



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

**JÉSSICA SILVA SANTANA**

**Avaliação da efetividade da aPDT empregando o butil  
azul de toluidina associado ao laser de baixa potência  
no reparo alveolar em ratas com alto risco para a  
osteonecrose dos maxilares**

**Araçatuba – SP**

**2020**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

**JÉSSICA SILVA SANTANA**

**Avaliação da efetividade da aPDT empregando o butil azul de toluidina associado ao laser de baixa potência no reparo alveolar em ratas com alto risco para a osteonecrose dos maxilares**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado 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 Bacharel em Odontologia. Orientador: Prof. Dr. Edilson Ervolino

**Araçatuba – SP**

**2020**

*Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso à minha mãe Lúcia Helena, que me amparou todas as vezes em que eu estava muito cansada para continuar sozinha, me apoiou em todas as minhas escolhas, sempre esteve presente em minha vida dando suporte, colo e as broncas necessárias. Você é o meu maior exemplo de mãe e de mulher, competente, forte e determinada, perfeita de sua forma. Dedico a você todas as minhas conquistas alcançadas e ao ser humano que sou.*

## AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa do diretor da **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem** por proporcionarem um ensino completo e de qualidade e pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

À **Pró-reitoria de Graduação** dessa universidade, pela concessão durante meus cinco anos de graduação da bolsa Pró-Talentos Unesp, permitindo o desenvolvimento de minha iniciação científica e aprimoramento de meus conhecimentos.

Ao meu orientador, **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**, sou grata por ter me receber às cegas desde o meu primeiro ano de graduação, pelo incentivo para a realização dessa pesquisa, além de seu tempo dispendido para oferecer o suporte necessário. Agradeço ainda, pelos ensinamentos adquiridos e por me proporcionar a vivência científica durante minha graduação.

À minha família, sem a qual eu não seria capaz de alcançar o que alcancei, agradeço por todo o apoio emocional, psicológico e financeiro, que me permitiram concluir esse curso superior numa universidade tão maravilhosa. Agradeço minha mãe **Lúcia Helena**, minha avó **Lúcia**, meu avô **Antônio**, minha tia **Andréa**, meu pai **Joel** e meus irmãos **Leonardo**, **Pedro** e **Giovanna**. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida, minha base, meu porto seguro, e sei que sempre estarão torcendo e colaborando para o meu sucesso.

À família que escolhi, meu melhor amigo e namorado **André**, agradeço pelo companheirismo, pela amizade, pela paciência e por sempre estar ao meu lado, mesmo que distantes fisicamente. Você sempre se fez presente e acompanhou todas as dificuldades e êxitos vividos nesses cinco anos de graduação. Obrigada por ser meu confidente, meu parceiro e meu amor. Agradeço também à minha sogra **Edilene**, que contribuiu em todo o processo.

Às minhas amigas de infância **Janaina**, **Juliana** e **Lais**, agradeço por todo o apoio, pela amizade verdadeira que construímos ao longo da vida, pelos momentos de diversão proporcionados e também pelo ombro amigo oferecido em momentos de aflição. Vocês são muito importantes para mim e fico feliz ao

ver as mulheres que nos tornamos. Apesar dos caminhos diferentes que a vida nos proporcionou, seguiremos sempre juntas.

Aos meus amigos e companheiros de grupo de pesquisa, **Daniela, Eduardo, Estéfany, Glauco, Isabella, Jéssica, João, Letícia, Luan, Luy, Mariane, Tiago, Vinícius e Vitor**, sem os quais eu não poderia realizar esse trabalho, agradeço pelas amizades verdadeiras que construímos, pelas risadas compartilhadas, pela ajuda em cada detalhe, e pela convivência harmoniosa que temos. Carregarei a Família ZOL comigo por toda a vida.

Às minhas amigas e amigos que a FOA proporcionou, vindos de tantos lugares diferentes, como o diretório acadêmico, a monitoria, a bateria, vocês foram essenciais na formação do ser humano que sou hoje. Agradeço em especial às minhas amigas da turma 62 **Stéfany, Priscila, Amanda, Jaqueline, Juliana, Mariana, Michele e Natália**, sou grata pelo dia-a-dia compartilhado, pelas risadas, pelos momentos de estudo e conhecimentos compartilhados, assim como pelo apoio durante esta pandemia que nos surpreendeu no ano de formatura, vocês foram fundamentais em minha caminhada na FOA, e desejo muito sucesso para as futuras profissionais competentes que se tornarão.

Agradeço a cada uma das minhas duplas, que contribuíram enormemente na minha formação: **Amanda Rosa, Jaqueline Silva, João Matheus, Juliana Érnica, Juliana de Moura, Mariana Fantini e Mariana Marques**, cada um de vocês me ensinou algo importante, desde a lida com a paciente até a forma de organizar meus materiais, guardarei vocês para sempre em meu coração, pois sem os mesmos não seria possível concluir esse curso.

Aos **professores** da FOA, toda gratidão pelo conhecimento compartilhado, pela experiência passada, pelas ótimas aulas oferecidas e pelo ensino de qualidade.

Aos **funcionários e colaboradores** dessa unidade, que permitem que tudo funcione maravilhosamente bem, agradeço pela dedicação e serviço de excelência prestado.

E por fim, agradeço aos **animais** que deram suas vidas para que fosse possível a realização dessa pesquisa.

SANTANA, J. S. **Avaliação da efetividade da aPDT empregando o butil azul de toluidina associado ao laser de baixa potência no reparo alveolar em ratas com alto risco para a osteonecrose dos maxilares.** 2020. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

## RESUMO

Dentre os agentes antirreabsortivos empregados para o tratamento de doenças ósseas que desencadeiam osteopenia/osteoporose e lesões osteolíticas estão os bisfosfonatos (BFs). Um efeito adverso deste tipo de medicamento é o desencadeamento da osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M). A etiopatogenia desta condição é pobremente compreendida, o que dificulta sua prevenção e tratamento. Dentre as poucas propostas terapêuticas preventivas está a antibióticoterapia, a qual pode se mostrar falha. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) apresenta capacidade antimicrobiana e ação bioestimulatória, o que a coloca como uma potencial estratégia terapêutica preventiva para a ONM-M. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a efetividade de múltiplas sessões de aPDT, empregando o butil azul de toluidina (BuAT) associado ao laser de baixa potência, no sítio de extração dental em ratas que apresentam os principais fatores de risco para o desenvolvimento da ONM-M. Dezoito ratas senescentes foram distribuídas em três grupos experimentais: VEI, ZOL e ZOL-PDT. O plano de tratamento medicamentoso teve duração de 7 semanas. Um dia antes do início do protocolo medicamentoso realizou-se a indução da periodontite experimental (PE). No grupo VEI, as ratas receberam injeções intraperitoneais de 0,45ml de solução de cloreto de sódio 0,9%, enquanto que nos grupos ZOL e ZOL-PDT as ratas receberam 0,45ml da mesma solução acrescida de 100µg/Kg do zoledronato com intervalo de dois dias entre as aplicações. Decorridas três semanas de tratamento todas as ratas foram submetidas à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. No grupo ZOL-PDT as ratas foram submetidas a sessões de aPDT aos 0, 2, e 4 dias pós exodontia. A aPDT constitui-se na aplicação de BuAT (0,5mg/ml) sobre a ferida cirúrgica e irradiação com laser de baixa potência (laser: InGaAlP; 660nm; 35mW; 74,2J/cm<sup>2</sup>; 60s). Decorridos 28 dias pós-operatórios foi realizada a eutanásia. As hemimandíbulas

