



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

**EDUARDO QUINTÃO MANHANINI SOUZA**

**AVALIAÇÃO DOS TECIDOS AO REDOR DE IMPLANTES  
OSSEOINTEGRADOS COM E SEM PERI-IMPLANTITE  
INDUZIDA E A RELAÇÃO COM A OCORRÊNCIA DE  
OSTEONECROSE DOS MAXILARES ASSOCIADA À  
TERAPIA MEDICAMENTOSA**

**Araçatuba- SP  
2022**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Araçatuba

**EDUARDO QUINTÃO MANHANINI SOUZA**

**AVALIAÇÃO DOS TECIDOS AO REDOR DE IMPLANTES  
OSSEOINTEGRADOS COM E SEM PERI-IMPLANTITE  
INDUZIDA E A RELAÇÃO COM A OCORRÊNCIA DE  
OSTEONECROSE DOS MAXILARES ASSOCIADA À  
TERAPIA MEDICAMENTOSA**

Tese 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 Doutor em Odontologia, área de concentração em Periodontia.

Orientador: Prof. Associado Edilson Ervolino

**Araçatuba- SP  
2022**

Catálogo na Publicação (CIP)  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S729a Souza, Eduardo Quintão Manhanini.  
Avaliação dos tecidos ao redor de implantes osseointegrados com e sem peri-implantite induzida e a relação com a ocorrência de osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa / Eduardo Quintão Manhanini Souza. - Araçatuba, 2022  
66 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Osteonecrose 2. Ácido zoledrônico 3. Peri-implantite  
4. Ratos Wistar I. T.

Black 6  
CDD 617.63

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, acima de tudo, em sua plenitude. Por suas bênçãos em todos os momentos, sobretudo nos mais difíceis, por tornar nossa existência possível.

Ao meu pai **José de Assis e Souza** e à minha mãe **Maria Helena Quintão Manhanini de Souza**, pelo amor incondicional, por serem exemplo como pessoa, família, pelo incentivo nas horas difíceis, e por nunca medirem esforços para me ajudar a tornar meus sonhos possíveis. Meus primeiros e eternos professores. Minhas conquistas são suas também.

Ao meu irmão **José de Assis e Souza Júnior**, pelo companheirismo de sempre, pelos conselhos, por não só ensinar o caminho, mas muitas das vezes, também me dar a mão para atravessá-lo com segurança. À minha querida namorada **Anne Carla Wienci**, por cada gesto de amor e carinho. Pelas noites entristecidas motivadas pela distância e pela dedicação a nós dois, para continuarmos juntos apesar de todas as dificuldades.

Ao meu orientador e amigo **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**, minha eterna gratidão, por abrir as portas da faculdade desde o início. Pela sua sensibilidade, sugerindo uma temática voltada à Implantodontia devido a minha formação; pela sua paixão pela pesquisa, idealizando este trabalho e até sonhando com metodologias e técnicas; pelo seu comprometimento, até nos momentos mais difíceis, presente desde os experimentos nos animais até a finalização desta parte escrita.

Aos professores membros da banca examinadora **Profa. Letícia Helena Theodoro**, **Profa. Mariza Akemi Matsumoto**, **Prof. Noé Vital Ribeiro Júnior** e **Prof. Leandro Araújo Fernandes**, pela disponibilidade, gentileza, e por aceitarem imediatamente o convite, pelas análises, comentários e contribuições para o aperfeiçoamento da versão final deste trabalho.

À **Profa. Letícia Helena Theodoro**, pela sua determinação implacável, pelos conhecimentos transmitidos, pela ajuda em diversos trabalhos científicos, os quais foram essenciais para a minha evolução como pessoa, pesquisador e conclusão do doutorado. Pelas oportunidades dentro da Faculdade, dentro da disciplina de

Periodontia, serei eternamente grato. À **Profa. Mariza Akemi Matsumoto**, pela amizade e companhia no departamento, durante os diversos almoços, pelas conversas, direcionamentos, pela correção do inglês que ajudou na publicação do meu mestrado, meus sinceros agradecimentos. Ao **Prof. Noé Vital Ribeiro Júnior**, a quem devo muito da minha formação, participando desde minha primeira orientação, no TCC da graduação, até minha mudança de comportamento, postura e seriedade com a qual eu vejo a odontologia hoje, em quem me espelho, tanto pela sua maestria como cirurgião, como na sabedoria rotineiramente apresentada em sala de aula. Ao **Prof. Leandro Araújo Fernandes**, por abrir meus olhos no campo da pesquisa, por suas orientações, sua integridade, por tornar possível minha jornada à Araçatuba, e por nunca desistir de fazer o que era o correto e o melhor para mim.

Ao **Prof. Valdir Gouveia Garcia**, pela ajuda com a aquisição dos implantes osseointegráveis, pela sua vasta experiência e transmissão de conhecimento para a realização deste trabalho, pela sua humildade, amizade, trazendo soluções simples e valiosas à problemas que pareciam impossíveis de serem superados.

Ao **Prof. Juliano M. de Almeida**, pelos ensinamentos na área de Periodontia, pelas oportunidades cirúrgicas, pela maestria nas cirurgias plásticas muco-gengivais, despertando nosso fascínio, admiração, e vontade de realizar procedimentos com tanta expertise. Sou muito grato por todas as oportunidades.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA/UNESP)** e ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia**, por toda a estrutura e organização, para que fosse possível utilizar da melhor maneira possível todos os recursos necessários para minha evolução científica, acadêmica e realização deste trabalho.

À **seção técnica de pós-graduação**, em especial à **Cristiane R. L. Matos**, pela disponibilidade e prontidão para resolução de dúvidas e contratempos no decorrer do curso. A bibliotecária **Ana Cláudia M. G. Manzati**, pela ajuda durante a aquisição de artigos científicos, normatização e estruturação do texto.

Ao **Departamento de Ciências Básicas** da FOA/UNESP, pela convivência do dia a dia, onde fui muito bem recebido e acolhido por todos. À **Profa. Roberta Okamoto**,

e ao aluno de doutorado **Fábio R. de S. Batista**, pela amizade e pelos ensinamentos e técnicas para a exodontia do incisivo superior dos animais utilizados neste estudo. À **Profa. Alaíde Gonçalves**, ao **Prof. Paulo Roberto Botacin**, por todas as conversas, conselhos, científicos ou não, aos servidores técnico-administrativos, **Eliseide M. F. S. Navega**, ao **Arnaldo C. dos Santos** e em especial ao **André L. M. Piedade**, por todo suporte oferecido nas diversas etapas deste trabalho, em especial durante a microtomia dos espécimes.

A todos integrantes da “**Família ZOL**”, membros do **Laboratório de Osteobiologia Aplicada à Odontologia**, nossa equipe de trabalho conduzida com maestria pelo **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**. Ao meu amigo **Luan Felipe Toro**, a quem seria impossível não agradecer por toda a parceria neste trabalho, em cada cirurgia, em cada aplicação de zoledronato, em cada processamento histológico, sua força de vontade e determinação, com as diversas dificuldades metodológicas durante todo o caminho, fez ser possível alcançarmos, ou continuarmos buscando nossos objetivos. Aos meus amigos **Glauco R. C. Silveira**, **Isabella Z. Guiati**, **Vinícius F. Ganzaroli**, **Tiago E. da Rocha**, **Luy de A. Costa**, **Jéssica S. Santana**, **Jéssica de O. A. Freire**, **Mariane B. Olivo**, **João Paulo S. Franciscon**, **Estêvão**, **André**, **Vitor** e **Yasmin**, agradeço por todo o esforço e empenho realizado em nossas pesquisas e pelo cuidado com os animais.

A todos **amigos e alunos do programa de pós-graduação em Odontologia**, pela troca de experiências, expectativas de vida, angústias e alegrias inerentes a este momento, em especial aos amigos **Vinicius F. Bizelli** e **Gestter W. L. Tessarin**, pela convivência dentro e fora do campus, fundamentais para meu crescimento acadêmico e humano.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (**CAPES**) – Código de Financiamento 001.

E por fim, meu profundo respeito aos **animais** utilizados nesta pesquisa. Que os resultados apresentados aqui sejam apenas o início para a conscientização da comunidade científica e profissionais de saúde, só assim, os esforços terão valido a pena.

SOUZA, E. Q. M. **Avaliação dos tecidos ao redor de implantes osseointegrados com e sem peri-implantite induzida e a relação com a ocorrência de osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa.** 2022. 66 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta dos tecidos peri-implantares em condições de normalidade e com peri-implantite induzida por ligadura, em implantes osseointegrados na maxila de ratas senescentes submetidas ao tratamento posterior com dosagem oncológica de zoledronato. **Material e métodos:** Foram utilizadas 28 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) iniciando o experimento com aproximadamente 14 meses de idade e pesando entre 350 e 450g. Os animais foram submetidos à exodontia do incisivo superior direito e instalação imediata de um implante de titânio com 2,5 mm de diâmetro por 5,7 mm de comprimento, onde após quase 2 meses, foi realizada a cirurgia de reabertura dos implantes e instalação de um cicatrizador. Após uma semana, os animais foram divididos de acordo com os seguintes tratamentos: veículo, administração de solução salina estéril 0,9% intraperitoneal (Grupo VEI); zoledronato, com administração de 100 µg/Kg de zoledronato (Grupo ZOL); veículo com peri-implantite experimental (Grupo VEI-PIE) e; zoledronato com peri-implantite experimental (Grupo ZOL-PIE), com a indução da peri-implantite experimental (PIE) por meio de uma ligadura de algodão 5 semanas após o início do tratamento medicamentoso. A porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) foram analisadas histometricamente, e foram realizadas imunomarcações para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL1- $\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e osteocalcina (OCN). Os dados foram submetidos à análise estatística. **Resultados:** O grupo ZOL mostrou persistência de inflamação no tecido conjuntivo peri-implantar e uma quantidade considerável de PTO-NV ao redor do implante quando comparado com VEI. A inflamação peri-implantar foi mais exacerbada em ZOL-PIE, assim como, o comprometimento da vitalidade do tecido ósseo ao redor dos implantes quando comparado com VEI-PIE. **Conclusão:** Conclui-se que o

tratamento com altas doses de zoledronato ocasiona alterações ao nível peri-implantar, dentre elas, um aumento da inflamação local, e da PTO-NV ao redor do implante osseointegrado, o que pode representar um possível fator de risco para o surgimento da osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa relacionada ao implante odontológico (ONMM-IO). Na presença da PIE há uma exacerbação da inflamação e um aumento ainda maior da PTO-NV, o que implica em um importante fator de risco agravante para o surgimento da ONMM-IO no modelo experimental estudado.

**Palavras-chave:** Osteonecrose. Ácido zoledrônico. Peri-implantite. Ratos wistar.

SOUZA, E. Q. M. **Tissue evaluation around osseointegrated implants with and without induced peri-implantitis and the relation with the occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaw.** 2022. 66 f. Thesis (Doctoral) – Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, 2022.

## **ABSTRACT**

**Aim:** The aim of this study was to evaluate the response of peri-implant tissues under normal conditions and with ligature-induced peri-implantitis, in osseointegrated implants in the maxilla of senescent rats submitted to subsequent treatment with oncological dosage of zoledronate. **Material and methods:** Twenty-eight female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used, starting the experiment at approximately 14 months of age and weighing between 350 and 450g. The animals underwent extraction of the upper right incisor and immediate installation of a titanium implant 2.5 mm wide by 5.7 mm long, where after almost 2 months, surgery to reopen the implants and installation of a healer was performed. After one week, the animals were divided according to the following treatments: vehicle, administration of 0.9% sterile saline intraperitoneally (VEI Group); zoledronate, with administration of 100 µg/Kg of zoledronate (ZOL Group); vehicle with experimental peri-implantitis (VEI-PIE Group) and; zoledronate with experimental peri-implantitis (ZOL-PIE Group), with the induction of experimental peri-implantitis (PIE) by means of a cotton suture 5 weeks after the start of drug treatment. The percentage of total bone tissue (PBT-T) and percentage of non-vital bone tissue (PBT-NV) were analyzed histometrically, and immunostaining for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interleukin 1 beta (IL1- $\beta$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF) and osteocalcin (OCN). Data were subjected to statistical analysis. **Results:** The ZOL group showed persistence of inflammation in the peri-implant connective tissue and a considerable amount of PBT-NV around the implant when compared to VEI. Peri-implant inflammation was more exacerbated in ZOL-PIE, as well as compromised bone tissue vitality around the implants when compared to VEI-PIE. **Conclusion:** It is concluded that treatment with high doses of zoledronate causes changes at the peri-implant level, among them, an increase in local inflammation, and in PBT-NV around the osseointegrated implant, which may represent a possible risk factor for the emergence of medication-related osteonecrosis of the jaws implant-

associated (MRONJ-IA). In the presence of PIE, there is an exacerbation of inflammation and an even greater increase in PBT-NV, which implies an important aggravating risk factor for the emergence of MRONJ-IA in the experimental model studied.

**Keywords:** Osteonecrosis. Zoledronic acid. Peri-implantitis. Wistar rats.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Painel fotográfico dos procedimentos cirúrgicos experimentais: **(a)** Sindesmotomia do tecido mole periodontal ao redor do incisivo superior direito realizada com Hollemback 3s. **(b)** Apreensão do incisivo superior com pinça clínica romba. **(c)** Morfologia do incisivo central superior direito após a extração. **(d)** Aspecto do alvéolo após a exodontia, previamente à instalação do implante osseointegrado. **(e)** Chave digital quadrada acoplada à conexão interna do implante. **(f)** Início da inserção do implante no alvéolo dentário. **(g)** Aspecto lateral do término da inserção do implante no alvéolo dentário. **(h)** Posicionamento final do implante após alcançar a estabilidade primária pelo travamento nas paredes do alvéolo. **(i)** Sutura interrompida simples para aproximação das bordas da ferida. **(j)** Rebatimento do retalho de espessura total sobre o implante. **(k)** Chave 0.9 acoplada na conexão interna do cicatrizador. **(l)** Cicatrizador instalado. **(m)** Início da instalação do fio de algodão ao redor do cicatrizador do implante, com o auxílio de um Hollemback 3S o fio foi inserido no sulco peri-implantar. **(n)** Fio instalado ao redor do implante. **(o)** Acúmulo de biofilme ao redor do fio de algodão 5 semanas após sua instalação.

55

Figura 2 Características do implante e do cicatrizador e áreas de interesse avaliadas no presente estudo. **(a)** Desenho esquemático da estrutura e das dimensões do implante e do cicatrizador. **(b)** Fotografia evidenciando o implante e o cicatrizador em separado e acoplados um ao outro. **(c)** Desenho esquemático mostrando a posição do implante-cicatrizador na maxila do rato. **(d)** Representação evidenciando as áreas de interesse (AI) analisadas no presente estudo, sendo que em AI1 foi efetuada a análise histológica (retângulo preto), em AI2 foram efetuadas as análises da PTO-T, PTO-NV e OCN (retângulos vermelhos), em AI3 foi efetuada a análise de TRAP (retângulo azul) e em AI4 foram efetuadas as análises de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , VEGF (retângulo verde).

