senescent female mice treated with zoledronic acid: Microtomographic, histological and immunohistochemical characterization. *PLoS One*. 2019 Jun 14;14(6):e0214173. doi: 10.1371/journal.pone.0214173.

**ANEXO A - Comitê de Ética em Experimentação Animal da
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Tratamento da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos com a utilização da terapia fotodinâmica. Estudo experimental in vivo**", Processo FOA nº 00810-2018, sob responsabilidade de Francisley Ávila Souza apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 15 de Março de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 02 de Janeiro de 2020.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 02 de Fevereiro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Treatment of osteonecrosis of jaw induced by medicines with the use of photodynamic therapy. Experimental study in vivo**", Protocol FOA nº 00810-2018, under the supervision of Francisley Ávila Souza presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 15, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 02, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: February 02, 2020.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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