foram devidamente processadas para que fosse efetuado no sítio de extração dental: 1) análise clínica; 2) análise histológica da reparação tecidual; 3) análise histométrica da Porcentagem de Tecido Ósseo Neoformado (TONF) e; 4) análise histométrica da Porcentagem de Tecido Ósseo Não Vital (TONV). Os dados foram submetidos às análises qualitativa, quantitativa e estatística com nível de significância de 5%. O grupo ZOL apresentou grande comprometimento do processo de reparação tecidual, condizentes com um quadro de ONM-M. Os grupos VEI e ZOL-PDT apresentaram um processo de reparação tecidual favorável do sítio de extração dental e mucosa sobrejacente. No grupo ZOL a porcentagem de TONF no sítio de extração dental se mostrou menor que nos grupos VEI ( $p<0,01$ ) e ZOL-PDT ( $p<0,01$ ). No grupo ZOL a porcentagem de TONV se mostrou maior que no grupo VEI ( $p<0,01$ ) e no grupo ZOL-PDT ( $p<0,01$ ). No grupo ZOL-PDT a porcentagem de TONV se apresentou maior que no grupo VEI ( $p<0,01$ ). A aPDT empregando o BuAT em associação com o LBP se mostrou capaz de promover a regeneração epitelial, modular a resposta inflamatória local, melhorar a reparação do tecido conjuntivo e estimular a neoformação óssea alveolar, evitando desta forma a ocorrência de ONM-M pós-exodontia.

**Palavras-chave:** Osteonecrose. Maxilares. Bisfosfonatos. Tecido ósseo. Terapia fotodinâmica.

SANTANA, J. S. **Evaluation of aPDT effectiveness applying butyl toluidine blue associated with low-level laser in alveolar repair in rats at risk for osteonecrosis of the jaws. 2020.** 42 p. End of course paper (Bachelor degree) – Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, 2020.

### **ABSTRACT**

Among the anti-resorptive agents used to treat bone diseases that trigger osteopenia/osteoporosis and lytic bone lesions are bisphosphonates (BPs). A severe adverse effect caused by such drugs is bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws (BRONJ). The pathogenesis of BRONJ is still poorly understood, making its prevention and treatment difficult. Among the few preventive therapeutic proposals is antibiotic therapy, which may sometimes fail. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has antimicrobial capacity and biostimulatory action, which places it as a potential preventive therapy for BRONJ. The present study aims to evaluate the effectiveness of multiple aPDT sessions, using butyl toluidine blue photosensitizer associated with low-level-laser irradiation, in the tooth extraction site in rats with major risk factors for BRONJ. Eighteen senile female rats were distributed in three experimental groups: VEI, ZOL e ZOL-PDT. The rats were submitted to a seven-week drug treatment plan. One day before the start of the drug protocol, experimental periodontitis (EP) was induced. The VEI group was treated with vehicle and the rats received intraperitoneal injections of 0.45 ml of 0.9% sodium chloride solution, while the ZOL and ZOL-PDT groups received, 100 µg/Kg of zoledronate diluted in 0.45ml vehicle, two-day interval between applications. After three weeks of treatment, all rats underwent extraction of the lower left first molar tooth. In the ZOL-PDT group, the rats were submitted to aPDT sessions at 0, 2 and 4 days after extraction. aPDT consists of the application of butyl toluidine blue (BuTB) (500µg for each 0.5mg / ml) on the surgical wound and irradiation with low-level laser (LLL) (laser: InGaAlP; 660nm; 35mW; 74.2J / cm<sup>2</sup>; 60s). Euthanasia was performed 28 days after tooth extraction. The hemimandibles were properly processed so that it could be done at the dental extraction site: 1) clinical analysis; 2) histological analysis of tissue repair; 3) histometric analysis of Newly Formed Bone Tissue (NFBT) and; 4) histometric analysis of the Non-Vital Bone Tissue (NVBT). The data were submitted to qualitative, quantitative and statistical analysis with

significance level of 5%. The ZOL group showed a great commitment in the tissue repair process, consistent with BRONJ. The VEI and ZOL-PDT groups showed a favorable tissue repair process at the dental extraction site and overlying mucosa. In the ZOL group the percentage of NFBT at the tooth extraction site was significantly lower than in groups VEI ( $p < 0.01$ ) and ZOL-PDT ( $p < 0.01$ ). In the group ZOL the percentage of NVBT was higher than in group VEI ( $p < 0.01$ ) and in group ZOL-PDT ( $p < 0.01$ ). In the ZOL-PDT group, the percentage of NVBT was higher than in group VEI ( $p < 0.01$ ). aPDT employing BuTB in association with LLL proved to be capable of promoting epithelial regeneration, modulating the local inflammatory response, improving connective tissue repair and stimulating alveolar bone neoformation, thus preventing the occurrence of post-extraction BRONJ.

**Keywords:** Osteonecrosis. Jaws. Bisphosphonates. Bone tissue. Photodynamic therapy.

## **LISTA DE FIGURAS**

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 - Instalação da ligadura de algodão para indução da PE.....                                                   | 21 |
| FIGURA 2 - Exodontia do primeiro molar inferior esquerdo .....                                                         | 22 |
| FIGURA 3 - Sequência de preparo e aplicação da aPDT .....                                                              | 23 |
| FIGURA 4 - Protocolo experimental, em semanas.....                                                                     | 24 |
| FIGURA 5 - Aspectos histológico da lâmina própria em VEI, ZOL e ZOL-PDT aos<br>28 dias pós-operatórios.....            | 30 |
| FIGURA 6 - Aspectos histológico do sítio de extração dental em VEI, ZOL e ZOL-<br>PDT aos 28 dias pós-operatórios..... | 30 |

## **LISTA DE TABELAS**

|                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do nível de inflamação dos tecidos durante o processo de reparação pós-extração dental em VEI, ZOL e ZOL-PDT aos 28 dias pós-operatórios. ....    | 28 |
| TABELA 2: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do padrão de estruturação tecidual durante o processo de reparação pós-extração dental em em VEI, ZOL e ZOL-PDT aos 28 dias pós-operatórios. .... | 29 |

## **LISTA DE GRÁFICOS**

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| GRÁFICO 1 - Porcentagem de TONF. .... | 31 |
| GRÁFICO 2 - Porcentagem de TONV. .... | 31 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