57

Figura 3 Delineamento experimental: Tratamento medicamentoso com veículo ou zoledronato. Período experimental com ênfase no tratamento medicamentoso com veículo ou zoledronato. No início do experimento foram realizadas a exodontia do incisivo superior direito e a instalação imediata do implante osseointegrado. As ratas foram submetidas a alta dose de zoledronato após o período de osseointegração do

implante, e a indução da PIE foi realizada durante o tratamento medicamentoso com a instalação de uma ligadura com fio de algodão ao redor do cicatrizador do implante, instalado previamente, no dia da reabertura. 58

Figura 4 Porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) no tecido peri-implantar. **(a)** e **(f)** Gráficos mostrando a PTO-T **(a)** e de PTO-NV **(f)**, sendo que: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PIE; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL. **(b - e)** e **(g - j)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de estruturação e de celularidade do tecido ósseo situado nas espiras do implante **(b - e)** e nas adjacências imediatas das espiras **(g - j)** nos grupos VEI **(b e g)**, VEI-PIE **(c e h)**, ZOL **(d e i)** e ZOL-PIE **(e e j)**. Símbolos: setas vermelhas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm. 59

Figura 5 Imunomarcção para TRAP no tecido ósseo peri-implantar. **(a)** Gráfico mostrando a quantidade de células TRAP-positivas, sendo que: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PIE. **(b - e)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP **(b - e)** no tecido ósseo peri-implantar nos grupos VEI **(b)**, VEI-PIE **(c)**, ZOL **(d)** e ZOL-PIE **(e)**. **(f - g)** Fotomicrografias destacando as diferenças entre osteoclastos dos grupos tratados com veículo e dos grupos tratados com zoledronato, onde tais células aparecem com dimensões muito maiores, hipernucleadas, arredondas e distantes da matriz ósseo. As células estão indicando as células imunomarcadas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: **(b - e)** 1000x; **(f - g)** 4000x. Barras de escala: **(b - e)** 25 µm; **(f - g)** 10 µm. 60

Figura 6 Imunomarcção para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido peri-implantar. **(a)** e **(f)** Gráficos mostrando a densidade de imunomarcção para TNF $\alpha$  **(a)** e IL-1 $\beta$  **(f)**, sendo que: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PIE; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL. **(b - e)** e **(g - j)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TNF $\alpha$  **(b - e)** e IL-

1 $\beta$  (**g - j**) no tecido peri-implantar nos grupos VEI (**b e g**), VEI-PIE (**c e h**), ZOL (**d e i**) e ZOL-PIE (**e e j**). Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25  $\mu$ m. 61

**Figura 7** Imunomarcção para VEGF e OCN no tecido peri-implantar. (**a**) e (**f**) Gráficos mostrando a densidade de imunomarcção para VEGF (**a**) e OCN (**f**), sendo que: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PIE. (**b - e**) e (**g - j**) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para VEGF (**b - e**) e OCN (**g - j**) no tecido peri-implantar nos grupos VEI (**b e g**), VEI-PIE (**c e h**), ZOL (**d e i**) e ZOL-PIE (**e e j**). As células estão indicando as células imunomarcadas. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25  $\mu$ m. 62

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	porcentagem
+	mais
<	menor
>	maior
±	mais ou menos
°C	grau Celsius
μA	microampère
μm	micrômetro
AI	área de interesse
ALE	Alemanha
AM	Amazonas, Brasil
AN	Antuérpia, Bélgica
ANOVA	Análise de variância
BFs	Bisfosfonatos
BMP-2	proteína óssea morfogenética 2, <i>bone morphogenetic protein 2</i>
BRA	Brasil
BSA	soro albumina bovino, <i>bovine serum albumine</i>
CA	Califórnia, Estados Unidos da América
DAMPS	padrões moleculares associados ao dano, <i>damage-associated molecular patterns</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EUA	Estados Unidos da América
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g	grama
HE	hematoxilina-eosina
IFN-γ	interferon gama, <i>interferon gamma</i>
IL1β	interleucina 1β, <i>interleukin 1β</i>
IL6	interleucina 6, <i>interleukin 6</i>
IL8	interleucina 8, <i>interleukin 8</i>
IM	intramuscular
IO	implantes odontológicos
kV	quilovolt

LPS	lipopolissacarídeos
M	molar
MD	Maryland, Estados Unidos da América
mg/Kg	miligrama por quilograma
MIP	projeção de intensidade máxima, <i>maximum intensity projection</i>
ml	mililitro
mm	milímetro
mm <sup>2</sup>	milímetro quadrado
MO	Missouri, Estados Unidos da América
MRONJ-IA	<i>medication-related osteonecrosis of the jaws implant-associated</i>
NaCl	cloreto de sódio
NF-κβ	fator nuclear kappa beta, <i>beta kappa nuclear factor</i>
nº	número
OCN	osteocalcina, <i>osteocalcin</i>
ONM	osteonecrose dos maxilares
ONMM	osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa
ONMM-IO	osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa relacionada ao implante odontológico
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos, <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	tampão fosfato-salino, <i>phosphate buffered-saline</i>
PBT-NV	<i>percentage of bone tissue, non-vital</i>
PBT-T	<i>percentage of bone tissue, total</i>
pH	potencial hidrogeniônico
PI	peri-implantite
PIE	peri-implantite experimental
PR	Paraná, Brasil
PTO-NV	porcentagem de tecido ósseo não vital
PTO-T	porcentagem de tecido ósseo total
PVPI	polivinilpirrolidona iodo
RANK-L	ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
RJ	Rio de Janeiro
rpm	rotações por minuto

SC	Santa Catarina, Brasil
SP	São Paulo, Brasil
TLR-2	receptor do tipo Toll Like 2, <i>Toll Like receptor 2</i>
TLR-4	receptor do tipo Toll Like 4, <i>Toll Like receptor 4</i>
TNFR1	receptor 1 de fator de necrose tumoral, <i>tumoral necrosis factor receptor 1</i>
TNF $\alpha$	fator de necrose tumoral $\alpha$ , <i>tumoral necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TRAP	fosfatase ácida resistente ao tartarato, <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular, <i>vascular endothelial growth factor</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Animais	24
2.2 Anestesia geral	24
2.3 Exodontia do incisivo superior direito e instalação do implante	24
2.4 Exposição da plataforma do implante	25
2.5 Protocolo medicamentoso	26
2.6 Grupos experimentais	26
2.7 Indução da peri-implantite experimental	27
2.8 Cuidados pós-operatórios de rotina	27
2.9 Eutanásia	27
2.10 Processamento histológico	28
2.11 Processamento imunohistoquímico	28
2.12 Análise dos resultados	30
2.12.1 Análise do estado geral de saúde e exame clínico intraoral	30
2.12.2 Análises histopatológicas, histométricas da PTO-T e PTO-NV e imunohistoquímicas para TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , VEGF, OCN e TRAP	30
2.12.3 Análise estatística	32
3 RESULTADOS	33
3.1 Análise do estado geral de saúde e exame clínico intraoral	33
3.2 Aspectos histopatológicos dos tecidos peri-implantares	34
3.3 PTO-T e PTO-NV ao redor dos implantes	35
3.4 TRAP nos tecidos peri-implantares	35
3.5 TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , VEGF e OCN nos tecidos peri-implantares	35
4 DISCUSSÃO	37
5 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
FIGURAS	55
MATERIAL SUPLEMENTAR	63
ANEXOS	66

**MANUSCRITO EM PORTUGUÊS PARA ENVIO À REVISTA  
“JOURNAL OF CLINICAL PERIODONTOLOGY”<sup>1</sup>**

**Avaliação dos tecidos ao redor de implantes osseointegrados com e sem peri-implantite induzida e a relação com a ocorrência de osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa**

Eduardo Quintão Manhanini Souza<sup>1</sup> (e-mail: [eduardoquintao@hotmail.com](mailto:eduardoquintao@hotmail.com))

<https://orcid.org/0000-0002-5505-065X>

Edilson Ervolino<sup>2</sup> (e-mail: [e.ervolino@unesp.br](mailto:e.ervolino@unesp.br))

<https://orcid.org/0000-0003-4859-0583>

<sup>1</sup>Aluno de Doutorado em Periodontia, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

**Autor correspondente:**

Edilson Ervolino

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Rodovia Marechal Rondon, s/n - Jardim Nova York - SP, CEP: 16066-840.

Telefone: 55 (18) 3636-3200

e-mail: [e.ervolino@unesp.br](mailto:e.ervolino@unesp.br)

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta dos tecidos peri-implantares em condições de normalidade e sob influência da peri-implantite experimental (PIE) em implantes osseointegrados na maxila de ratas submetidas ao tratamento com dosagem oncológica de zoledronato. **Material e métodos:** 28 ratas Wistar foram submetidas à exodontia do incisivo superior direito e instalação imediata de um implante, onde posteriormente (8 semanas) foi instalado um cicatrizador. Os animais foram divididos de acordo com os seguintes grupos: Veículo (VEI), administração de solução salina estéril; Zoledronato (ZOL), administração de 100 µg/Kg de zoledronato; Veículo com peri-implantite experimental (VEI-PIE) e; Zoledronato com peri-implantite experimental (ZOL-PIE), ambos com a indução da PIE por meio de uma ligadura. A porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) foi analisada histometricamente, e foram realizadas imunomarcações para citocinas pró inflamatórias, marcadores ósseos e de vasculatura. **Resultados:** ZOL apresentou uma maior PTO-NV ao redor do implante quando comparado com VEI. A inflamação peri-implantar foi mais exacerbada em ZOL-PIE, assim como, o comprometimento da vitalidade do tecido ósseo ao redor dos implantes quando comparado com VEI-PIE. **Conclusão:** O tratamento com altas doses de zoledronato ocasiona um aumento da inflamação local e da PTO-NV ao redor do implante osseointegrado, o que pode representar um possível fator de risco para o surgimento da osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa relacionada ao implante odontológico (ONMM-IO). Na presença da PIE há uma exacerbção da inflamação e um aumento ainda maior da PTO-NV, o que implica em um importante fator de risco agravante para o surgimento da ONMM-IO.

**Palavras-chave:** Osteonecrose; Ácido Zoledrônico; Peri-implantite; Ratos Wistar.

## 1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONMM) é uma reação adversa ocasionada, predominantemente, pelo uso de drogas com potente ação antirreabsortiva, tais como os bisfosfonatos (BFs) e o inibidor do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), o denosumab (Eguia et al., 2020). A ONMM consiste na presença de osso exposto (ou osso que pode ser sondado através de fístula intra ou extrabucal) na região maxilofacial, o qual persiste sem reparação por um período maior do que oito semanas, em pacientes com tratamento prévio ou atual com drogas antirreabsortivas e/ou antiangiogênicas e sem histórico de radioterapia ou doença metastática nos maxilares (Ruggiero et al., 2022). A incidência da ONMM em pacientes que usam a dosagem para tratamento das osteoporoses com drogas antirreabsortivas é relativamente baixa, em torno de 0,04% dos pacientes (Khan et al., 2015). Em contraposição, em pacientes que fazem uso da dosagem para tratamento oncológico com BFs, o risco cumulativo após 2 anos varia de 3,8 a 18% dos pacientes, o que passa a ser um grande fator complicador, tendo em vista que a ONMM atrapalha sobremaneira o tratamento da doença de base (Terry, et al., 2021; Ruggiero et al., 2022).

A etiopatogenia da ONMM ainda não está totalmente elucidada, no entanto, estudos apontam para uma natureza multifatorial extremamente complexa (Ruggiero et al., 2022). Atualmente são apontados como fatores etiopatogênicos envolvidos com a ONMM: a inibição da atividade reabsortiva dos osteoclastos, a qual provavelmente exerça um papel central, associada a presença de inflamação e/ou infecção local, potente efeito antiangiogênico, ação citotóxica sobre os tecidos moles e disfunção da resposta imunológica inata e adquirida (Aghaloo et al., 2015; Kuroshima et al., 2019; He et al., 2020). A limitada compreensão da etiopatologia, dificulta o tratamento, o qual pode ser extremamente longo, se mostrar falho e deixa graves sequelas (Wan et al., 2020). Sendo assim, a prevenção é a estratégia ideal em se tratando da ONMM (Hayashida et al., 2017; Otto et al., 2018; He et al., 2020).

Dentre os fatores de risco relacionados à droga, constata-se que quanto mais potente a ação antirreabsortiva, quanto maior da dosagem e duração do tratamento, maior é o risco de ocorrência da ONMM (AIDhalaan et al., 2020). Além disso, o uso de tais drogas em associação com corticóides e quimioterápicos potencializam tais

riscos (Wick et al., 2022). Entre os fatores relacionados ao paciente, a idade avançada, o sexo feminino e comorbidades, como câncer, diabetes, obesidade e anemia estão entre os principais riscos (Escobedo et al., 2020; Kawahara et al., 2021). Com relação aos fatores locais, as cirurgias dento-alveolares estão entre os principais fatores predisponentes (62% – 82% dos casos ONMM), especialmente quando há comprometimento de natureza inflamatório-infecciosa (Hallmer et al., 2018; Kuroshima et al., 2019).

Uma situação clínica preocupante que tem sido reportada de modo crescente é um tipo de ONMM relacionada com os implantes odontológicos (IO), a ONMM-IO. Estudos clínicos evidenciaram que a ONMM-IO pode se manifestar como uma complicação precoce em cerca de 1/3 dos pacientes, estando relacionada com o procedimento cirúrgico de instalação dos IO e ocorre nos primeiros seis meses após sua instalação, ou seja, durante o processo de reparo peri-implantar (Kwon et al., 2014; Giovannacci et al., 2016). A ONMM-IO também pode se manifestar como uma complicação tardia, em cerca de 2/3 dos pacientes, e seu desencadeamento pode estar relacionado com a presença do implante já osseointegrado, neste caso é caracterizada por ocorrer após seis meses da sua instalação, depois de concluído o processo de reparação peri-implantar (Shirota et al., 2009; Goss et al., 2010; Lazarovici et al., 2010; Junqueira et al., 2011; López-Cedrún et al., 2013; Holzinger et al., 2014; Kwon et al., 2014; Favia et al., 2015; Giovannacci et al., 2016; Matsuo et al., 2016; Bennardo et al., 2020; Escobedo et al., 2020).

Com o intuito de evitar a ONMM-IO tem sido contraindicado IO em pacientes tratados com dosagem oncológica de agentes antirreabsortivos, todavia, isso não se estende aos pacientes tratados com dosagem osteoporótica destes medicamentos (Grant et al., 2008). Tal recomendação evitaria a ocorrência de ONMM-IO relacionada com o procedimento cirúrgico de instalação dos IO, no entanto, uma condição que deve ser vista com muita preocupação é aquela apresentada por pacientes que já possuem IO osseointegrados na cavidade bucal e que em um determinado momento iniciam um tratamento com drogas antirreabsortivas (Sher et al., 2021). Tais pacientes consistem na maioria dos casos de ONMM-IO, que tende a ser cada vez mais comuns em função da popularização do uso dos IO nas últimas décadas e por conta de um emprego cada vez mais frequente das drogas antirreabsortivas para tratamento de eventos relacionados ao esqueleto, que

aumenta consideravelmente com o aumento na expectativa de vida da população (Fliefel et al., 2015).

Uma outra preocupante constatação apontada por estudos clínicos é uma correlação entre presença de peri-implantite (PI) e a ONMM-IO em pacientes que fizeram ou fazem uso de drogas antirreabsortivas (Kwon et al., 2014; Troeltsch et al., 2016; Pichardo et al., 2020; Seki et al., 2021; Tempesta et al., 2021). A PI consiste em uma condição patológica primariamente iniciada por bactérias, no entanto, extremamente influenciada por fatores locais e sistêmicos, que acometem os tecidos peri-implantares, caracterizada por inflamação no tecido conjuntivo e perda progressiva do tecido ósseo de suporte, a qual pode culminar, inclusive, com a explantação do implante (Schwarz et al., 2018). A PI pode afetar até 57% dos pacientes e até 28% dos IO, e consiste na causa mais comum para perda tardia de IO (Sgolastra et al., 2015; Lang et al., 2019; Romandini et al., 2020). Em pacientes sob tratamento com drogas antirreabsortivas, além de se constituir em um fator que pode levar a perda do IO, também poderia se constituir em um fator predisponente para a ONMM-IO, com consequências negativas muito maiores.

As alterações que ocorrem ao nível celular e tecidual ao redor dos IO já osseointegrados ao longo ou após um tratamento com drogas antirreabsortivas pode elucidar mecanismos patofisiológicos envolvidos na ONMM-IO e, conseqüentemente auxiliar em sua prevenção e tratamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta dos tecidos peri-implantares em condições de normalidade e sob influência da peri-implantite induzida por ligadura, em implantes osseointegrados na maxila de ratas senescentes submetidas ao tratamento posterior com dosagem oncológica de zoledronato. Nosso estudo teve como intuito investigar duas hipóteses principais: 1) se a presença do implante osseointegrado ocasiona alterações ao nível celular e tecidual que podem se constituir em fator de risco para a ONMM-IO ao longo de um tratamento com dosagem oncológica de zoledronato e; 2) se a inflamação dos tecidos peri-implantares induzida pelo acúmulo do biofilme ocasiona alterações ao nível celular e tecidual que podem se constituir em um fator de risco agravante para a ONMM-IO ao longo de um tratamento com dosagem oncológica de zoledronato.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizadas no presente estudo 28 ratas (iniciando o estudo com aproximadamente 14 meses de idade) da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)* com peso corporal compreendido entre 350 e 450g. As ratas foram obtidas no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA-UNESP) e, posteriormente, foram mantidas no Biotério de Experimentação do Departamento de Ciências Básicas (Disciplina de Histologia e Embriologia) da FOA-UNESP, sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sistema de ventilação e exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de  $55 \pm 5\%$ , acondicionamento em gaiolas plásticas (máximo de 4 animais por gaiola), onde tiveram livre acesso à água e à alimentação. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar seu sofrimento. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA-UNESP (PROCESSO FOA 01006-2018).

### **2.2 Anestesia geral**

Para a exodontia do incisivo central superior direito, instalação do implante odontológico, instalação da ligadura e eutanásia os animais foram anestesiados, via injeção intramuscular (IM), com cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar<sup>®</sup>, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum<sup>®</sup>, Bayer, RS, Brasil).

### **2.3 Exodontia do incisivo superior direito e instalação do implante**

No baseline, previamente a exodontia, foi realizada a assepsia extraoral com Polivinilpirrolidonaioado (PVPI) em solução aquosa, contendo 1% de iodo ativo, seguida da assepsia intraoral de digluconato de clorexidina 0,12%. Uma exodontia

minimamente traumática foi realizada, utilizando um Holleback 3S para a sindesmotomia dos tecidos moles (Fig.1a) e cuidadosa luxação com movimentos de alavanca interfixa e inter-resistente nos sentidos mesio-distal e palatino-vestibular do elemento dentário. Uma pinça clínica romba de maior diâmetro de ponta ativa foi utilizada para apreensão do incisivo superior direito (Fig.1b), onde devido às características anatômicas dos incisivos dos roedores, um movimento de tração rotacionado no sentido vestibulo-palatino foi realizado para a exodontia (Fig.1c e Fig.1d), sendo possível observar no ápice da raiz a remoção conjunta da papila dentária.

No alvéolo dentário, previamente ocupado pelo incisivo superior direito foi instalado imediatamente um implante de titânio especialmente projetado com 2,5 mm de diâmetro por 5,7 mm de comprimento e com superfície tratada por meio de jateamento e condicionamento ácido (Dentfix, Allied Titanium Eireli, Santa Rita do Passa Quatro, SP, Brasil) (Fig.1e, Fig.2a e Fig.2b). O implante foi inserido com o auxílio de uma chave digital quadrada acoplada à conexão interna do implante (Fig.1f e Fig.1g), por meio de movimentos manuais de rosqueamento, até que fosse obtido um travamento adequado do mesmo e, conseqüentemente, a sua estabilização primária pelas paredes laterais e pela curvatura do alvéolo (Fig.2c). A inserção do implante foi realizada de forma lenta e gradativa respeitando a resiliência do tecido ósseo, e almejando a expansão das paredes laterais do alvéolo. Um posicionamento a nível gengival ou minimamente subgengival do implante foi alcançado (Fig.1h).

Após a instalação do implante, os tecidos moles peri-implantares foram devidamente reposicionados e uma sutura com fio de seda 4.0 foi realizada para estabilização do coágulo com ponto simples (Fig.1i). Imediatamente após a cirurgia os animais receberam 0,01mL/100g de pentabiótico, por via IM para prevenção de infecções.

## **2.4 Exposição da plataforma do implante**

Na 8ª semana foi realizada a exposição da plataforma do implante. Após anestesia geral dos animais, foi promovida a anestesia local com lidocaína 2% + adrenalina 1:100.000 (Alphacaine 100 - New DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para

hemostasia. Uma incisão linear com uma lâmina de bisturi 15c foi realizada perpendicularmente ao dente contralateral, sobre a região implantada e um retalho de espessura total foi rebatido com um Holleback 3S (Fig.1j). O cicatrizador de 1,8 mm de altura (Dentfix, Allied Titanium Eireli, Santa Rita do Passa Quatro, SP, Brasil) foi instalado com auxílio de uma chave digital hexagonal 0.9 (Fig.1k e Fig.1l) e a estabilidade secundária do implante foi aferida clinicamente.

Em alguns espécimes, após o rebatimento do retalho de espessura total, houve a necessidade da remoção de uma pequena quantidade de tecido ósseo que recobria a plataforma do implante, impossibilitando a adaptação do cicatrizador, sendo realizada a osteotomia com uma broca diamantada esférica nº 4, acoplada a uma peça reta, em um motor cirúrgico NEOSURG XT plus (Neodent, PR, Brasil) a 600 rpm e com irrigação constante de solução salina estéril 0,9% (Laboratório Eurofarma AS, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Uma sutura simples interrompida com um fio de seda 4.0 foi realizada para aproximação dos tecidos ao redor do cicatrizador.

## **2.5 Protocolo medicamentoso**

Na 9ª semana foi iniciado o protocolo medicamentoso, o qual se estendeu até 19ª semana. Tal protocolo consistiu na administração intraperitoneal a cada quatro dias de 0,45 ml de veículo, composto por solução de cloreto de sódio 0,9%, ou 0,45 ml de zoledronato (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA), composto por veículo acrescido de 100 µg/Kg de zoledronato. A dosagem de zoledronato empregada no presente estudo foi estabelecida com base em estudos anteriores (Silva et al., 2015; Ervolino et al., 2019; Toro et al., 2019) e consistiu em uma adaptação para o rato do protocolo empregado para complementação da terapia oncológica em humanos, ou seja, utilizou-se a dosagem para tratamento oncológico.

## **2.6 Grupos experimentais**

Na 9ª semana os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo tratado com veículo (VEI) (n=7); Grupo tratado com veículo e com peri-implantite experimental (VEI-PIE) (n=7); Grupo tratado com zoledronato (ZOL) (n=7) e grupo tratado com zoledronato e com peri-implantite experimental (ZOL-PIE)

(n=7). Na 14ª semana os animais dos grupos VEI-PIE e ZOL-PIE receberam uma ligadura de algodão ao redor dos implantes para indução da peri-implantite experimental (PIE) (Fig.3).

## **2.7 Indução da peri-implantite experimental**

Nos grupos VEI-PIE e ZOL-PIE com o auxílio de um holleback 3s foi instalada uma ligadura de algodão (#24; Coats Corrente Ltda.) ao redor da porção cervical do cicatrizador, de modo que tal ligadura se manteve posicionada na região do sulco peri-implantar durante 5 semanas (Fig.1m e Fig.1n), levando ao acúmulo de biofilme bacteriano e, conseqüentemente, ao desencadeamento da PIE (Fig.1o). A presença da ligadura foi verificada semanalmente, até o fim do experimento.

## **2.8 Cuidados pós-operatórios de rotina**

Durante todo o período experimental após a instalação do implante, os animais foram submetidos a uma dieta com ração moída, para facilitar a alimentação e minimizar o estresse biomecânico sobre o implante dentário. Devido ao fato de que roedores apresentam um crescimento contínuo dos incisivos superiores e inferiores, semanalmente os dentes inferiores eram cortados com o auxílio de um alveolótomo biarticulado, com o intuito de possibilitar a correta alimentação e evitar uma ação mecânica negativa sobre a região onde o implante foi instalado.

## **2.9 Eutanásia**

Após 5 semanas da instalação das ligaduras ao redor dos implantes dos grupos VEI-PIE e ZOL-PIE, na 19ª semana do experimento, os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com 100 ml de solução de NaCl 0,9% acrescida de 0,1% de heparina, seguida por 800 ml de solução fixadora, constituída de 4% de formaldeído (Sigma-Aldrich Co.) em tampão fosfato-salino (PBS) 0,1 M, 4°C, pH 7,4.

Dois animais, sem nenhum tratamento medicamentoso e não incluídos em nenhum dos quatro grupos experimentais foram eutanasiados após 8 semanas da instalação do implante, seguindo os mesmos critérios, para análise microtomográfica no período de cicatrização e osseointegração do implante (material suplementar 1 e material suplementar 2).

## **2.10 Processamento histológico**

As maxilas contendo os implantes de titânio foram cuidadosamente dissecadas e submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora citada anteriormente por um período de 48 horas. Após lavagem em água por 24 horas, os espécimes foram submetidos a um processo de desmineralização durante aproximadamente 75 dias, com solução desmineralizadora constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) trocada periodicamente.

Após a desmineralização, os implantes foram cuidadosamente removidos com uma chave hexagonal 0.9 acoplada a conexão interna dos cicatrizadores instalados aos implantes, as peças foram lavadas novamente em água corrente por 24 horas, desidratadas, diafanizadas, impregnadas e incluídas em parafina. Uma microtomia com 4 µm de espessura foi executada seguindo o longo eixo do implante, no sentido latero-lateral, ou seja, de mesial para distal do incisivo central superior. Cortes seriados da região central da loja do implante foram coletados e as seções histológicas foram montadas em lâminas de vidro silanizadas. Parte das amostras foi submetida à coloração de hematoxilina-eosina (HE), para análise histopatológica e histométrica, e outra parte foi destinada à técnica imunoistoquímica.

## **2.11 Processamento imunoistoquímico**

Os cortes histológicos foram desparafinizados em uma estufa a uma temperatura de 58°C por 30 minutos, seguido por banhos consecutivos em xilol, reidratação em soluções decrescentes de álcool etílico e lavagens em PBS,

lavagens estas, repetidas após o encerramento de cada etapa da reação imunoistoquímica.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato em câmara pressurizada (Decloaking chamber, Biocare Medical, Concord, CA, EUA). Para bloqueio da peroxidase endógena os cortes foram tratados com uma solução de 3% de peróxido de hidrogênio por uma hora. O bloqueio da biotina endógena também foi efetuado por um período de 1 hora, com solução contendo PBS e leite em pó desnatado a 4%. Os sítios inespecíficos foram bloqueados em seguida com uma solução a base de soro albumina bovino (BSA) por 12 horas.

As lâminas histológicas foram divididas em cinco lotes e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) do rato gerado em coelho (Santa Cruz Biotechnology®); anti-interleucina 1-beta (IL1- $\beta$ ) do rato gerado em coelho (Santa Cruz Biotechnology®); anti-fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) do rato gerado em coelho (Santa Cruz Biotechnology®); anti-osteocalcina (OCN) do rato gerado em coelho (Santa Cruz Biotechnology®) e anti-fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) do rato gerado em cabra (Santa Cruz Biotechnology®). Os anticorpos primários foram diluídos em BSA em uma concentração de 1:100. Após 24 horas de incubação em anticorpo primário, uma segunda incubação com anticorpo secundário biotinilado universal foi realizada por 1 hora, seguida da incubação pela estreptavidina conjugada com peroxidase da raiz forte - HRP (DAKO - Carpinteria, CA, EUA) por mais uma hora.

Para a revelação foi empregando o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB-Substrate e DAB-Chromogen, DAKO - Carpinteria, CA, EUA). Para a contracoloração, apenas as lâminas com a marcação anti-TRAP foram imersas em hematoxilina de Harris por 5 minutos e lavadas em água para remoção do excesso de corante.

Para montagem, as lâminas passaram novamente por uma sequência crescente de álcoois, foram diafanizadas em uma sequência de xilol, recobertas pelo meio de montagem (Permount®, Fisher Scientific Company LLC.) e protegidas com lamínulas de vidro (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais).

Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

## **2.12 Análise dos resultados**

### **2.12.1 Análise do estado geral de saúde e exame clínico intraoral**

A saúde geral dos animais foi monitorada durante todo o experimento, o peso corporal foi aferido a cada procedimento em que os animais foram submetidos a anestesia geral, no momento prévio à exodontia e instalação do implante, reabertura e instalação do cicatrizador e eutanásia. O exame clínico intraoral consistiu em uma inspeção visual detalhada da região operada nestes mesmos períodos, e os resultados dos parâmetros clínicos de reparo tecidual, níveis de inflamação e acúmulo de biofilme foram avaliados qualitativamente e o peso corporal foi analisado estatisticamente.

### **2.12.2 Análises histopatológicas, histométricas da PTO-T e PTO-NV e imunoistoquímicas para TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$ , VEGF, OCN e TRAP**

No presente estudo foram estabelecidas quatro áreas de interesse (AI), que foram denominadas AI1, AI2, AI3 e AI4, as quais estão discriminadas na Figura 2d.

A análise histopatológica foi realizada qualitativamente, na região que compreendia a AI1, a qual contemplou todos os tecidos peri-implantares, em toda a extensão do implante. Foram avaliados nas lâminas histológicas os seguintes parâmetros: natureza e intensidade da resposta inflamatória local; extensão do processo inflamatório; padrão de celularidade e estruturação dos tecidos peri-implantares moles; padrão de celularidade e estruturação dos tecidos peri-implantares duros.

Para a análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e da porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) as lâminas histológicas coradas com HE foram capturadas utilizando-se um sistema composto por um microscópio de luz (Axio Scope®, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen/NI, ALE) com câmera digital acoplada (AxioCam® MRc5, Carl Zeiss Microscopy GmbH), conectados a um

computador. Tal análise foi efetuada na AI2, a qual compreendia dois retângulos, cada um com 696 $\mu$ m x 262 $\mu$ m. O lado maior de tais retângulos acompanhava o longo eixo do implante. Um dos retângulos ficava situado nas quatro roscas centrais do implante em sua porção ântero-superior, enquanto o outro retângulo ficava situado nas quatro roscas centrais do implante em sua porção pósterio-inferior. Tais retângulos foram posicionados de modo que o terço proximal aos implantes, no lado menor dos retângulos, incluía as roscas do implante até a sua base, enquanto os outros dois terços distais ao implante destes retângulos englobava o tecido peri-implantar presente nesta região.

Nas fotomicrografias que compunham a AI2 empregou-se o programa ImageJ® (versão 1.51i; National Institutes of Health, Bethesda/MD, EUA) para se mensurar a PTO-T e a PTO-NV, com o auxílio da ferramenta *Polygon selections*. Para PTO-T a AI2 equivalia a área total, a qual foi definida como 100%. A PTO-T consistiu na porcentagem da área total ocupada por tecido ósseo dentro da AI2.

Para a análise de PTO-NV a PTO-T previamente analisada, a qual equivalia a área total ocupada por tecido ósseo dentro da AI2, foi definida como 100%. A PTO-NV consistiu na porcentagem de tecido ósseo não vital dentro da PTO-T, caracterizado pela presença de lacunas contíguas sem a presença de osteócitos ou contendo apenas remanescentes de tais células.

A PTO-T e PTO-NV foram expressas sob a forma de média da porcentagem  $\pm$  desvio padrão em cada um dos grupos experimentais.

A análise da imunomarcacão para TRAP foi efetuada na AI3, a qual compreendia dois retângulos, cada um com 348 $\mu$ m x 262 $\mu$ m. O lado maior de tais retângulos acompanhava o longo eixo do implante. Um dos retângulos ficava situado no tecido ósseo peri-implantar localizado na porção ântero-superior do implante, enquanto o outro retângulo ficava situado no tecido ósseo peri-implantar localizado na porção pósterio-inferior do implante. Tais retângulos eram posicionados no centro do processo alveolar, e tinham como limite coronário a crista óssea alveolar, a partir da qual se estendia apicalmente por 348 $\mu$ m. Empregou-se as fotomicrografias e o programa ImageJ® (versão 1.51i; National Institutes of Health, Bethesda/MD, EUA) e as células multinucleadas TRAP-positivas foram quantificadas e expressas como quantidade de células por mm<sup>2</sup> de tecido ósseo  $\pm$  desvio padrão.

A análise da imunomarcagem para TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$  e VEGF foi efetuada na AI4, a qual compreendia dois retângulos, cada um com 348 $\mu$ m x 262 $\mu$ m. O lado maior de tais retângulos acompanhava o longo eixo do implante. Um dos retângulos ficava situado no tecido conjuntivo peri-implantar supra-alveolar localizado na porção ântero-superior do implante, enquanto o outro retângulo ficava situado no tecido conjuntivo peri-implantar supra-alveolar localizado na porção pósterio-inferior do implante.

A análise da imunomarcagem para OCN foi efetuada na AI2, a qual foi descrita anteriormente.

Para a mensuração da imunomarcagem de TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$ , VEGF e OCN empregou as fotomicrografias e o programa ImageJ® (versão 1.51i; National Institutes of Health, Bethesda/MD, EUA). Com o auxílio da ferramenta *Polygon selections* foi demarcada a densidade de imunomarcagem na área de interesse, a qual foi expressa em unidade arbitrária de densidade de marcação na área como média  $\pm$  desvio padrão.

Nos grupos experimentais onde havia perda óssea peri-implantar e migração apical dos tecidos moles peri-implantares, as AI também migravam em sentido apical.

### **2.12.3 Análise estatística**

A análise estatística dos dados quantitativos foi realizada com o auxílio do software BioEstat 5.3® (Instituto de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, Tefé/AM, BRA). O teste estatístico de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificação da normalidade e distribuição dos dados, posteriormente, foi utilizado o Teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. Foi adotado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **3 RESULTADOS**

### **3.1 Análise do estado geral de saúde e exame clínico intraoral**

Do total de animais que iniciaram o experimento com a exodontia do incisivo superior direito e instalação imediata do implante (n=60), Trinta (50%) tiveram o implante osseointegrado após o período (8 semanas) de cicatrização dos implantes. Dois espécimes foram utilizados para as análises microtomográficas, e 28 animais foram efetivamente incluídos no estudo após a aferição clínica de estabilidade secundária no momento da reabertura dos implantes.

De maneira geral, os animais incluídos neste estudo apresentaram boas condições de saúde geral, as quais se mantiveram estáveis durante todo o período experimental, tolerando bem os procedimentos cirúrgicos empregados e o protocolo medicamentoso com veículo ou zoledronato.

No que se refere ao peso corporal, em uma análise individual, todos os animais apresentaram maior peso corporal no início do experimento, previamente a instalação do implante, quando comparado ao dia da reabertura, contudo, foi constatada uma boa adaptação ao procedimento cirúrgico e à dieta moída com o ganho de peso ao longo do experimento. Tanto na análise intragrupo quanto na análise intergrupos não houve diferenças estatísticas no peso corporal entre o período inicial, reabertura do implante, e eutanásia dos animais.

Ao exame clínico intraoral e inspeção visual, para parâmetros como eritema, edema e sangramento, não foi possível constatar grandes diferenças clínicas entre os animais do grupo VEI e ZOL ao longo de todo o experimento. Os implantes se apresentavam estáveis e os tecidos moles totalmente reparados, no entanto, o grupo ZOL apresentava eritema ao redor dos implantes um pouco mais acentuada que no grupo VEI.

Os animais dos grupos VEI-PIE e ZOL-PIE apresentaram um grande acúmulo de biofilme ao redor do fio de algodão no momento da coleta das amostras, sendo possível constatar edema, eritema e sangramento ao redor dos implantes, os quais foram mais exacerbados em ZOL-PIE.

A indução da PIE com o fio de algodão nos grupos VEI-PIE e ZOL-PIE não ocasionou a perda da estabilidade do implante em nenhum espécime. Ao exame clínico não se observou lesões semelhantes à ONMM-IO (com exposição de tecido ósseo) estabelecidas em nenhum dos animais dos grupos ZOL e ZOL-PIE.