% = porcentagem

± = mais ou menos

°C = graus Celsius

< = menor

† = diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C+

‡ = diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C-

µg/Kg = microgramas por quilograma

µg/ml = microgramas por mililitro

µl = microlitros

µm = micrômetros

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> = oxigênio singlete

AAOMS = Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial

aPDT = terapia fotodinâmica antimicrobiana

BF = bisfosfonato

BFs = bisfosfonatos

BP = bisphosphonate

BuTB = butyl toluidine blue

BuAT = butil azul de toluidina

BRONJ = bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

cm<sup>2</sup> = centímetros quadrados

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EP = experimental periodontitis

EUA = Estados Unidos da América

FOA = Faculdade de Odontologia de Araçatuba

FS = fotossensibilizador

g = gramas

HE = hematoxilina-eosina

InGaAlP = Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo

J/cm<sup>2</sup> = Joules por centímetro quadrado

J/ponto = Joules por ponto

LBP = laser em baixa potência

LLL = low-level laser

mg/Kg = miligramas por quilograma

ml = mililitros

mm = milímetros

mW = miliWatts

NFBT = newly formed bone tissue

nm = nanômetros

NVBT = non-vital bone tissue

ONM-M = osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa

PBS = tampão fosfato salino

PE = periodontite experimental

pH = potencial hidrogeniônico

PTONF = porcentagem de tecido ósseo neoformado

PTONV = porcentagem de tecido ósseo não vital

TBO = fenotiazina azul de toluidina O

tc = tecido conjuntivo

to = tecido ósseo

ton, tecido ósseo não vital.

UNESP = Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

vs = vasos sanguíneos

x = vezes

W/cm<sup>2</sup> = Watts por centímetro quadrado

## SUMÁRIO

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                       | 15 |
| 2. OBJETIVO.....                                                          | 20 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                               | 21 |
| 3.1 Delineamento experimental.....                                        | 21 |
| 3.1.1 Animais.....                                                        | 21 |
| 3.1.2 Anestesia.....                                                      | 21 |
| 3.1.3 PE induzida por ligadura .....                                      | 21 |
| 3.1.4 Protocolo medicamentoso .....                                       | 21 |
| 3.1.5 Exodontia .....                                                     | 22 |
| 3.1.6 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) .....                    | 22 |
| 3.1.7 Grupos experimentais .....                                          | 23 |
| 3.1.8 Obtenção das amostras .....                                         | 24 |
| 3.1.9 Processamento histológico das amostras .....                        | 24 |
| 3.2 Análise dos resultados .....                                          | 25 |
| 3.2.1 Análise do peso corporal e exame clínico intrabucal.....            | 25 |
| 3.2.2 Análises microscópicas .....                                        | 25 |
| 3.2.3 Análise histológica do sítio de extração dental e adjacências ..... | 25 |
| 3.2.4 Análise histométrica da PTONF e da PTONV .....                      | 26 |
| 3.2.5 Análise estatística .....                                           | 26 |
| 4. RESULTADOS .....                                                       | 27 |
| 4.1 Peso corporal e exame clínico intrabucal.....                         | 27 |
| 4.2 Reparo tecidual no sítio de extração dental e adjacências.....        | 27 |
| 4.3 PTONF no sítio de extração dental .....                               | 30 |
| 4.4 PTONV no sítio de extração dental .....                               | 31 |
| 5. DISCUSSÃO .....                                                        | 32 |
| 6. CONCLUSÃO.....                                                         | 37 |
| REFERÊNCIAS.....                                                          | 38 |

## 1. INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BFs) são fármacos utilizados para o manejo de osteopatias caracterizadas pelo aumento da reabsorção mediada por osteoclastos. Dentre as diversas aplicações desse medicamento estão a osteoporose, a Doença de Paget do osso, osteogênese imperfeita, hipercalcemia e inibição da progressão de metástase em neoplasias malignas osteotrópicas<sup>1</sup>. Esses medicamentos exercem uma potente ação inibitória sobre o processo de reabsorção óssea<sup>1; 2; 3</sup>. Tais drogas são análogos do pirofosfato endógeno, e como o mesmo, apresentam dois grupamentos fosfatos ligados covalentemente a um carbono central (P-C-P)<sup>4</sup>. Neste se ligam as cadeias laterais R1, que permite a afinidade pelos cristais de hidroxiapatita e, R2, responsável pela potência e pelas principais propriedades farmacológicas de cada BF<sup>4</sup>. Há duas classes de BFs, que se diferem por apresentarem ou não nitrogênio em sua cadeia lateral R2<sup>4</sup>. Dentre os BFs nitrogenados o zoledronato é o que apresenta maior potência relativa. Ele altera o metabolismo ósseo ao inibir a via do mevalonato<sup>4</sup>, impedindo que ocorram inúmeras alterações na dinâmica do citoesqueleto dos osteoclastos, as quais são essenciais para que tal célula exerça sua função reabsortiva. Além disso, inibe a osteoclastogênese<sup>5</sup> e estimula o desencadeamento de apoptose prematura em osteoclastos ativos<sup>4; 6; 7; 8</sup>.

Com o aumento da população idosa em todo o mundo há consequentemente o aumento de doenças osteolíticas, levando cada vez mais ao uso de drogas antirreabsortivas como os BFs e inibidores de RANK-L. Uma reação adversa do uso dos BFs que impacta diretamente na odontologia é a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M)<sup>9</sup>. A Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial (AAOMS, American Association of Oral and Maxillofacial Surgery) define tal condição como presença de osso exposto na região maxilofacial, por um período maior que oito semanas, em pacientes submetidos à tratamento prévio ou atual com droga anti-reabsortiva ou anti-angiogênica e que não possui história prévia de radioterapia nos maxilares<sup>10</sup>. A ONM-M ocorre raramente em pacientes que fazem o uso dessas drogas por via oral, no entanto, sua incidência atinge de 1 a 12% dos pacientes que fazem uso de BFs pela via intravenosa. Além disso, os BFs têm

efeito cumulativo, e esta incidência pode atingir 21% dos pacientes após o terceiro ano de uso<sup>11</sup>. Estudos epidemiológicos demonstram que a ONM-M acomete frequentemente pacientes do sexo feminino, com idade avançada, que fazem ou fizeram uso crônico de BFs administrados por via intravenosa, especificamente o zoledronato, ou este em associação com outros BFs. Há maior incidência na mandíbula, na região de pré-molares e molares e a extração dentária tem sido apontada como um dos principais fatores desencadeadores<sup>12</sup>. Estudos clínicos tem demonstrado que a exodontia de dentes acometidos por distúrbios periodontais e/ou periapicais é o principal fator de risco local, ou seja, a presença prévia de inflamação e infecção local exercem papel crucial no desencadeamento da ONM-M (BFs)<sup>10; 13; 14</sup>.

A compreensão da etiopatogenia da ONM-M ainda é limitada o que restringe e dificulta sua prevenção e tratamento<sup>15; 16; 17</sup>. Os supostos fatores etiopatológicos desencadeadores da ONM-M são: a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos, que resulta no acúmulo de microfraturas no tecido ósseo; o efeito citotóxico dos BFs, diminuindo a capacidade de reparo nos tecidos duros e moles; o potente efeito antiangiogênico, que leva à necrose avascular do tecido ósseo; o favorecimento à infecção induzida por tais medicamentos, que aumentam a capacidade de adesão e colonização de bactérias ao tecido ósseo exposto e a disfunção da resposta imunológica local<sup>18; 19; 20; 21; 22; 23</sup>. Todavia, muitas são as hipóteses e poucas são as comprovações científicas. A investigação dos fatores etiopatológicos em humanos apresenta limitações e, portanto, modelos experimentais em animais têm direcionado as pesquisas clínicas, os quais podem ser empregados na avaliação de terapias curativas e preventivas para a ONM-M.

Com relação ao tratamento, existem diferentes abordagens clínicas, as quais têm se baseado exclusivamente no estadiamento clínico da doença, e compreendem desde bochechos com gluconato de clorexidina 0,12%, antibioticoterapia prolongada, debridamento cirúrgico da lesão, até casos onde é necessária a realização de mandibulectomia ou maxilectomia parcial <sup>15; 16; 17; 24;22</sup>. No entanto, como alguns BFs são utilizados no tratamento de doenças extremamente graves e debilitantes, a ocorrência da ONM-M (BFs) e, até mesmo o seu tratamento, comprometem substancialmente, ou provocam a interrupção do tratamento da doença de base e a qualidade de vida do paciente.

Atualmente, a conduta preventiva sugerida é a antibioticoterapia profilática<sup>25; 26; 27</sup>, no entanto, estudos em humanos e em animais demonstram que ela pode ser falha<sup>25; 27</sup>. Isso ocorre justamente por que tal conduta está baseada no empirismo, pois não há comprovação científica de que a ONM-M seja um evento desencadeado ou mantido por um processo infeccioso, o que explicaria o insucesso da antibioticoterapia profilática. Adiciona-se a isso o fato de o uso inadequado de um antimicrobiano na antibioticoterapia profilática ser apto de gerar cepas de bactérias antibiótico resistentes, predispor ao desenvolvimento de superinfecções, ocasionar reações alérgicas e interagir com outras drogas, especialmente em pacientes oncológicos, cujo tratamento envolve a utilização sincrônica de diversos medicamentos para o tratamento da doença de base<sup>26; 28; 29</sup>.

Dessa forma, uma proposta para terapia preventiva para a ONM-M a ser avaliada, é a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). A aPDT consiste em uma reação fotoquímica oxigênio-dependente, que ocorre sob ação da luz, na qual a ativação de um agente fotossensibilizador gera altos níveis de espécies reativas de oxigênio. Deste modo, tem-se uma cascata de eventos oxidativos que levam à morte bacteriana pela ação citotóxica<sup>30</sup>. Além da ação antimicrobiana, estudos demonstram que a aPDT ainda preserva grande parte das ações biostimulatórias do laser em baixa potência (LBP)<sup>31; 32</sup>, as quais têm sido reportadas por estudos *in vitro*<sup>33; 34; 35</sup> e *in vivo*<sup>36; 37; 38</sup>. A irradiação com LBP estimula a proliferação de células epiteliais, auxiliando na regeneração dos epitélios de revestimento, induz proliferação de fibroblastos e estimula tais células a produzirem os elementos da matriz extracelular, especialmente o colágeno<sup>39</sup>. Também estimula o processo de diferenciação de osteoblastos e provoca um aumento da atividade dos osteoblastos ativos, o que acelera o processo de reparo ósseo<sup>39</sup>. E ainda é capaz de promover um aumento considerável na neoangiogênese local<sup>40</sup>.

Segundo Takeda<sup>35</sup>, a irradiação com LBP em alvéolos dentais pós-exodontia mostrou-se capaz de promover significativo aumento na angiogênese local, acréscimo na quantidade de fibras colágenas e incremento na quantidade de osteoblastos, o que acelerou demasiadamente o processo de reparo alveolar. Theodoro et al.<sup>41</sup> reportaram que a aPDT se mostrou um tratamento efetivo para reduzir a carga microbiana de alvéolos dentais pós-extração de molares com

periodontite experimental (PE), o que favoreceria o processo de reparação tecidual. Estudos clínicos em humanos mostram que a aPDT atua acelerando o processo de reparação tecidual pós-exodontia, minimizando os sintomas indesejáveis e as complicações pós-operatórias<sup>42; 43; 44</sup>.

De acordo com o observado, os critérios para a terapia fotodinâmica antimicrobiana bem-sucedida são adequado fornecimento de luz, disponibilidade de oxigênio e administração de fotossensibilizador. Uma vez que os fotoantimicrobianos azul de metileno e azul de toluidina já estabelecidos não são ideais, para que se obtenha melhores taxas de sucesso para a inativação fotodinâmica de patógenos é necessário a otimização da estrutura molecular e da dosagem do fotossensibilizador para melhor absorção, penetração e eficácia<sup>45</sup>. Dessa forma, esse estudo busca avaliar um novo fotossensibilizador, o butil azul de toluidina (BuTB). O BuTB foi desenvolvido por modificações físicoquímicas na estrutura molecular do já estabelecido corante de fenotiazina azul de toluidina O (TBO)<sup>46</sup>.

A laserterapia tem sido amplamente empregada na área da saúde, em especial nas diversas especialidades odontológicas. Dentre as modalidades de laserterapia está a aPDT, a qual envolve a combinação de um agente fotoativo, o fotossensibilizador (FS), associado à energia luminosa e na presença de oxigênio. Os seus mecanismos de ataque fotoquímico podem ocorrer por transferência de elétrons (reação tipo I) ou por transferência de energia (reação tipo II), resultando em múltiplos processos de oxidorredução. Essencialmente, a terapia é fundamentada na geração de radicais livres e de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), ambos citotóxicos para microrganismos<sup>47</sup>. Além da ação antimicrobiana, estudos mostram que a aPDT quando se emprega o LBP suas ações biostimulatórias permanecem<sup>39; 40</sup>.

Um dos fatores importantes que determinam a eficácia da aPDT é o fotossensibilizador, assim como sua dosagem e o tempo de sua permanência em contato com o tecido<sup>48</sup>. De maneira geral, um fotossensibilizador deve: proporcionar um alto rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$ ; ser fotoestável; ter um amplo espectro de ação antimicrobiana; expressar uma elevada afinidade de ligação para microrganismos e baixa afinidade de ligação e toxicidade para as células eucariontes normais; não apresentar ação mutagênica; ter baixa toxicidade; apresentar estreita janela terapêutica, ou seja, ter parâmetros de inativação

fotodinâmica necessárias para que as bactérias sejam mortas de forma eficiente sem danos às células eucarióticas normais<sup>45; 49</sup>.