### **3.2 Aspectos histopatológicos dos tecidos peri-implantares**

Em VEI observou-se um tecido conjuntivo denso não modelado ao redor dos implantes, o qual se mostrou com grande quantidade de fibroblastos, muito vascularizado e com raras células inflamatórias. Neste grupo não se constatou perda óssea peri-implantar e nem reabsorção óssea ativa nas adjacências da crista óssea alveolar. O tecido ósseo ao redor do implante se mostrou com a estrutura e com o padrão de celularidade preservados.

Em ZOL observou-se uma concentração de células inflamatórias no tecido conjuntivo peri-implantar, principalmente células mononucleadas. Neste grupo não se constatou perda óssea peri-implantar. A quantidade de tecido ósseo ao redor do implante se mostrou similar ao grupo VEI, no entanto, a quantidade de tecido ósseo não vital era nitidamente maior.

No grupo VEI-PIE constatou-se no tecido conjuntivo situado ao redor do implante um infiltrado inflamatório, composto predominantemente por células mononucleadas. Neste grupo observou-se perda óssea alveolar, a qual atingiu o terço cervical do implante. Tal perda óssea ainda se mostrava ativa em função da presença de osteoclastos em franco processo de reabsorção óssea nas adjacências da crista óssea alveolar. Poucas eram as áreas de tecido ósseo não vital ao redor do implante.

O grupo ZOL-PIE apresentou intenso infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo peri-implantar, com predominância de células mononucleadas. A inflamação peri-implantar se mostrou muito mais exacerbada em ZOL-PIE quando comparada com os demais grupos. Foi observada uma discreta perda óssea alveolar peri-implantar, a qual ficou confinada a metade do terço cervical do implante. Alguns osteoclastos, grandes, arredondados, hipernucleados, foram observados nas adjacências da crista óssea alveolar, todavia, a maioria deles

distante da matriz óssea, uma característica morfológica de inatividade. A maioria dos espécimes deste grupo apresenta comprometimento da vitalidade do tecido ósseo ao redor dos implantes. A dimensão de tais áreas de tecido ósseo não vital variou entre os espécimes deste grupo.

### **3.3 PTO-T e PTO-NV ao redor dos implantes**

A PTO-T e a PTO-NV nos diferentes grupos experimentais estão apresentadas na Fig.4, e na forma de gráficos na Fig.4a e Fig.4f respectivamente.

O grupo VEI-PIE apresentou uma menor quantidade de PTO-T quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na PTO-T entre os grupos VEI, ZOL e ZOL-PIE.

Em relação a PTO-NV, não foi observada diferenças estatisticamente significantes quando comparados os grupos VEI e VEI-PIE. O grupo ZOL apresentou uma maior PTO-NV quando comparado aos grupos VEI e VEI-PIE ( $p < 0,05$ ). A PTO-NV em ZOL-PIE foi maior que nos demais grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

### **3.4 TRAP nos tecidos peri-implantares**

A quantidade de células TRAP-positivas nos diferentes grupos experimentais está apresentada no Fig.5, e em forma de gráfico na Fig.5a.

VEI-PIE apresentou maior quantidade de células TRAP-positivas em comparação com os demais grupos experimentais ( $p < 0,05$ ). Em ZOL e ZOL-PIE a quantidade células TRAP-positivas foi menor que nos grupos tratados com o veículo (VEI e VEI-PIE) ( $p < 0,05$ ).

### **3.5 TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , VEGF e OCN nos tecidos peri-implantares**

A densidade de imunomarcação para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nos diferentes grupos experimentais está apresentada na Fig.6, e na forma de gráficos na Fig.6a e Fig.6f respectivamente.

VEI-PIE e ZOL apresentaram maior densidade de imunomarcacão tanto para TNF $\alpha$  quanto para IL-1 $\beta$  quando comparados com VEI ( $p < 0,05$ ). A densidade de imunomarcacão tanto para TNF $\alpha$  quanto para IL-1 $\beta$  em ZOL-PIE foi maior que nos demais grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

A densidade de imunomarcacão para VEGF e OCN nos diferentes grupos experimentais está apresentada na Fig.7, e na forma de gráficos na Fig.7a e Fig.7f respectivamente.

Em relao a VEGF, VEI-PIE apresentou uma maior densidade de imunomarcacão quando comparado com os demais grupos experimentais ( $p < 0,05$ ). A densidade de imunomarcacão para VEGF no grupo ZOL foi menor que quando compara ao grupo VEI ( $p < 0,05$ ).

Em relao a densidade de imunomarcacão para OCN, o grupo VEI apresentou uma maior densidade de imunomarcacão quando comparado com os demais grupos experimentais ( $p < 0,05$ ). A densidade de imunomarcacão para OCN nos grupos ZOL e ZOL-PIE foi menor que no grupo VEI-PIE ( $p < 0,05$ ).

## 4 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou alterações ao nível celular e tecidual ao redor de IO osseointegrados, com o intuito de responder se a presença do implante poderia se constituir em um fator de risco para a ONMM durante um tratamento com alta dosagem de zoledronato em um modelo experimental com ratas senescentes. Além disso, foi investigado também se a PIE seria capaz de gerar alterações ao nível celular e tecidual nas adjacências do IO já osseointegrado que poderiam se constituir em um fator de risco agravante para a ONMM ao longo de um tratamento com alta dosagem de zoledronato.

Os modelos experimentais de ONMM em animais têm ajudado muito a compreender sua etiopatogenia e no desenvolvimento de abordagens terapêuticas preventivas (Jang et al., 2015; Silva et al., 2015; Kolpakova et al., 2017; Ervolino et al., 2019; Toro et al., 2019). Acreditamos que não seja diferente em se tratando da PI, estudos experimentais vêm utilizando-se de injeção de bactérias (Koutouzis et al., 2017; Sun et al., 2020), lipopolissacarídeos (LPS) (Takamori et al., 2017; He et al., 2021) e ligaduras (Wong et al., 2017; Yu et al., 2018; Yue et al., 2020; Hori et al., 2021) para o desenvolvimento da PIE. No entanto, com relação a ONMM-IO alguns desafios metodológicos tiveram que ser vencidos no presente estudo. Poucos são os modelos experimentais em animais, principalmente em ratos, que instalam IO na cavidade bucal de tais animais. Os modelos experimentais existentes são predominantemente na maxila, na maioria das vezes, no sítio de extração do primeiro molar superior (Koutouzis et al., 2017; Takamori et al., 2017; Wong et al., 2017, He et al., 2021) ou no espaço edêntulo anterior aos molares (Yue et al., 2020; Sun et al., 2020), o que implica na utilização de um implante bastante curto, para que não haja envolvimento do seio maxilar (Bigueti et al., 2018). O emprego de um implante muito curto, como o empregado na maior parte dos estudos, ao ser associado com a ligadura, a qual promove um acúmulo de biofilme, e induz a PIE, poderia gerar um nível de perda óssea capaz de provocar a perda do implante em um curto espaço de tempo. Caso o intervalo de tempo de progressão da PIE fosse muito reduzido, poderia não haver tempo suficiente para se verificar uma resposta adaptativa ao nível celular e tecidual ao redor do IO.

Levando-se em consideração o exposto acima, foi empregado neste estudo um modelo experimental estabelecido por nosso grupo de pesquisa. Diante disso, propusemos um modelo, onde IO com 5,7 mm de comprimento e 2,5 mm de diâmetro, ou seja, implantes relativamente longos, comparados com empregados em outros estudos, foram instalados, de imediato, no sítio de extração do incisivo superior direito. Após o período de osseointegração, a plataforma do implante foi exposta e conectado a ele um cicatrizador transmucoso, o qual, no grupo VEI-PIE e ZOL-PIE, também se constituiu no local onde foi instalada a ligadura, que permaneceu por um período de cinco semanas, ou seja, um tempo relativamente longo, onde as respostas celulares e teciduais frente a PIE e suas consequências para os IO poderiam ser evidenciadas.

Um outro ponto importante que foi levado em consideração em nosso modelo experimental foi o seu delineamento baseado em dados epidemiológicos sobre a doença, ou seja, buscamos mimetizar as principais condições e fatores de risco relacionados com a ONMM. Neste modelo experimental foram empregadas ratas senescentes, as quais concluíram o estudo com aproximadamente 20 meses de idade, tendo em vista que a ONMM acomete mais frequentemente mulheres com idade avançada (Otto, et al., 2011; Fliefel et al., 2015; Khan et al., 2017, McGowan et al., 2018), sendo a idade um fator agravante também associado ao desenvolvimento da peri-implantite (Mameno et al., 2019). A droga antirreabsortiva utilizada foi o zoledronato, na dosagem oncológica, uma vez que grande parte dos casos de ONMM-IO (Shirota et al., 2009; Junqueira et al., 2011; Favia et al., 2015; Giovannacci et al., 2016; Matsuo et al., 2016; Bennardo et al., 2020) está relacionada com este bisfosfonato, o qual frequentemente é empregado para complementação da terapia oncológica. Além de explorar o que a presença do implante ocasiona nos tecidos periimplantares, também utilizamos um fator local agravante, que foi a PIE, uma vez que vários estudos apontam para uma forte correlação entre PI e a ocorrência da ONMM-IO (Kwon et al., 2014; Troeltzsch et al., 2016; Pichardo et al., 2020; Seki et al., 2021; Tempesta et al., 2021).

Os bisfosfonatos nitrogenados, como o zoledronato, inibem a enzima farnesil difosfato sintase, enzima chave da via do mevalonato. A interrupção desta via, impede a formação de farnesil difosfato e geranilgeranil difosfato, os quais são essenciais para prenilação de pequenas GTPases, dentre as quais estão Ras, Rho e

Rac, fundamentais para diversos processos celulares dos osteoclastos, como rearranjo do citoesqueleto, alterações morfológicas de membrana, essenciais para a reabsorção óssea, tráfego de vesículas e inibição da apoptose (Rogers et al., 2011). No presente estudo, constatamos que o zoledronato exerceu seus efeitos sobre os osteoclastos, tendo em vista que a quantidade de células TRAP-positivas nos grupos ZOL e ZOL-PIE foi menor que os grupos tratados com o veículo. Inclusive no grupo ZOL-PIE, mesmo a presença da peri-implantite não foi capaz de elevar significativamente a quantidade de células TRAP-positivas, e o reflexo disso foi a pequena perda óssea peri-implantar neste grupo, como mostrado pela avaliação histopatológica. Um outro aspecto importante observado em ZOL e ZOL-PIE foram as características morfológicas do osteoclasto, os quais se mostravam grandes, arredondadas, hipernucleadas e geralmente distantes da matriz óssea. No grupo VEI observou-se uma pequena quantidade de células TRAP-positivas, provavelmente, osteoclastos relacionados com a remodelação óssea local. Ao passo que em VEI-PIE uma grande quantidade de células TRAP-positivas foram observadas, as quais exibiam aspecto morfológico de atividade, inclusive comprovando que a perda óssea peri-implantar, constatada na análise histológica, estava ainda ativa, caracterizando a PIE.

Kwon et al., 2014, descreveram três diferentes aspectos da ONMM-IO em humanos: (1) “Congelado” (“Frozen type”), uma extensa área de osso necrótico, com lacunas desprovidas de osteócitos, e bordas ósseas com diferentes graus de células inflamatórias; (2) “Osteolítica” (“osteolytic type”), semelhante a uma osteomielite convencional, com fragmentos ósseos necróticos cercados por uma densa camada de células inflamatórias e colônias bacterianas; e (3) “Em bloco” (“en block type”), com um sequestro ósseo envolvendo o implante, com lacunas vazias de osteócitos, infiltrado inflamatório e colonização de microorganismos nas cavidades ósseas, porém mantendo-se o contato entre osso e implante. Estes três tipos podem coexistir em uma mesma lesão, dependendo do grau de destruição óssea, e da gravidade da infecção (Kwon et al., 2014).

Fazendo uma correlação com o estudo de Kwon et al., 2014, e extrapolando nossos resultados experimentais, constatamos que a maior parte dos espécimes do grupo ZOL-PIE, se enquadram no tipo 1, congelado. Todavia, deve ser levado em consideração que os critérios por nós adotados para tal classificação levaram em

consideração os aspectos histológicos dos tecidos peri-implantares, tendo em vista que clinicamente não foi possível constatar lesões com aspectos semelhantes a ONMM-IO que é observada em humanos, com exposição de tecido ósseo, o que consideramos que possa ser uma característica do modelo experimental em ratos.

Dentre os parâmetros avaliados no presente estudo, dois deles são de fundamental importância por caracterizar as lesões semelhantes a ONMM-IO, o nível de inflamação tecidual e a PTO-NV. No presente estudo constatamos, via análise histopatológica e imunoistoquímica para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que existe um nível de inflamação ao redor de implante no grupo ZOL, a qual é exacerbada pela presença da ligadura, no grupo ZOL-PIE. Além disso, tanto a análise histopatológica quanto a análise histométrica da PTO-NV, mostram quantidade elevada de tecido ósseo não vital ao redor do implante em ZOL, o que é grandemente elevado na presença da PIE, em ZOL-PIE. Acreditamos que haja uma forte relação entre o nível de inflamação e o aumento da quantidade de tecido ósseo não vital. Além disso, supomos que a lesão semelhante a ONMM-IO se manifeste histologicamente, ou até mesmo clinicamente, na dependência da quantidade de tecido ósseo não vital presente.

O aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-18 e IL-6 está fortemente associado com a ocorrência de ONMM em modelos experimentais (de Barros Silva et al., 2016; Morita et al., 2017; Funayama et al., 2019; Soma et al., 2021). Morita et al. (2017) demonstraram que camundongos nocaute para TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha/\beta$  e IL-6 são resistentes ao surgimento de lesões semelhantes à ONMM mesmo com a administração de alta dosagem de bisfosfonatos. Medicamentos como o Etanercepte, um inibidor de TNF $\alpha$ , e anticorpos neutralizantes para IL-6, tem sido sugerido como potenciais medicamentos capazes de prevenir a ONMM em ratos tratados com zoledronato e que se submeteram a exodontia concomitantemente (Soma et al., 2021).

Os elevados níveis de inflamação local e sistêmica associados com a inibição da atividade osteoclástica induzida pelo zoledronato estimula a conversão de células precursoras de osteoclastos em macrófagos, os quais secretam ainda mais citocinas inflamatórias, gerando a denominada “*tempestade inflamatória*” (Morita, et al., 2017; Soma et al., 2021). O zoledronato tem sido apontado como um importante

modulador fenotípico de macrófagos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Zhu et al., 2019), aumentando a polarização dos macrófagos M1, ativados por receptores do tipo Toll Like receptors 4 (TLR-4), e conseqüentemente, desencadeando o fator de transcrição pró-inflamatório NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa beta), e suprimindo a polarização de macrófagos M2 (ligados a eventos anti-inflamatórios) (Zhang et al., 2021).

Ao nível ósseo, a associação destes eventos inflamatórios ultrapassa o limiar de adaptação fisiológica dos osteócitos, levando a eventos de morte celular (apoptose, autofagia, necroptose ou necrose). A sinalização TNF- $\alpha$ /TNFR1 vem sendo fortemente associada a ativação da necroptose de osteócitos, um tipo de morte celular programada, mas que acarreta o rompimento da membrana celular e o extravasamento de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) na matriz extracelular. A presença de padrões celulares ligados a antígenos (PAMPs), lipopolissacarídeos (LPS), DNAs danificado, entre outras moléculas ativam ligantes como Toll Like receptors 2/4 (TLR 2/4) que também desencadeiam a necroptose de osteócitos e acarretam eventos inflamatórios secundários, aumentando ainda mais o quadro inflamatório, uma vez que, essas células estão aprisionadas em lacunas na matriz óssea, impossibilitando a ação imediata das células clásticas (Aguirre et al., 2021).

Um aspecto que também deve ser considerado no presente estudo são os efeitos do zoledronato sobre os osteoblastos. Em ZOL e ZOL-PIE constatou-se menor imunomarcção para OCN, quando comparado com os demais grupos, o que pode ter ocorrido devido a efeitos citotóxicos do zoledronato sobre células da linhagem osteoblástica. Huang et al., 2016 demonstraram efeitos inibitórios dose-dependente para a expressão de colágeno tipo I, fosfatase alcalina e OCN para osteoblastos tratados com zoledronato *in vitro*, além de uma diminuição da diferenciação de células precursoras por redução da expressão de proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2). O zoledronato também foi capaz de reduzir significativamente a diferenciação de células tronco derivadas do tecido adiposo em osteoblastos (Qu et al., 2020). Efeitos citotóxicos ligados a alterações na proliferação, maturação e expressão de proteínas de células da linhagem osteoblástica também já foram apontadas por outros estudos com o uso do zoledronato (Fromigué et al., 2002; Basso et al., 2013).