Dentre os diversos fotossensibilizadores, o azul de metileno e azul de toluidina, são os mais comumente usados. Ambos pertencem à família das fenotiazinas. Os dois fotossensibilizadores apresentam estruturas químicas e propriedades físico-químicas similares. O aprimoramento de fotossensibilizadores via modificações físico-químicas de estruturas moleculares tem sido muito realizado com a finalidade de aumentar a sua eficiência. O butil azul de toluidina foi modificado no laboratório da “Faculty of Science, Liverpool John Moores University”, no Reino Unido, pelo Prof. Dr. Mark Wainwright (2016)<sup>46</sup>, e tem apresentado resultados promissores na redução de microrganismos *in vitro*. Recentemente, um estudo de nosso grupo de pesquisa em parceria com o grupo liderado pelo Prof. Dr. Mark Wainwright, constataram que a aPDT empregando o butil azul de toluidina associado ao laser de baixa potência mostra alta efetividade no tratamento da periodontite experimental em ratos<sup>50</sup>, o que nos faz crer que seu emprego na prevenção da ONM-M também possa apresentar grande efetividade.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar a efetividade de múltiplas sessões de aPDT, empregando um novo agente fotossensibilizador, o butil azul de toluidina, associado ao laser de baixa potência, no sítio de extração dental de ratas que apresentam os principais fatores de risco para o desenvolvimento da ONM-M.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento experimental

##### 3.1.1 Animais

Foram utilizadas dezoito ratas (*Rattus norvegicus* - Wistar) senescentes (20 meses), com peso corporal entre 350 - 450g. O protocolo experimental obedeceu às normas estabelecidas pelo “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA - UNESP (PROCESSO FOA nº 562-2018).

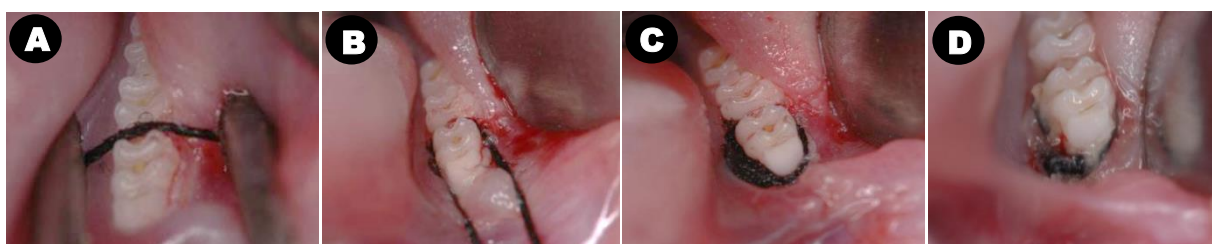
##### 3.1.2 Anestesia

Todos os procedimentos operatórios (instalação da ligadura, exodontia, aPDT e eutanásia) foram realizados sob anestesia geral empregando a associação de cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil) pela via intramuscular.

##### 3.1.3 PE induzida por ligadura

Um dia antes do início do tratamento medicamentoso, foi instalada uma ligadura de algodão (fio de algodão #24; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo de todos os animais, a qual foi mantida por três semanas, com intuito de promover o acúmulo de biofilme e, conseqüentemente, a indução da PE.

**FIGURA 1: Instalação da ligadura de algodão para indução da PE.**



Fotografias evidenciando a instalação da ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo de todos os animais para a indução da PE em VEI, ZOL e ZOL-PDT, 1 dia antes do início do tratamento medicamentoso com zoledronato ou veículo (A-C). Aspecto clínico do primeiro molar inferior esquerdo três semanas após a instalação da ligadura e sua manutenção em posição, no dia da extração dental (D). Fonte: elaborada pelo autor.

##### 3.1.4 Protocolo medicamentoso

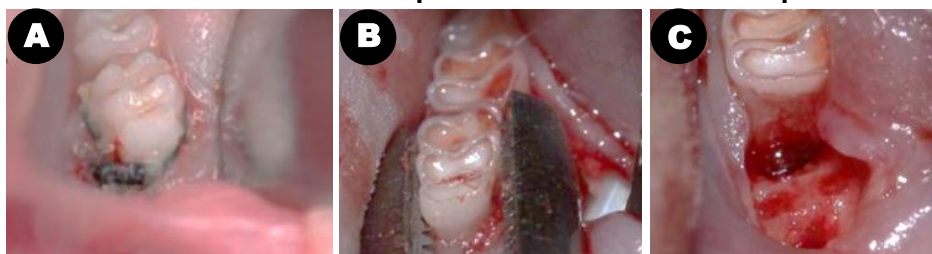
O tratamento medicamentoso teve duração de sete semanas. A administração de veículo ou zoledronato (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA)

foi realizada a cada intervalo de dois dias pela via intraperitoneal. A dose de zoledronato foi de 100µg/Kg, a qual foi diluída em 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%. A dose de zoledronato e plano de tratamento consistiram em uma adaptação, para os animais, do protocolo empregado para complementação da terapia oncológica em humanos<sup>51</sup>.

### 3.1.5 Exodontia

Para exodontia do primeiro molar inferior os animais foram posicionados adequadamente em mesa cirúrgica. Foi executada a antisepsia da cavidade bucal, sindesmotomia, luxação e extração do primeiro molar inferior esquerdo com a utilização de instrumentais odontológicos adaptados.

**FIGURA 2: Exodontia do primeiro molar inferior esquerdo.**



Fotografias evidenciando o aspecto clínico do primeiro molar inferior esquerdo três semanas após a instalação da ligadura e sua manutenção em posição peridental (A), as manobras operatórias para exodontia do primeiro molar inferior esquerdo (B), e o aspecto clínico após a exodontia e limpeza da área com algodão embebido em soro fisiológico (C). Fonte: elaborada pelo autor.

### 3.1.6 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

Foi utilizado como agente fotossensibilizador o butil azul de toluidina na concentração 0,5 mg/ml. Depositou-se 500 µL do fotossensibilizador sobre o sítio de extração do primeiro molar inferior do lado esquerdo por sessenta segundos, e na sequência, a ponteira laser foi posicionada no centro do sítio de extração, paralelamente ao longo eixo do alvéolo dental. O laser de baixa potência empregado no presente estudo foi o Thera Lase® (D.M.C. Equipamentos Ltda®, SP, Brasil) com os seguintes parâmetros: emissor: InGaAlP; comprimento de onda: 660 nm (laser visível - vermelho); potência: 35 mW; modo de operação: laser contínuo; diâmetro do spot: 0,0283 cm<sup>2</sup>; modo de aplicação: laser contato, pontual; energia: 2,1 J/ponto; tempo de aplicação: 60 segundos; quantidade de pontos de aplicação: 1; densidade energética por ponto: 74,2 J/cm<sup>2</sup>; irradiância: 1,23 W/cm<sup>2</sup>.

**FIGURA 3: Sequência de preparo e aplicação da aPDT.**



Fotografias do último dia de aplicação da aPDT, evidenciando o procedimento realizado sobre o sítio de extração dental, aos 0, 2, e 4 dias pós-exodontia, em ZOL-PDT. Aspecto clínico após exodontia e limpeza da área com algodão embebido em soro fisiológico (A), aplicação do fotossensibilizador butil azul de toluidina sobre o sítio de extração dental (B), e aplicação do LBP (C). Fonte: elaborada pelo autor.