Um outro aspecto local que seria capaz de contribuir negativamente é a ação antiangiogênica do zoledronato, comprovado no presente estudo pelos níveis baixos de VEGF nos grupos ZOL e ZOL-PE. Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa demonstrou que animais que se submeteram a exodontia durante um tratamento sistêmico com zoledronato tiveram menor imunomarcção para VEGF quando comparado a animais controle (Toro et al., 2019). Wehrhan et al. (2011) em um estudo com 20 pacientes com ONMM, que tomaram zoledronato ou pamidronato, demonstraram uma redução na angiogênese e neoformação de vasos no tecido mucoperiosteal.

Embora o presente estudo não tenha focado sua atenção na microbiota, devemos levar em consideração que o tratamento com zoledronato resulta em alterações na microbiota bucal (Pushalkar et al., 2014). Bactérias periodontopatógenas, também presentes na peri-implantite, como *Porphyromonas ssp.*, *Treponema ssp.* e *Magibacterium ssp.* causam um aumento dos efeitos pró-inflamatórios, mediados por citocinas como IL8, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , ou seja, potencializando ainda mais efeitos descritos anteriormente (Li et al., 2020). Um outro aspecto que deve ser levado em consideração para o desenvolvimento da ONMM-IO é o estresse biomecânico, causado pela função da reabilitação implanto suportada, o que leva a microdanos, principalmente no tecido ósseo, o qual está sob forte inibição da reabsorção óssea pelo uso da droga antirreabsortiva, o acúmulo desses microdanos no tecido ósseo e a ausência de “*turnover*” ou de remodelação óssea potencializa ainda mais os efeitos negativos sobre os tecidos peri-implantares (Kwon et al., 2014).

A ONMM compromete consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes, especialmente daqueles que estão sob tratamento concomitante para doenças que já são muito debilitantes, como o câncer. O seu tratamento pode ser longo, o prognóstico é duvidoso e pode resultar em graves sequelas. Em se tratando da ONMM-IO além de ocorrer a perda do implante, também pode haver o comprometimento de dentes ou implantes vizinhos. A remoção do implante e do tecido ósseo necrótico pode não conter o avanço da necrose óssea, o que pode ocasionar extensas perdas na maxila ou na mandíbula, o que inclusive pode dificultar, ou até mesmo impossibilitar a reabilitação, resultando em mais

consequências negativas na qualidade de vida do paciente. As estratégias preventivas são as ideais em se tratando da ONMM, inclusive a ONMM-IO. Acreditamos que o acompanhamento dos pacientes com implantes e sob tratamento, ou até mesmo após o tratamento com drogas antirreabsortivas, seja de fundamental importância. Neste caso é imprescindível que ocorram visitas regulares ao cirurgião dentista para instrução e avaliação de higiene, assim como, terapias de manutenção para a prevenção da peri-implante. Estudos clínicos controlados e randomizados, propondo e avaliando protocolos a serem empregados em pacientes com implantes e que estão, ou estiveram sob tratamento com drogas com ação antirreabsortiva ainda não foram realizados e são extremamente necessários.

## **5 CONCLUSÃO**

Conclui-se que o tratamento com altas doses de zoledronato ocasiona alterações ao nível peri-implantar, dentre elas, um aumento da inflamação local, e da PTO-NV ao redor do implante osseointegrado, o que pode representar um possível fator de risco para o surgimento da ONMM-IO. Na presença da PIE há uma exacerbação da inflamação e um aumento ainda maior da PTO-NV, o que implica em um importante fator de risco agravante para o surgimento da ONMM-IO no modelo experimental estudado.

### **Conflito de interesse**

Nenhum dos autores tem potenciais conflitos de interesse a declarar.

### **Financiamento**

Agradecemos a Dentfix (Allied Titanium Eireli, Santa Rita do Passa Quatro, SP, Brasil) pela concessão dos implantes e dos cicatrizadores. Agradecemos a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” pela utilização do Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia (MUBIO) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FINEP/CT-INFRA – Convênio FINEP: 01.12.0530.00-PROINFRA 01/2011). Agradecemos o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2019/17769-1), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Processo 308075/2020-0) e o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

## REFERÊNCIAS

- Aghaloo, T., Hazboun, R., Tetradis, S. (2015). Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaws. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, **27**(4), 489-96.  
<https://doi.org/10.1016/j.coms.2015.06.001>
- Aguirre, J. I., Castillo, E. J., & Kimmel, D. B. (2021). Biologic and pathologic aspects of osteocytes in the setting of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). *Bone*, **153**, 116168. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116168>
- AlDhalaan, N. A., BaQais, A., & Al-Omar, A. (2020). Medication-related osteonecrosis of the jaw: a review. *Cureus*, **12**(2), e6944.  
<https://doi.org/10.7759/cureus.6944>
- Basso, F.G., Silveira Turrioni, A.P., Hebling, J., de Souza Costa, C.A. (2013). Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology*. 2013;59(6):534-41.  
<https://doi.org/10.1159/000351194>
- Bennardo, F., Buffone, C., Muraca, D., Antonelli, A., & Giudice, A. (2020). Medication-related osteonecrosis of the jaw with spontaneous hemimaxilla exfoliation: report of a case in metastatic renal cancer patient under multidrug therapy. *Case Reports in Medicine*, **2020**, 8093293.  
<https://doi.org/10.1155/2020/8093293>
- Biguetti, C. C., Cavalla, F., Silveira, E. M., Fonseca, A. C., Vieira, A. E., Tabanez, A. P., Rodrigues, D. C., Trombone, A., & Garlet, G. P. (2018). Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization. *Journal of Applied Oral Science*, **26**, e20170601. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0601>
- de Barros Silva, P. G., de Oliveira, C. C., Brizeno, L., Wong, D., Lima Júnior, R., Gonçalves, R. P., Sousa, F. B., Mota, M., de Albuquerque Ribeiro, R., & Alves, A. (2016). Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Diseases*, **22**(7), 649–657. <https://doi.org/10.1111/odi.12513>
- Eguia, A., Bagán-Debón, L., & Cardona, F. (2020). Review and update on drugs related to the development of osteonecrosis of the jaw. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, **25**(1), e71–e83. <https://doi.org/10.4317/medoral.23191>

Ervolino, E., Statkiewicz, C., Toro, L. F., de Mello-Neto, J. M., Cavazana, T. P., Issa, J., Dornelles, R., de Almeida, J. M., Nagata, M., Okamoto, R., Casatti, C. A., Garcia, V. G., & Theodoro, L. H. (2019). 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**, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.10.014>

Escobedo, M. F., Cobo, J. L., Junquera, S., Milla, J., Olay, S., & Junquera, L. M. (2020). Medication-related osteonecrosis of the jaw. Implant presence-triggered osteonecrosis: case series and literature review. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, **121**(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2019.04.012>

Favia, G., Tempesta, A., Limongelli, L., Crincoli, V., Piattelli, A., & Maiorano, E. (2015). Metastatic breast cancer in medication-related osteonecrosis around mandibular implants. *The American Journal of Case Reports*, **16**, 621–626. <https://doi.org/10.12659/AJCR.894162>

Fliefel, R., Tröltzsch, M., Kühnisch, J., Ehrenfeld, M., & Otto, S. (2015). Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **44**(5), 568–585. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2015.01.026>

Fromigué, O., Body, J.J. (2002). Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest*, **25**(6), 539-46. <https://doi.org/10.1007/BF03345497>

Funayama, H., Tashima, I., Okada, S., Ogawa, T., Yagi, H., Tada, H., Wakita, R., Asada, Y., & Endo, Y. (2019). Effects of zoledronate on local and systemic production of IL-1 $\beta$ , IL-18, and TNF- $\alpha$  in mice and augmentation by lipopolysaccharide. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **42**(6), 929–936. <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00923>

Giovannacci, I., Meleti, M., Manfredi, M., Mortellaro, C., Greco Lucchina, A., Bonanini, M., & Vescovi, P. (2016). Medication-related osteonecrosis of the jaw around dental implants: implant surgery-triggered or implant presence-triggered

osteonecrosis? *The Journal of Craniofacial Surgery*, **27**(3), 697–701.

<https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000002564>

Goss, A., Bartold, M., Sambrook, P., & Hawker, P. (2010). The nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in dental implant patients: a South Australian case series. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **68**(2), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2009.09.037>

Grant, B.T., Amenedo, C., Freeman, K., Kraut, R.A. (2008). Outcomes of placing dental implants in patients taking oral bisphosphonates: a review of 115 cases. *J Oral Maxillofac Surg* **66**(2), 223-30. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2007.09.019>

Hallmer, F., Andersson, G., Götrick, B., Warfvinge, G., Anderud, J., Bjørnland, T. (2018). Prevalence, initiating factor, and treatment outcome of medication-related osteonecrosis of the jaw—a 4-year prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, **126**(6), 477-485. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.08.015>.

Hayashida, S., Soutome, S., Yanamoto, S., Fujita, S., Hasegawa, T., Komori, T., Kojima, Y., Miyamoto, H., Shibuya, Y., Ueda, N., Kirita, T., Nakahara, H., Shinohara, M., Umeda, M. (2017). Evaluation of the Treatment Strategies for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws (MRONJ) and the Factors Affecting Treatment Outcome: A Multicenter Retrospective Study with Propensity Score Matching Analysis. *J Bone Miner Res*, **32**(10), 2022-2029. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3191>

He, L., Sun, X., Liu, Z., Qiu, Y., & Niu, Y. (2020). Pathogenesis and multidisciplinary management of medication-related osteonecrosis of the jaw. *International Journal of Oral Science*, **12**(1), 30. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-00093-2>

He, Q., Mu, Z., Shrestha, A., Wang, C., Wang, S., Tang, H., Li, Y., Song, J., Ji, P., Huang, Y., & Chen, T. (2021). Development of a rat model for type 2 diabetes mellitus peri-implantitis: a preliminary study. *Oral Diseases*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/odi.13845>

Holzinger, D., Seemann, R., Matoni, N., Ewers, R., Millesi, W., & Wutzl, A. (2014). Effect of dental implants on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **72**(10), 1937.e1–1937.e19378. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2014.04.037>

Hori, Y., Kondo, Y., Nodai, T., Masaki, C., Ono, K., & Hosokawa, R. (2021).

Xerostomia aggravates ligation-induced peri-implantitis: a preclinical in vivo study.

*Clinical Oral Implants Research*, **32**(5), 581–589. <https://doi.org/10.1111/clr.13727>

Huang, X., Huang, S., Guo, F., Xu, F., Cheng, P., Ye, Y., Dong, Y., Xiang, W., Chen, A. (2016). Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. *Mol Med Rep*, **13**(1), 613-22.

<https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4627>

Jang, H.W., Kim, J.W., Cha, I.H. (2015). Development of animal model for

Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Maxillofac Plast*

*Reconstr Surg*, **37**(1):18. <https://doi.org/10.1186/s40902-015-0020-6>

Junquera, L., Gallego, L., Pelaz, A. (2011). Multiple myeloma and bisphosphonate-related osteonecrosis of the mandible associated with dental implants. *Case Rep Dent*, **2011**: 568246.

<https://doi.org/10.1155/2011/568246>

Kawahara, M., Kuroshima, S., Sawase, T. (2021). Clinical considerations for

medication-related osteonecrosis of the jaw: a comprehensive literature review. *Int J Implant Dent*, **14**;7(1):47.

<https://doi.org/10.1186/s40729-021-00323-0>

Khan, A.A., Morrison, A., Kendler, D.L., Rizzoli, R., Hanley, D.A., Felsenberg, D., McCauley, L.K., O’Ryan, F., Reid, I.R., Ruggiero, S.L., Taguchi, A., Tetradis, S., Watts, N.B., Brandi, M.L., Peters, E., Guise, T., Eastell, R., Cheung, A.M., Morin, S.N., Masri, B., Cooper, C., Morgan, S.L., Obermayer-Pietsch, B., Langdahl, B.L., Dabagh, R.A., Davison, K.S., Sándor, G.K., Josse, R.G., Bhandari, M., El Rabbany, M., Pierroz, D.D., Sulimani, R., Saunders, D.P., Brown, J.P., Compston, J. (2017).

International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw. Case-Based Review of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and Application of the International

Recommendations for Management From the International Task Force on ONJ. *J Clin Densitom*, **20**(1), 8-24.

<https://doi.org/10.1016/j.jocd.2016.09.005>

Khan, A.A., Morrison, A., Hanley, D.A., Felsenberg, D., McCauley, L.K., O’Ryan, F., Reid, I.R., Ruggiero, S.L., Taguchi, A., Tetradis, S., Watts, N.B., Brandi, M.L., Peters, E., Guise, T., Eastell, R., Cheung, A.M., Morin, S.N., Masri, B., Cooper, C., Morgan, S.L., Obermayer-Pietsch, B., Langdahl, B.L., Al Dabagh, R., Davison, K.S., Kendler, D.L., Sándor, G.K., Josse, R.G., Bhandari, M., El Rabbany, M., Pierroz, D.D.,

- Sulimani, R., Saunders, D.P., Brown, J.P., Compston, J. (2015). International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res*, **30**(1), 3-23. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2405>
- Kolpakova, M.E., Zubareva, A.A., Artamonova, T.D., Lisovskaya, E.K., Chefu, S.G., Yagmurov, O.D., Yaremenko, A.I., Vlasov, T.D. (2017). Experimental model of osteonecrosis of the jaw in rats treated with zoledronic acid. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **55**(2), 156-159. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2016.10.006>
- Koutouzis, T., Eastman, C., Chukkapalli, S., Larjava, H., & Kesavalu, L. (2017). A novel rat model of polymicrobial peri-implantitis: a preliminary study. *Journal of Periodontology*, **88**(2), e32–e41. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160273>
- Kuroshima, S., Sasaki, M., Sawase, T. (2019). Medication-related osteonecrosis of the jaw: A literature review. *J Oral Biosci*, **61**(2):99-104. <https://doi.org/10.1016/j.job.2019.03.005>
- Kwon, T. G., Lee, C. O., Park, J. W., Choi, S. Y., Rijal, G., & Shin, H. I. (2014). Osteonecrosis associated with dental implants in patients undergoing bisphosphonate treatment. *Clinical Oral Implants Research*, **25**(5), 632–640. <https://doi.org/10.1111/clr.12088>
- Lang, N.P., Salvi, G.E., Sculean, A. (2019). Nonsurgical therapy for teeth and implants-When and why? *Periodontol 2000*, **79**(1), 15-21. <https://doi.org/10.1111/prd.12240>
- Lazarovici, T. S., Yahalom, R., Taicher, S., Schwartz-Arad, D., Peleg, O., & Yarom, N. (2010). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw associated with dental implants. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **68**(4), 790–796. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2009.09.017>
- Li, Q., Pu, Y., Lu, H., Zhao, N., Wang, Y., Guo, Y., & Guo, C. (2020). *Porphyromonas*, *Treponema*, and *Mogibacterium* promote IL8/IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ -based pro-inflammation in patients with medication-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of Oral Microbiology*, **13**(1), 1851112. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1851112>

- López-Cedrún, J. L., Sanromán, J. F., García, A., Peñarrocha, M., Feijoo, J. F., Limeres, J., & Diz, P. (2013). Oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in dental implant patients: a case series. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, **51**(8), 874–879. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2013.06.011>
- Mameno, T., Wada, M., Onodera, Y., Fujita, D., Sato, H., & Ikebe, K. (2019). Longitudinal study on risk indicators for peri-implantitis using survival-time analysis. *Journal of Prosthodontic Research*, **63**(2), 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2018.12.002>
- Matsuo, A., Hamada, H., Takahashi, H., Okamoto, A., Kaise, H., & Chikazu, D. (2016). Evaluation of dental implants as a risk factor for the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in breast cancer patients. *Odontology*, **104**(3), 363–371. <https://doi.org/10.1007/s10266-015-0207-4>
- McGowan, K., McGowan, T., Ivanovski, S. (2018). Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: A systematic review. *Oral Dis*, **24**(4), 527-536. <https://doi.org/10.1111/odi.12708>
- Morita, M., Iwasaki, R., Sato, Y., Kobayashi, T., Watanabe, R., Oike, T., Nakamura, S., Keneko, Y., Miyamoto, K., Ishihara, K., Iwakura, Y., Ishii, K., Matsumoto, M., Nakamura, M., Kawana, H., Nakagawa, T., & Miyamoto T. (2017). Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following anti-resorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. *Scientific Reports*, **7**, 46322. <https://doi.org/10.1038/srep46322>
- Otto, S., Sotlar, K., Ehrenfeld, M., Pautke, C. (2011). Osteonecrosis of the jaw as a possible rare side effect of annual bisphosphonate administration for osteoporosis: A case report. *J Med Case Rep*, **23**;5:477. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-5-477>
- Otto, S., Pautke, C., Van den Wyngaert, T., Niepel, D., & Schiødt, M. (2018). Medication-related osteonecrosis of the jaw: Prevention, diagnosis and management in patients with cancer and bone metastases. *Cancer Treatment Reviews*, **69**, 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.06.007>
- Pichardo, S., van der Hee, J. G., Fiocco, M., Appelman-Dijkstra, N. M., & van Merkesteyn, J. (2020). Dental implants as risk factors for patients with medication-

related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, **58**(7), 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2020.03.022>

Pushalkar, S., Li, X., Kurago, Z., Ramanathapuram, L. V., Matsumura, S., Fleisher, K. E., Glickman, R., Yan, W., Li, Y., & Saxena, D. (2014). Oral microbiota and host innate immune response in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *International Journal of Oral Science*, **6**(4), 219–226. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.46>

Qu, X., Wang, Z., Wu, K., Wang, Y., Shan, L. (2020). Zoledronate inhibits the differentiation potential of adipose-derived stem cells into osteoblasts in repairing jaw necrosis. *Mol Cell Probes*, **51**:101525. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101525>

Rogers, M. J., Crockett, J. C., Coxon, F. P., & Mönkkönen, J. (2011). Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*, **49**(1), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.11.008>

Romandini, M., Lima, C., Pedrinaci, I., Araoz, A., Soldini, M. C., & Sanz, M. (2021). Prevalence and risk/protective indicators of peri-implant diseases: a university-representative cross-sectional study. *Clinical Oral Implants Research*, **32**(1), 112–122. <https://doi.org/10.1111/clr.13684>

Ruggiero, S.L., Dodson, T.B., Aghaloo, T., Carlson, E.R., Ward, B.B., Kademani, D. (2022). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022 Update. *J Oral Maxillofac Surg*, **80**(5), 920-943. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2022.02.008>

Schwarz, F., Derks, J., Monje, A., & Wang, H. L. (2018). Peri-implantitis. *Journal of Clinical Periodontology*, **45** Suppl 20, S246–S266. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12954>

Seki, K., Namaki, S., Kamimoto, A., & Hagiwara, Y. (2021). Medication-related osteonecrosis of the jaw subsequent to peri-implantitis: a case report and literature review. *The Journal of Oral Implantology*, **47**(6), 502–510. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-19-00385>

Sgolastra, F., Petrucci, A., Severino, M., Gatto, R., & Monaco, A. (2015). Periodontitis, implant loss and peri-implantitis: a meta-analysis. *Clinical Oral Implants Research*, **26**(4), e8–e16. <https://doi.org/10.1111/clr.12319>

- Sher, J., Kirkham-Ali, K., Luo, J.D., Miller, C., Sharma, D. (2021). Dental Implant Placement in Patients With a History of Medications Related to Osteonecrosis of the Jaws: A Systematic Review. *J Oral Implantol*, **47**(3), 249-268.  
<https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-19-00351>
- Shirota, T., Nakamura, A., Matsui, Y., Hatori, M., Nakamura, M., & Shintani, S. (2009). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw around dental implants in the maxilla: report of a case. *Clinical Oral Implants Research*, **20**(12), 1402–1408.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01801.x>
- Silva, P. G., Ferreira Junior, A. E., Teófilo, C. R., Barbosa, M. C., Lima Júnior, R. C., Sousa, F. B., Mota, M. R., Ribeiro, R., & Alves, A. P. (2015). Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Archives of Oral Biology*, **60**(9), 1237–1245. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.015>
- Soma, T., Iwasaki, R., Sato, Y., Kobayashi, T., Nakamura, S., Kaneko, Y., Ito, E., Okada, H., Watanabe, H., Miyamoto, K., Matsumoto, M., Nakamura, M., Asoda, S., Kawana, H., Nakagawa, T., & Miyamoto, T. (2021). Tooth extraction in mice administered zoledronate increases inflammatory cytokine levels and promotes osteonecrosis of the jaw. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, **39**(3), 372–384.  
<https://doi.org/10.1007/s00774-020-01174-2>
- Sun, J., Eberhard, J., Glage, S., Held, N., Voigt, H., Schwabe, K., Winkel, A., & Stiesch, M. (2020). Development of a peri-implantitis model in the rat. *Clinical Oral Implants Research*, **31**(3), 203–214. <https://doi.org/10.1111/clr.13556>
- Takamori, Y., Atsuta, I., Nakamura, H., Sawase, T., Koyano, K., & Hara, Y. (2017). Histopathological comparison of the onset of peri-implantitis and periodontitis in rats. *Clinical Oral Implants Research*, **28**(2), 163–170. <https://doi.org/10.1111/clr.12777>
- Tempesta, A., Capodiferro, S., Mauceri, R., Lauritano, D., Maiorano, E., Favia, G., & Limongelli, L. (2021). Peri-implantitis-like medication-related osteonecrosis of the jaw: Clinical considerations and histological evaluation with confocal laser scanning microscope. *Oral Diseases*. Advance online publication.  
<https://doi.org/10.1111/odi.13873>
- Terry, L. Ng., Megan, M. Tu., Ibrahim, M.F.K., Basulaiman, B., McGee, S.F., Srikanthan, A., Fernandes, R., Vandermeer, L., Stober, C., Sienkiewicz, M., Jeong,

A., Saunders, D., Awan, A.A., Hutton, B., Clemons, M.J. (2021). Long-term impact of bone-modifying agents for the treatment of bone metastases: a systematic review. *Support Care Cancer*, **29**(2), 925-943. <https://doi.org/10.1007/s00520-020-05556-0>

Toro, L. F., de Mello-Neto, J. M., Santos, F., Ferreira, L. C., Statkiewicz, C., Cintra, L., Issa, J., Dornelles, R., de Almeida, J. M., Nagata, M., Garcia, V. G., Theodoro, L. H., Casatti, C. A., & Ervolino, E. (2019). Application of autologous platelet-rich plasma on tooth extraction site prevents occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws in rats. *Scientific Reports*, **9**(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37063-y>

Troeltzsch, M., Cagna, D., Stähler, P., Probst, F., Kaeppler, G., Troeltzsch, M., Ehrenfeld, M., & Otto, S. (2016). Clinical features of peri-implant medication-related osteonecrosis of the jaw: Is there an association to peri-implantitis? *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, **44**(12), 1945–1951. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2016.09.018>

Wan, J.T., Sheeley, D.M., Somerman, M.J., Lee, J.S. (2020). Mitigating osteonecrosis of the jaw (ONJ) through preventive dental care and understanding of risk factors. *Bone Res*, **11**, 8:14. <https://doi.org/10.1038/s41413-020-0088-1>

Wehrhan, F., Stockmann, P., Nkenke, E., Schlegel, K. A., Guentsch, A., Wehrhan, T., Neukam, F. W., & Amann, K. (2011). Differential impairment of vascularization and angiogenesis in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw-related mucoperiosteal tissue. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, **112**(2), 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.02.028>

Wick, A., Bankosegger, P., Otto, S., Hohlweg-Majert, B., Steiner, T., Probst, F., Ristow, O., Pautke, C. (2022). Risk factors associated with onset of medication-related osteonecrosis of the jaw in patients treated with denosumab. *Clin Oral Investig*, **26**(3), 2839-2852. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04261-4>

Wong, R. L., Hiyari, S., Yaghsejian, A., Davar, M., Lin, Y. L., Galvan, M., Tetradis, S., Camargo, P. M., & Pirih, F. Q. (2017). Comparing the healing potential of late-stage periodontitis and peri-implantitis. *The Journal of Oral Implantology*, **43**(6), 437–445. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-17-00157>

Yu, X., Hu, Y., Freire, M., Yu, P., Kawai, T., & Han, X. (2018). Role of toll-like receptor 2 in inflammation and alveolar bone loss in experimental peri-implantitis

versus periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, **53**(1), 98–106.

<https://doi.org/10.1111/jre.12492>

Yue, G., Edani, H., Sullivan, A., Jiang, S., Kazerani, H., & Saghiri, M. A. (2020). Is maxillary diastema an appropriate site for implantation in rats? *International Journal of Implant Dentistry*, **6**(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40729-019-0203-5>

Zhang, W., Gao, L., Ren, W., Li, S., Zheng, J., Li, S., Jiang, C., Yang, S., & Zhi, K. (2021). The role of the immune response in the development of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Frontiers in Immunology*, **12**, 606043.

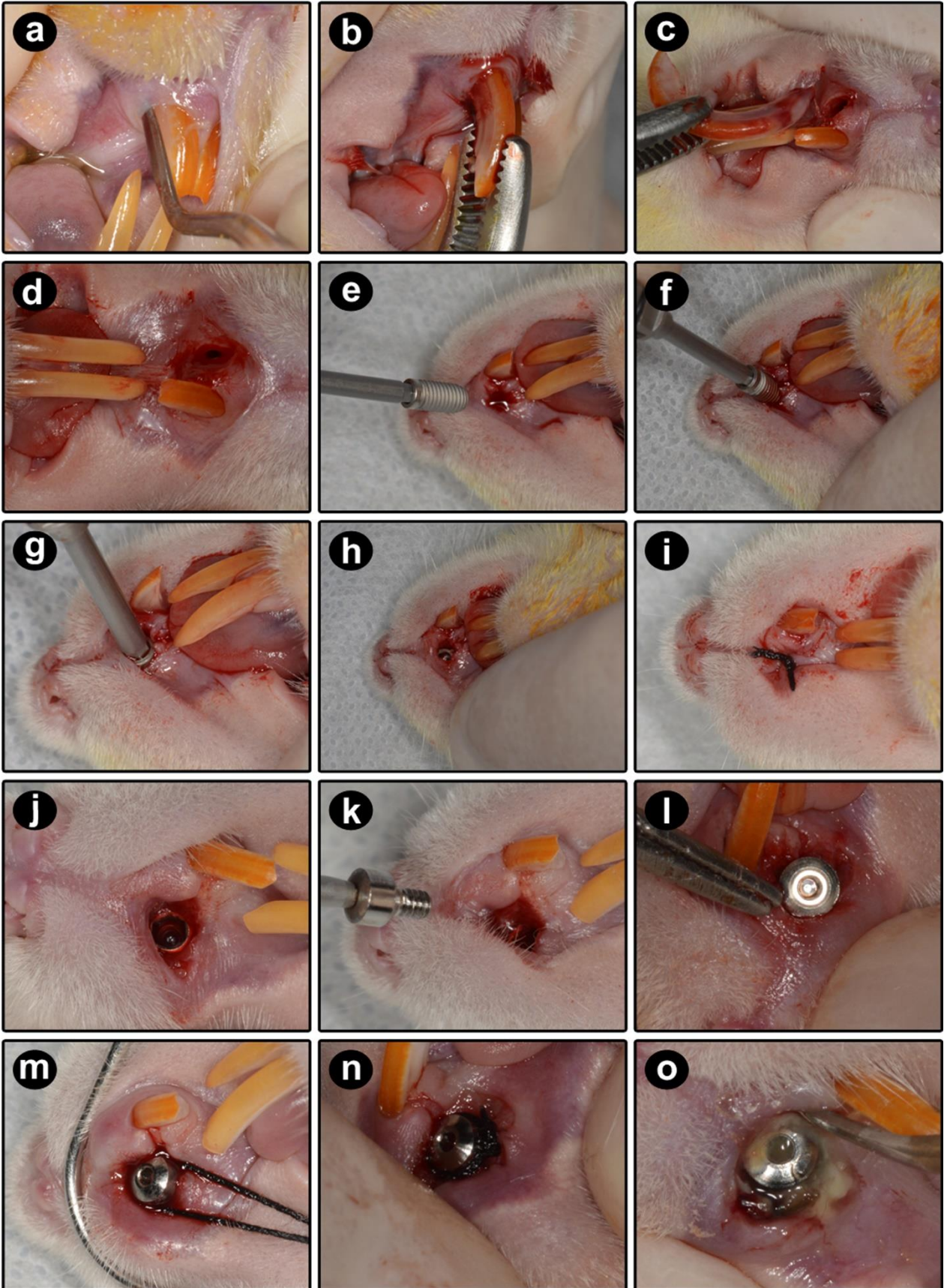
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.606043>

Zhu, W., Xu, R., Du, J., Fu, Y., Li, S., Zhang, P., Liu, L., & Jiang, H. (2019). Zoledronic acid promotes TLR-4-mediated M1 macrophage polarization in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *FASEB Journal*, **33**(4), 5208–5219.

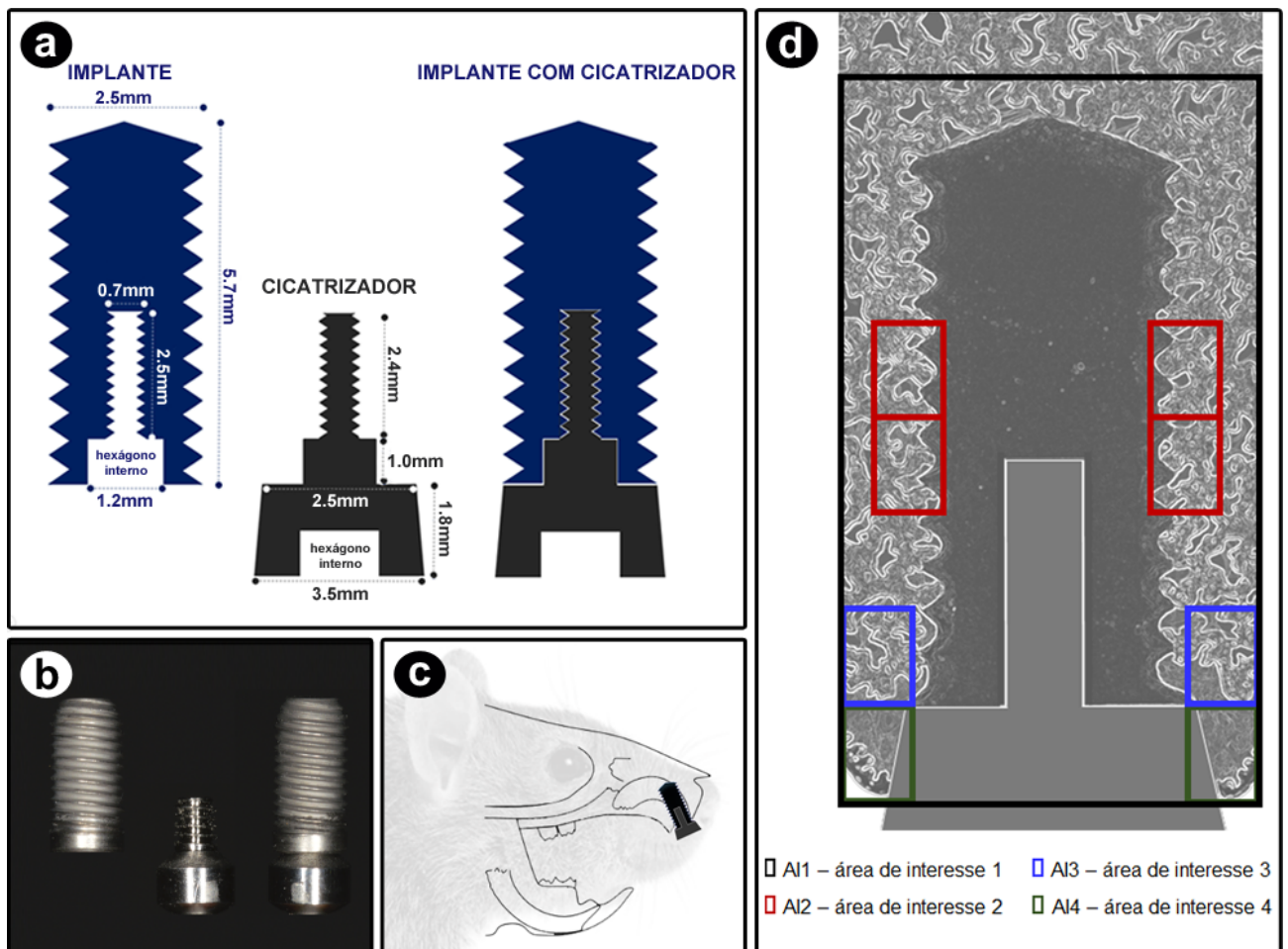
<https://doi.org/10.1096/fj.201801791RR>