### 3.1.7 Grupos experimentais

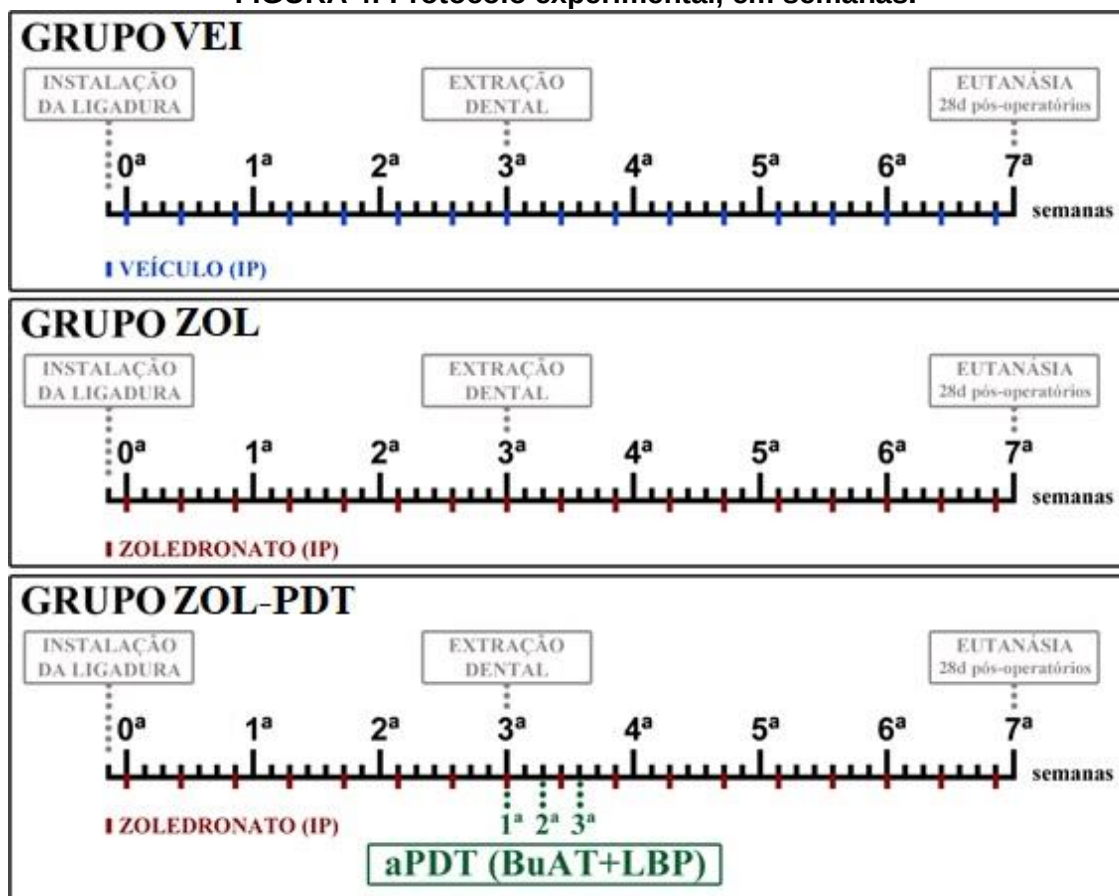
Após a instalação da ligadura, os animais iniciaram o tratamento com veículo ou zoledronato e foram divididos em três grupos experimentais, cada um composto por 6 animais:

**Grupo VEI:** receberam injeção intraperitoneal de 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% a cada intervalo de dois dias, durante sete semanas. Na terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e, decorridos 28 dias pós-operatórios, foram submetidos à eutanásia (Figura 4).

**Grupo ZOL:** receberam injeção intraperitoneal de 0,45 ml de zoledronato diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% a cada intervalo de dois dias, durante sete semanas. Na terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e, decorridos 28 dias pós-operatórios, foram submetidos à eutanásia (Figura 4).

**Grupo ZOL-PDT:** receberam injeção intraperitoneal de 0,45 ml de zoledronato diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% a cada intervalo de dois dias, durante sete semanas. Na terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Aos 0, 2, 4 dias pós-operatórios foi realizada a aPDT no sítio de extração dental. A eutanásia foi realizada 28 dias após a exodontia (Figura 4).

FIGURA 4: Protocolo experimental, em semanas.



Fluxogramas mostrando os diferentes procedimentos executados em seus respectivos intervalos de tempo nos diferentes grupos experimentais (VEI, ZOL e ZOL-PDT). Fonte: elaborada pelo autor.

### 3.1.8 Obtenção das amostras

Aos 28 dias pós cirúrgicos, os animais foram profundamente anestesiados e foi realizada a eutanásia através da perfusão transcardíaca com 100 ml de solução salina fisiológica acrescida de 0,1% de heparina e, em seguida, 800 ml de formaldeído 4% (Sigma Chemical®, Saint Louis, MO, EUA) em tampão fosfato salino (PBS - Sigma Chemical®), 0,1M, 4°C, pH 7,4. As hemimandíbulas esquerdas foram dissecadas e submetidas à pós-fixação por 72 horas.

### 3.1.9 Processamento histológico das amostras

As amostras foram desmineralizadas em 10% de ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) (Sigma Chemical®) em PBS, por um período de 60 dias, e submetidas ao processamento histológico convencional, com inclusão em parafina. A microtomia foi executada de lingual para vestibular, e foram coletadas as secções histológicas da porção do alvéolo dental

anteriormente ocupada pelas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior esquerdo e adjacências.

Para a análise histopatológica do sítio de extração dental e adjacências e para a análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTONF) e da porcentagem de tecido ósseo não vital (PTONV), as secções histológicas foram submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina (HE).

## **3.2 Análise dos resultados**

### **3.2.1 Análise do peso corporal e exame clínico intrabucal**

Foi verificada a condição geral de saúde dos animais durante todo o período experimental e o peso corporal foi monitorado semanalmente. Foi realizado o exame clínico intrabucal, que consistiu na inspeção visual minuciosa da cavidade bucal, em especial, do sítio de extração dental.

### **3.2.2 Análises microscópicas**

Para as análises histopatológica e histométrica foram utilizadas três secções histológicas situadas na porção vestibular, média e lingual do alvéolo dental. A região de interesse consistiu de uma área de 4 mm x 4 mm que englobava a porção do alvéolo anteriormente ocupado pela raiz mesial e pela raiz distal do primeiro molar inferior esquerdo e suas adjacências. O seu limite distal consistiu de uma linha situada paralelamente a superfície da dentina coronária e radicular do segundo molar inferior esquerdo, a partir da qual se estendia para a mesial por 4 mm. O seu limite coronário consistiu de uma linha situada paralelamente ao limite amelo-cementário do segundo molar inferior esquerdo, a partir da qual se estendia para apical por 4 mm. As análises microscópicas foram efetuadas por um histologista certificado, previamente calibrado e cego aos tratamentos.

### **3.2.3 Análise histológica do sítio de extração dental e adjacências**

Os parâmetros avaliados, através de microscopia óptica, na região de interesse, foram os seguintes: 1) intensidade da resposta inflamatória local; 2) extensão do processo inflamatório; 3) padrão de celularidade e de estruturação do tecido epitelial; 4) padrão de celularidade e de estruturação do tecido conjuntivo; 5) padrão de celularidade e de estruturação do tecido ósseo.