## FIGURAS

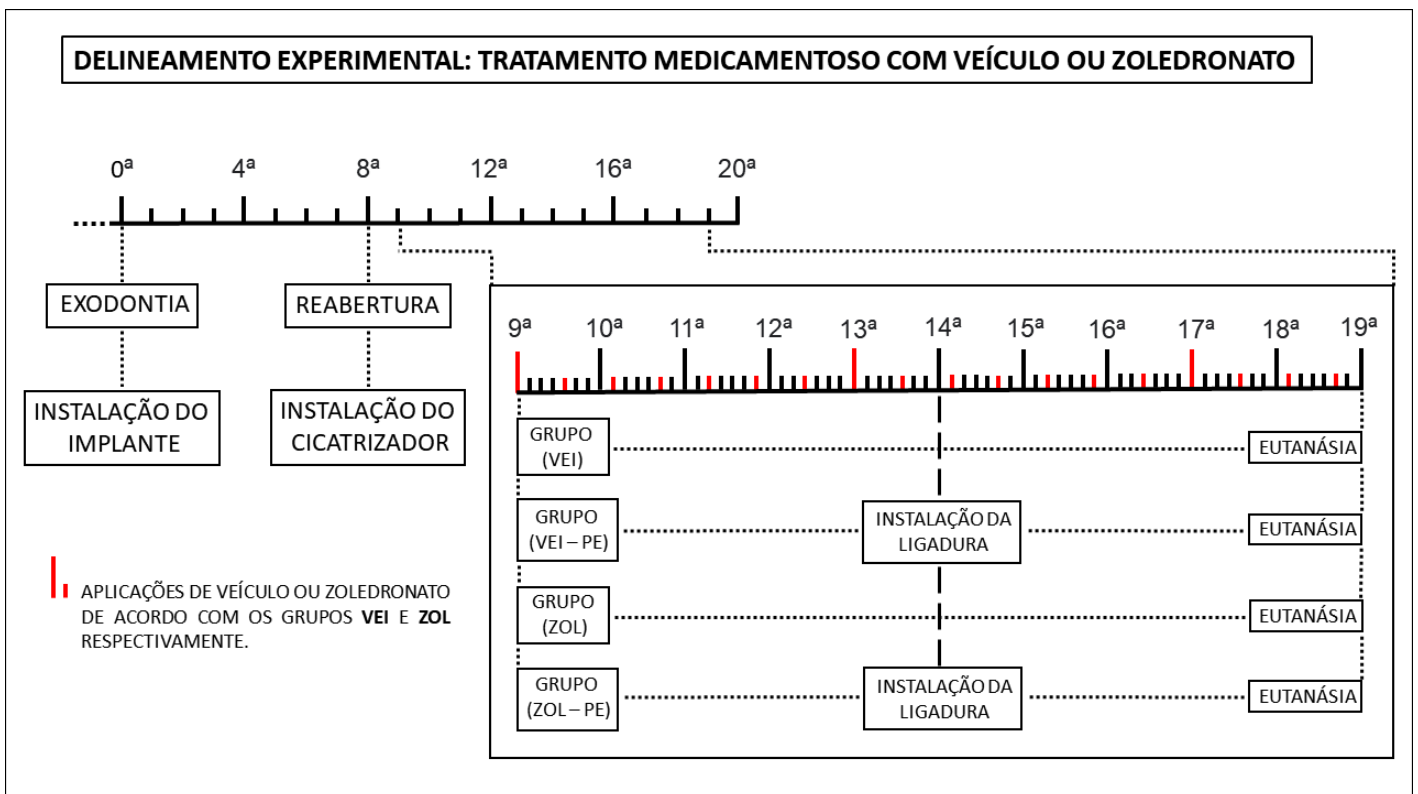
**Figura 1** Painel fotográfico dos procedimentos cirúrgicos experimentais: **(a)** Sindesmotomia do tecido mole periodontal ao redor do incisivo superior direito realizada com Hollemback 3s. **(b)** Apreensão do incisivo superior com pinça clínica roma. **(c)** Morfologia do incisivo central superior direito após a extração. **(d)** Aspecto do alvéolo após a exodontia, previamente à instalação do implante osseointegrado. **(e)** Chave digital quadrada acoplada à conexão interna do implante. **(f)** Início da inserção do implante no alvéolo dentário. **(g)** Aspecto lateral do término da inserção do implante no alvéolo dentário. **(h)** Posicionamento final do implante após alcançar a estabilidade primária pelo travamento nas paredes do alvéolo. **(i)** Sutura interrompida simples para aproximação das bordas da ferida. **(j)** Rebatimento do retalho de espessura total sobre o implante. **(k)** Chave 0.9 acoplada na conexão interna do cicatrizador. **(l)** Cicatrizador instalado. **(m)** Início da instalação do fio de algodão ao redor do cicatrizador do implante, com o auxílio de um Hollemback 3S o fio foi inserido no sulco peri-implantar. **(n)** Fio instalado ao redor do implante. **(o)** Acúmulo de biofilme ao redor do fio de algodão 5 semanas após sua instalação.



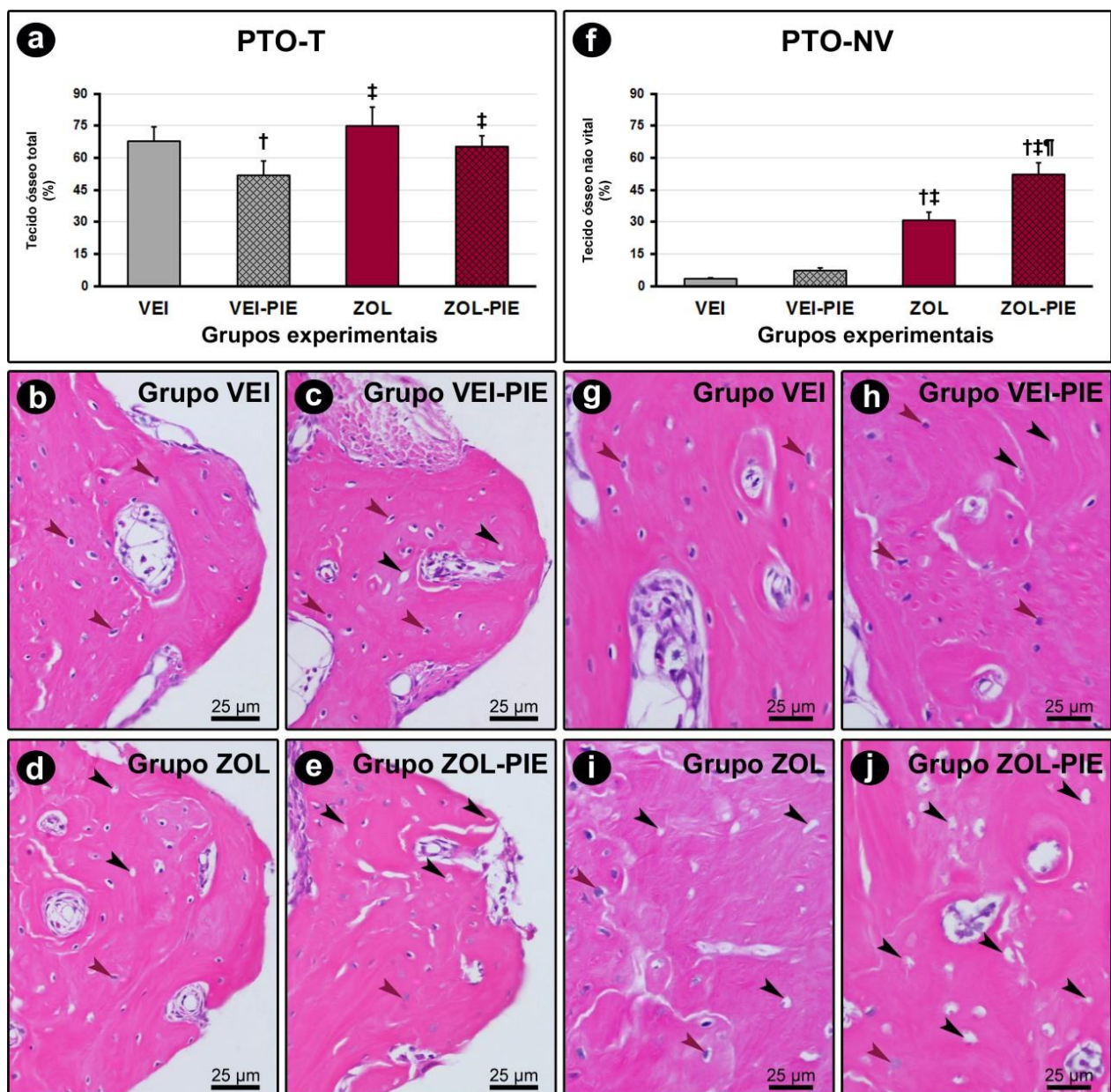
**Figura 2** Características do implante e do cicatrizador e áreas de interesse avaliadas no presente estudo. **(a)** Desenho esquemático da estrutura e das dimensões do implante e do cicatrizador. **(b)** Fotografia evidenciando o implante e o cicatrizador em separado e acoplados um ao outro. **(c)** Desenho esquemático mostrando a posição do implante-cicatrizador na maxila do rato. **(d)** Representação evidenciando as áreas de interesse (AI) analisadas no presente estudo, sendo que em AI1 foi efetuada a análise histológica (retângulo preto), em AI2 foram efetuadas as análises da PTO-T, PTO-NV e OCN (retângulos vermelhos), em AI3 foi efetuada a análise de TRAP (retângulo azul) e em AI4 foram efetuadas as análises de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , VEGF (retângulo verde).



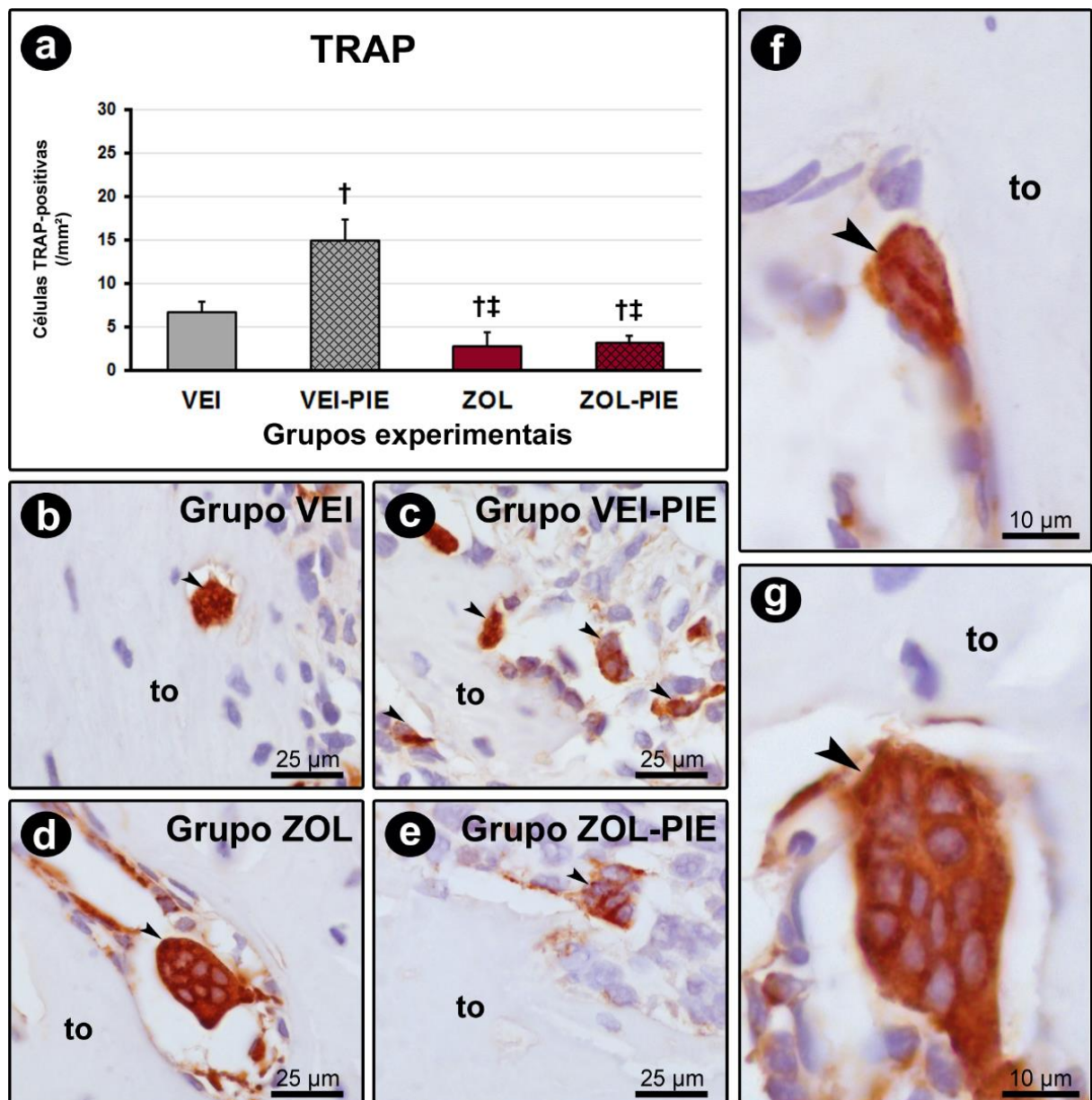
**Figura 3** Delineamento experimental: Tratamento medicamentoso com veículo ou zoledronato. Período experimental com ênfase no tratamento medicamentoso com veículo ou zoledronato. No início do experimento foram realizadas a exodontia do incisivo superior direito e a instalação imediata do implante osseointegrado. As ratas foram submetidas a alta dose de zoledronato após o período de osseointegração do implante, e a indução da PIE foi realizada durante o tratamento medicamentoso com a instalação de uma ligadura com fio de algodão ao redor do cicatrizador do implante, instalado previamente, no dia da reabertura.



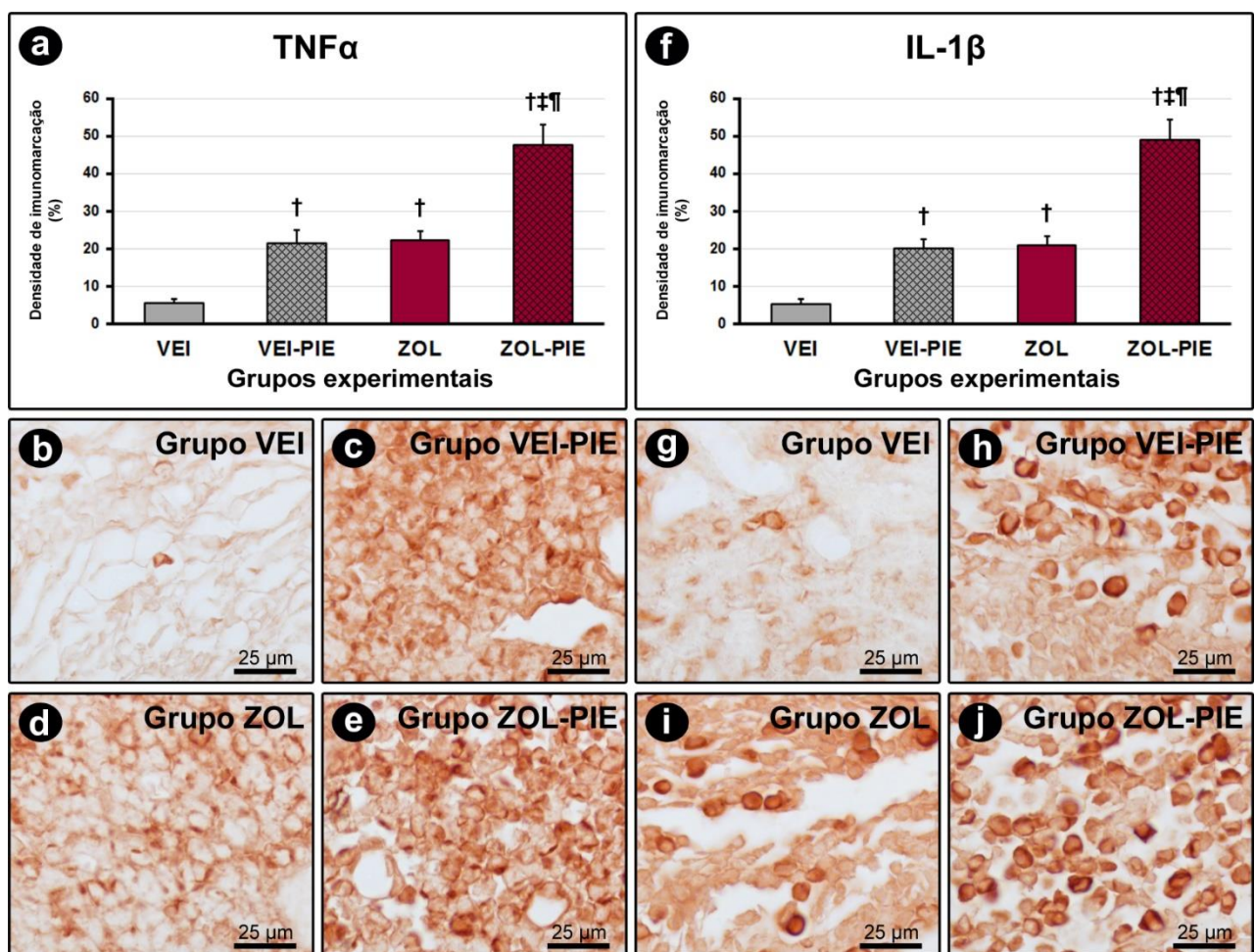
**Figura 4** Porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) no tecido peri-implantar. **(a)** e **(f)** Gráficos mostrando a PTO-T **(a)** e de PTO-NV **(f)**, sendo que: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PIE; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL. **(b - e)** e **(g - j)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de estruturação e de celularidade do tecido ósseo situado nas espiras do implante **(b - e)** e nas adjacências imediatas das espiras **(g - j)** nos grupos VEI **(b e g)**, VEI-PIE **(c e h)**, ZOL **(d e i)** e ZOL-PIE **(e e j)**. Símbolos: setas vermelhas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.



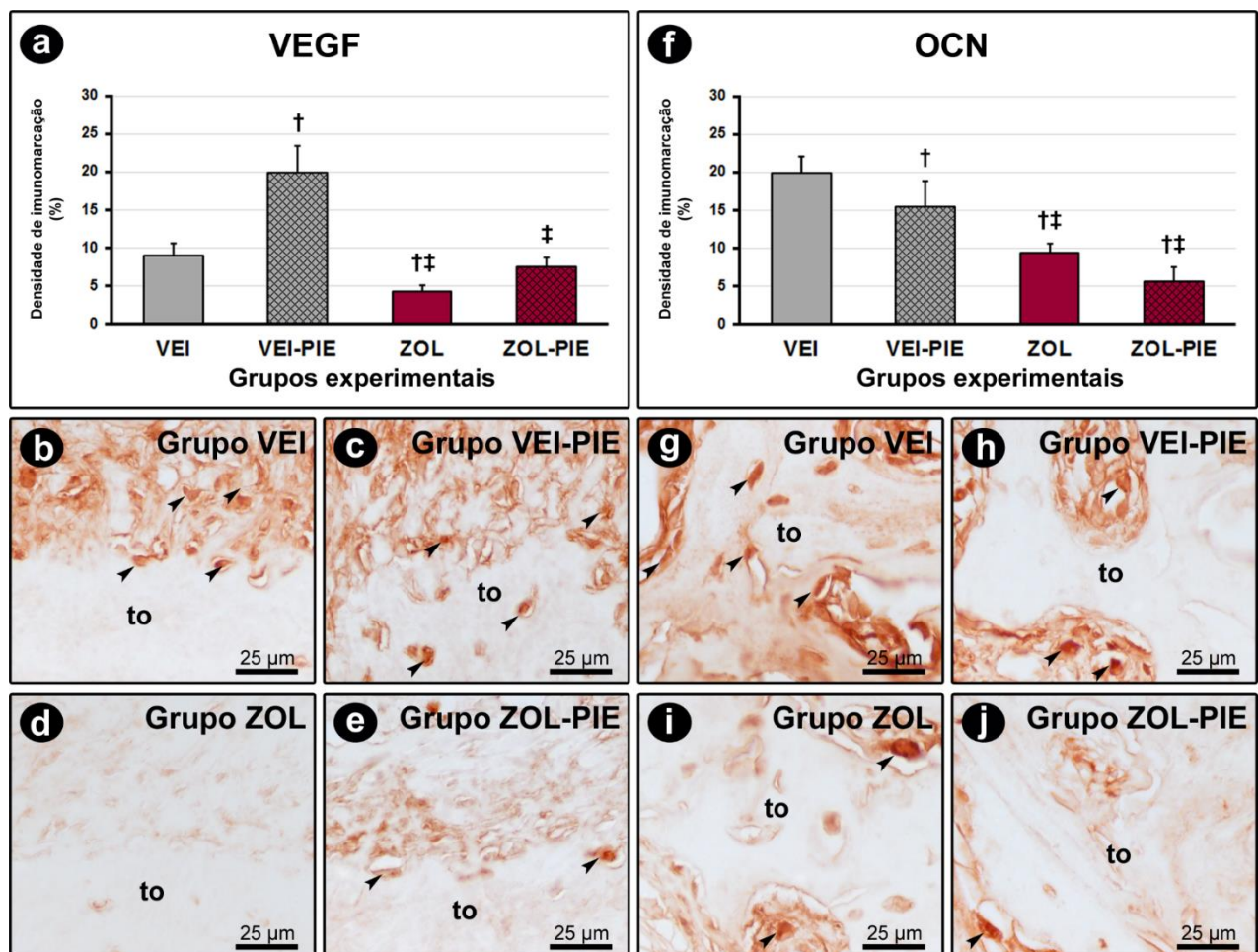
**Figura 5** Imunomarcacão para TRAP no tecido ósseo peri-implantar. **(a)** Gráfico mostrando a quantidade de células TRAP-positivas, sendo que: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PIE. **(b - e)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para TRAP **(b - e)** no tecido ósseo peri-implantar nos grupos VEI **(b)**, VEI-PIE **(c)**, ZOL **(d)** e ZOL-PIE **(e)**. **(f - g)** Fotomicrografias destacando as diferenças entre osteoclastos dos grupos tratados com veículo e dos grupos tratados com zoledronato, onde tais células aparecem com dimensões muito maiores, hipernucleadas, arredondadas e distantes da matriz óssea. As células estão indicando as células imunomarcadas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: **(b - e)** 1000x; **(f - g)** 4000x. Barras de escala: **(b - e)** 25  $\mu\text{m}$ ; **(f - g)** 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6** Imunomarcção para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido peri-implantar. **(a)** e **(f)** Gráficos mostrando a densidade de imunomarcção para TNF $\alpha$  **(a)** e IL-1 $\beta$  **(f)**, sendo que: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PIE; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL. **(b - e)** e **(g - j)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TNF $\alpha$  **(b - e)** e IL-1 $\beta$  **(g - j)** no tecido peri-implantar nos grupos VEI **(b e g)**, VEI-PIE **(c e h)**, ZOL **(d e i)** e ZOL-PIE **(e e j)**. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25  $\mu$ m.

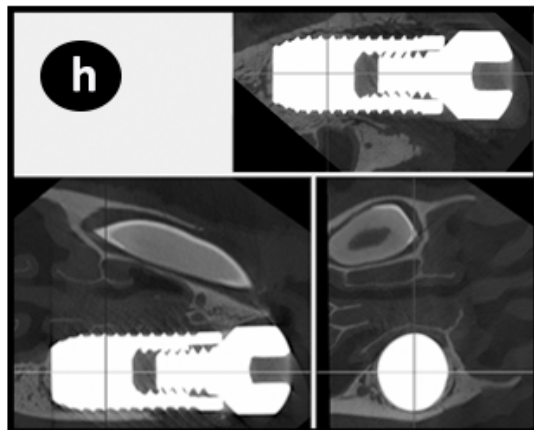
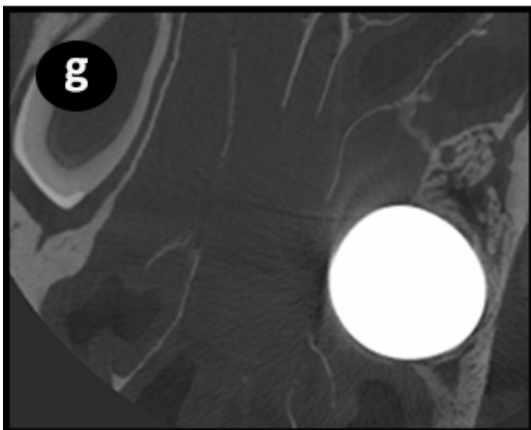
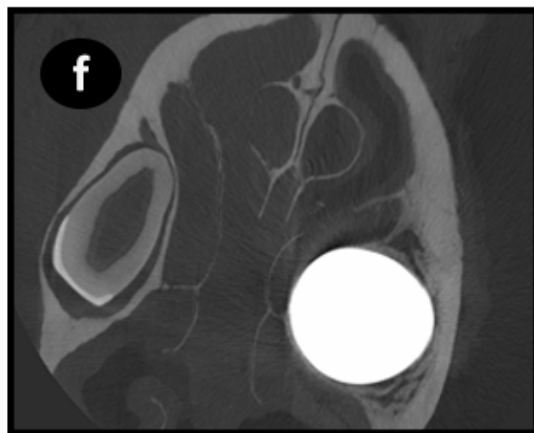
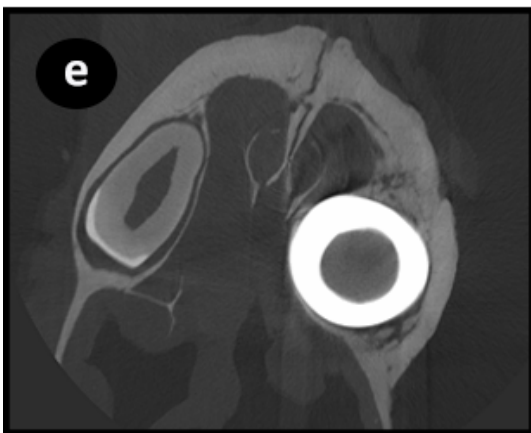
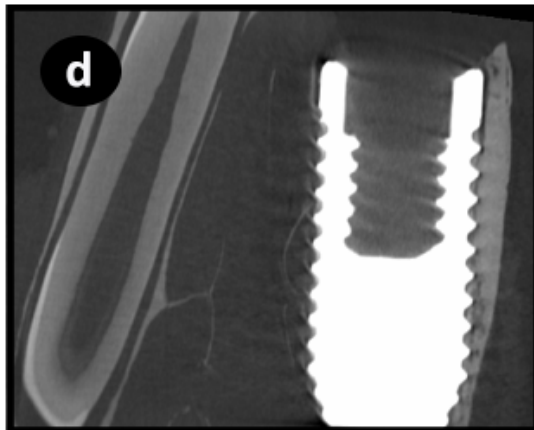
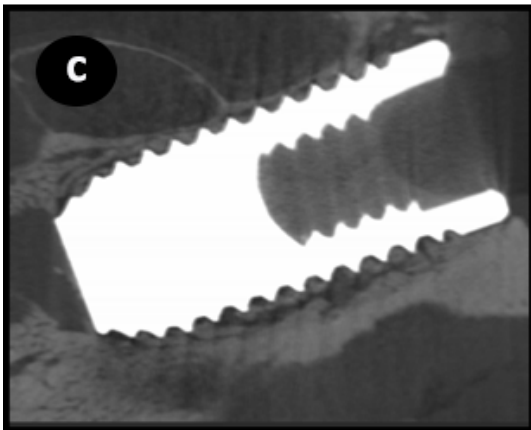
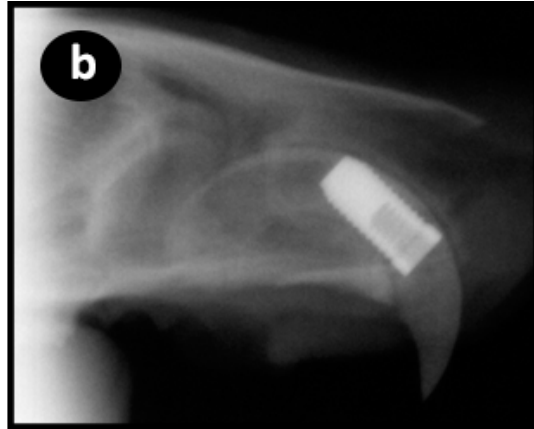
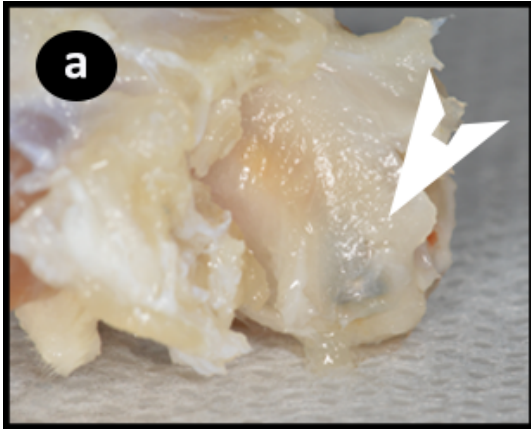


**Figura 7** Imunomarcção para VEGF e OCN no tecido peri-implantar. **(a)** e **(f)** Gráficos mostrando a densidade de imunomarcção para VEGF **(a)** e OCN **(f)**, sendo que: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-PIE. **(b - e)** e **(g - j)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para VEGF **(b - e)** e OCN **(g - j)** no tecido peri-implantar nos grupos VEI **(b e g)**, VEI-PIE **(c e h)**, ZOL **(d e i)** e ZOL-PIE **(e e j)**. As células estão indicando as células imunomarcadas. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25  $\mu$ m.

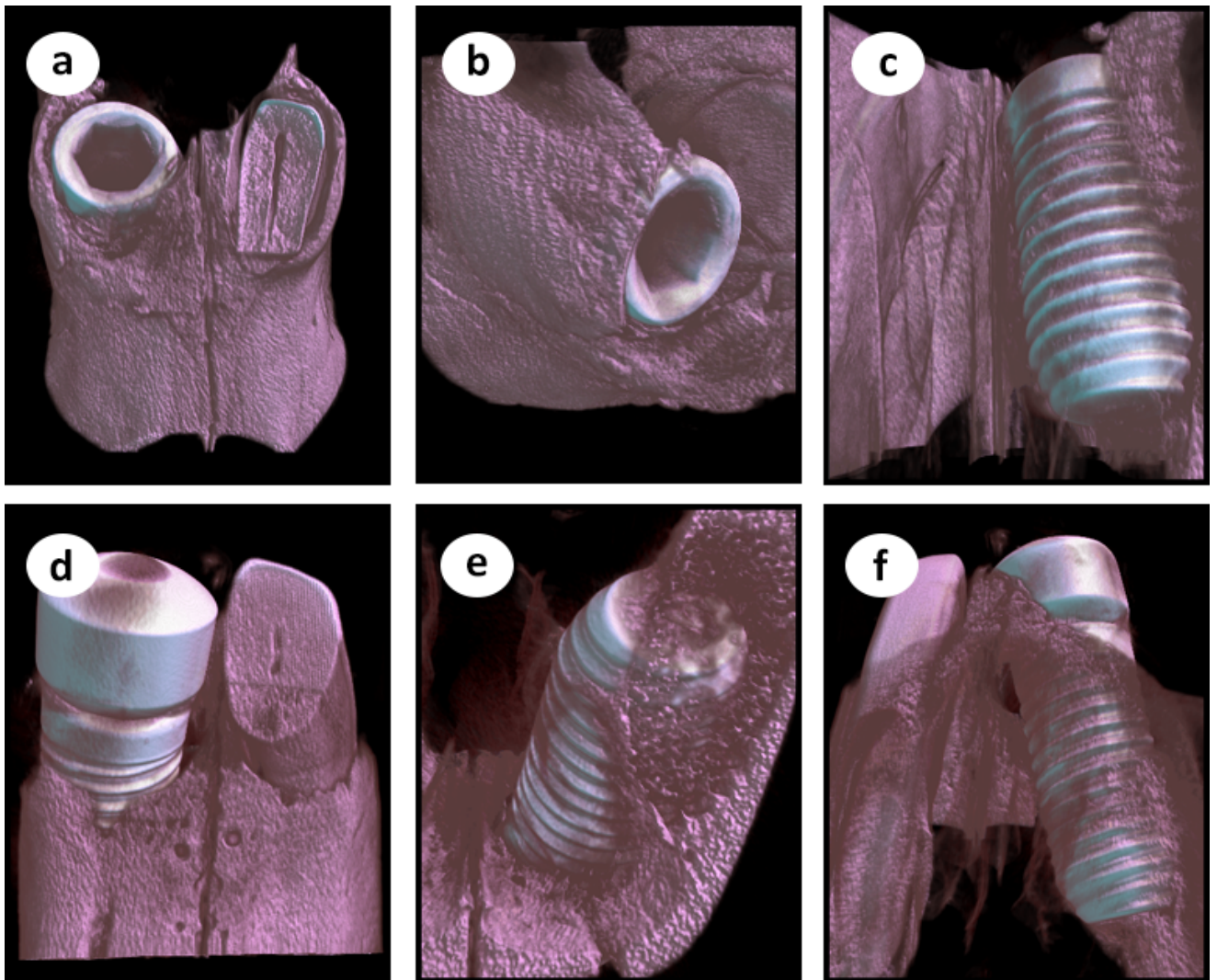


## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Material suplementar 1** Análises microtomográficas após 8 semanas da instalação do implante: a) Aspectos anatômicos de um espécime, demonstrando por transparência à parede lateral distal do alvéolo a localização do implante; b) Raio-X com incidência lateral, demonstrando a relação do implante com o incisivo contra-lateral; c) *Slice* longitudinal ao implante, no sentido palatino-nasal; d) *Slice* longitudinal ao implante no sentido mesio-distal; e) *Slice* transversal ao implante na região da primeira rosca; f) *Slice* transversal ao implante na região mediana do implante; g) *Slice* transversal ao implante na região da última rosca; h) *Slices* do segundo espécime demonstrando as regiões de aquisição das imagens e características semelhantes de contato osso-implante a nível microtomográfico.



**Material suplementar 2** Reconstruções microtomográficas demonstrando a estruturação e arquitetura do tecido ósseo peri-implantar na região do incisivo superior direito de ratas Wistar: a) Reconstrução com uma visão ântero-inferior da região implantada; b) Reconstrução com uma visão ântero-lateral da região implantada; c) Reconstrução com uma visão pósterio-superior da região implantada; d) Reconstrução de um segundo espécime com uma visão ântero-inferior da região implantada; e) Reconstrução de um segundo espécime com uma visão pósterio-inferior da região implantada; f) Reconstrução de um segundo espécime com uma visão pósterio-superior da região implantada.



## ANEXOS

### ANEXO A - Certificado de aprovação do processo nº 01006-2018 pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP



#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação dos tecidos peri-implantares em ratos e ratas com implantes osseointegrados na maxila e submetidos à terapia com dose oncológica de zoledronato**", Processo FOA nº 01006-2018, sob responsabilidade de Edilson Ervolino 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:** 12 de Março de 2022.

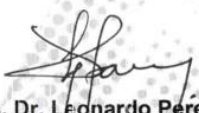
**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 12 de Abril de 2022.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of peri-implant tissues in male and female rats with osseointegrated implants in the maxilla and submitted to therapy with zoledronate oncological dose**", Protocol FOA nº 01006-2018, under the supervision of Edilson Ervolino 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:** March 12, 2022.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** April 12, 2022.

  
**Prof. Ass. Dr. Leonardo Pérez 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