### **3.2.4 Análise histométrica da PTONF e da PTONV**

Na região de interesse foram capturadas as imagens utilizando-se câmera digital (AxioCam®, Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (AxioLab®) e conectada a um microcomputador. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Axiovision 4.8.2®, Carl Zeiss), foi mensurada a quantidade total de tecido ósseo, e, em seguida, foi calculada a PTONF e a PTONV. A PTONV consistiu das regiões onde mais de dez lacunas adjacentes se apresentavam vazias ou contendo restos necróticos de osteócitos.

### **3.2.5 Análise estatística**

Empregou-se o programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brasil). O tamanho da amostra foi calculado para assegurar um poder do teste estatístico de 95% ( $p < 0,05$ ). Para a análise histopatológica foram empregados os testes de Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. Para a análise histométrica da PTONF e PTONV foram empregados os testes de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Peso corporal e exame clínico intrabucal

O peso corporal dos animais dos grupos VEI e ZOL-PDT se mantiveram dentro de um padrão de normalidade e constantes durante todo o período experimental. Os animais do grupo ZOL apresentaram uma leve diminuição no peso corporal após a exodontia, a qual se manteve até o final do período experimental.

Ao exame clínico intrabucal, em ZOL observou-se uma loja cirúrgica mais ampla que nos demais grupos experimentais, cuja mucosa sobrejacente não se reconstituiu. Em quatro espécimes deste grupo havia exposição óssea e ampliação ainda maior do sítio de extração. Nos grupos VEI e ZOL-PDT houve reparação completa, ou quase completa, do sítio de extração dental, com uma loja cirúrgica bem menor e recoberta total ou parcialmente por tecidos moles.

### 4.2 Reparo tecidual no sítio de extração dental e adjacências

O grupo ZOL apresentou um grande comprometimento do processo de reparação tecidual, apresentando características histológicas condizentes com um quadro de ONM-M. Os grupos VEI e ZOL-PDT apresentaram um processo de reparação tecidual favorável do sítio de extração dental e mucosa sobrejacente. Os parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos conjuntivo, epitelial e ósseo durante o processo de reparação alveolar pós-exodontia em VEI, ZOL e ZOL-PDT aos 28 dias pós-operatórios, estão apresentados na **TABELA 1** e na **TABELA 2**. O aspecto histológico da lâmina própria da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental e o tecido contido no interior do sítio de extração dental em VEI, ZOL e ZOL-PDT aos 28 dias pós-operatórios, estão apresentados respectivamente na **FIGURA 5** e **FIGURA 6**.

**TABELA 1: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do nível de inflamação dos tecidos durante o processo de reparação pós-extração dental em VEI, ZOL e ZOL-PDT aos 28 dias pós-operatórios.**

| ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA: NÍVEL DE INFLAMAÇÃO                               |                          |           |           |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|-----------|
| PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES                                           | PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES |           |           |
|                                                                            | GRUPOS EXPERIMENTAIS     |           |           |
|                                                                            | VEI                      | ZOL       | ZOL-PDT   |
| <b>INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL</b>                          |                          |           |           |
| (1) ausência de inflamação                                                 | 100                      | -         | 66,6      |
| (2) pequena quantidade de células inflamatórias                            | -                        | -         | 33,3      |
| (3) moderada quantidade de células inflamatórias                           | -                        | 33,4      | -         |
| (4) grande quantidade de células inflamatórias                             | -                        | 66,6      | -         |
| <b>MEDIANA</b>                                                             | <b>1</b>                 | <b>4†</b> | <b>1‡</b> |
| <b>EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO</b>                                   |                          |           |           |
| (1) ausência de inflamação                                                 | 100                      | -         | 66,6      |
| (2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo                     | -                        | -         | 33,3      |
| (3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo, sem atingir o tecido ósseo | -                        | 33,4      | -         |
| (4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo              | -                        | 66,6      | -         |
| <b>MEDIANA</b>                                                             | <b>1</b>                 | <b>4†</b> | <b>1‡</b> |

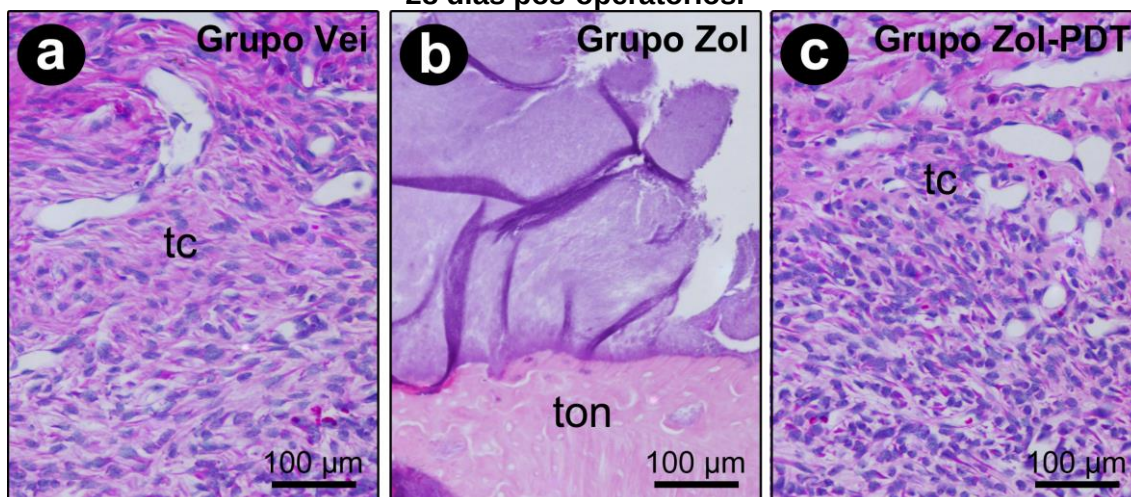
Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL. Fonte: elaborada pelo autor.

**TABELA 2: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do padrão de estruturação tecidual durante o processo de reparação pós-extração dental em em VEI, ZOL e ZOL-PDT aos 28 dias pós-operatórios.**

| <b>ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA: PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO TECIDUAL</b>                                                                                                                         |                                 |            |                |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------|----------------|--|
| <b>PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES</b>                                                                                                                                                 | <b>PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES</b> |            |                |  |
|                                                                                                                                                                                         | <b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b>     |            |                |  |
|                                                                                                                                                                                         | <b>VEI</b>                      | <b>ZOL</b> | <b>ZOL-PDT</b> |  |
| <b>PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO EPITELIAL</b>                                                                                                                     |                                 |            |                |  |
| <b>(1)</b> tecido epitelial de moderada espessura recobrimdo completamente o sítio de extração                                                                                          | 66,6                            | -          | 33,4           |  |
| <b>(2)</b> tecido epitelial de delgada espessura recobrimdo completamente o sítio de extração                                                                                           | 33,4                            | -          | 66,6           |  |
| <b>(3)</b> delgada camada de tecido epitelial apenas nas margens da ferida cirúrgica aberta                                                                                             | -                               | 33,4       | -              |  |
| <b>(4)</b> ausência de tecido epitelial sobre a ferida cirúrgica aberta                                                                                                                 | -                               | 66,6       | -              |  |
| <b>MEDIANA</b>                                                                                                                                                                          | <b>1</b>                        | <b>4†</b>  | <b>2‡</b>      |  |
| <b>PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO</b>                                                                                                                    |                                 |            |                |  |
| <b>(1)</b> moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas                                                                                                  | 66,6                            | -          | 33,4           |  |
| <b>(2)</b> moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas                                                                                                         | 33,4                            | -          | 66,6           |  |
| <b>(3)</b> pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas                                                                                                          | -                               | 16,6       | -              |  |
| <b>(4)</b> desestruturação tecidual severa com áreas de necrose tecidual                                                                                                                | -                               | 83,4       | -              |  |
| <b>MEDIANA</b>                                                                                                                                                                          | <b>1</b>                        | <b>4†</b>  | <b>2‡</b>      |  |
| <b>PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO</b>                                                                                                                         |                                 |            |                |  |
| <b>(1)</b> ausência de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo mais da metade do alvéolo dental                                                       | 83,4                            | -          | 66,6           |  |
| <b>(2)</b> ausência ou presença de poucas áreas de osso de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo menos da metade do alvéolo dental                  | 16,6                            | -          | 33,4           |  |
| <b>(3)</b> presença de poucas áreas de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo menos de um terço do alvéolo dental                                    | -                               | 16,6       | -              |  |
| <b>(4)</b> presença de muitas áreas de osso não vital nas adjacências do alvéolo com ausência de neoformação óssea ou trabéculas ósseas preenchendo menos de um terço do alvéolo dental | -                               | 83,4       | -              |  |
| <b>MEDIANA</b>                                                                                                                                                                          | <b>1</b>                        | <b>4†</b>  | <b>1‡</b>      |  |

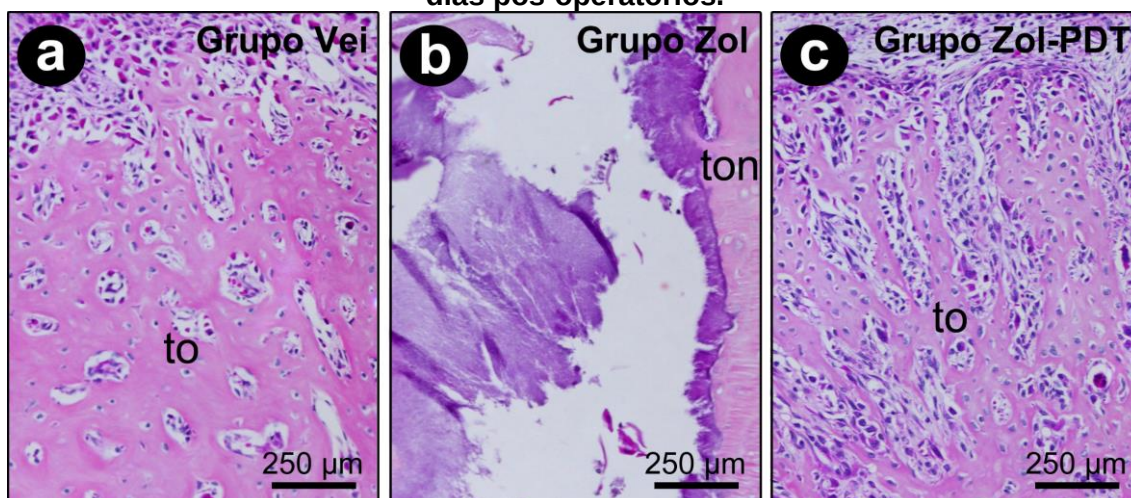
Símbolos: †, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo ZOL. Fonte: elaborada pelo autor.

**FIGURA 5: Aspectos histológico da lâmina própria em VEI, ZOL e ZOL-PDT aos 28 dias pós-operatórios.**



Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico da lâmina própria da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios nos grupos VEI (a), ZOL (b) e ZOL-PDT (c). Abreviações: tc, tecido conjuntivo; ton, tecido ósseo não vital. Coloração: HE. Aumento original: 250x. Barras de escala: 100 µm. Fonte: elaborada pelo autor.

**FIGURA 6: Aspectos histológico do sítio de extração dental em C+, C- e T aos 28 dias pós-operatórios.**



Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios nos grupos VEI (a), ZOL (b) e ZOL-PDT (c). Abreviações: to, tecido ósseo; ton, tecido ósseo não vital. Coloração: HE. Aumento original: 100x. Barras de escala: 250 µm. Fonte: elaborada pelo autor.

### 4.3 PTONF no sítio de extração dental

No grupo ZOL a porcentagem de TONF no sítio de extração dental se mostrou significativamente menor que no grupo VEI ( $p < 0,01$ ) e no grupo ZOL-PDT ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de TONF entre VEI e ZOL-PDT (**GRÁFICO 1**).

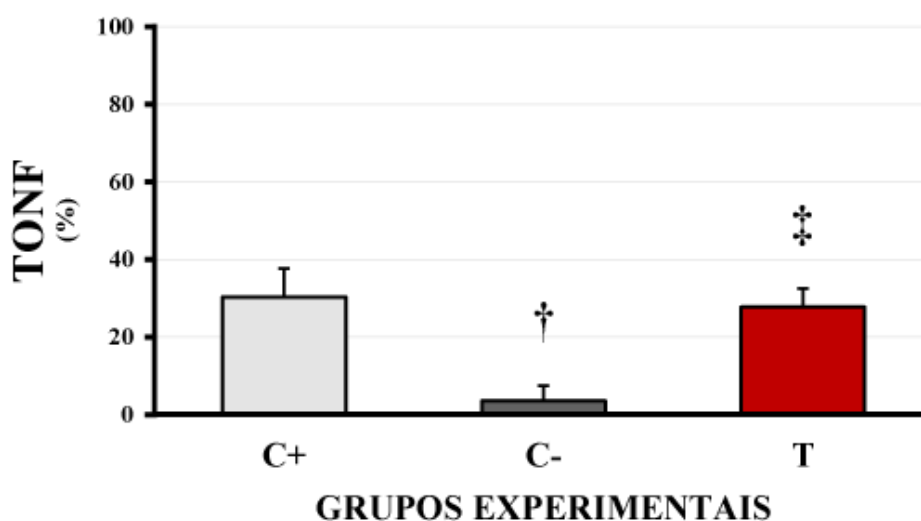
**GRÁFICO 1: Porcentagem de TONF.**

Gráfico apresentando a porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais. Teste estatístico: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.4 PTONV no sítio de extração dental

No grupo ZOL a porcentagem de TONV no sítio de extração dental e adjacências se mostrou significativamente maior que no grupo VEI ( $p < 0,01$ ) e no grupo T ( $p < 0,01$ ). No grupo ZOL-PDT a porcentagem de TONV se apresentou significativamente maior que no grupo C+ ( $p < 0,01$ ) (**GRÁFICO 2**).

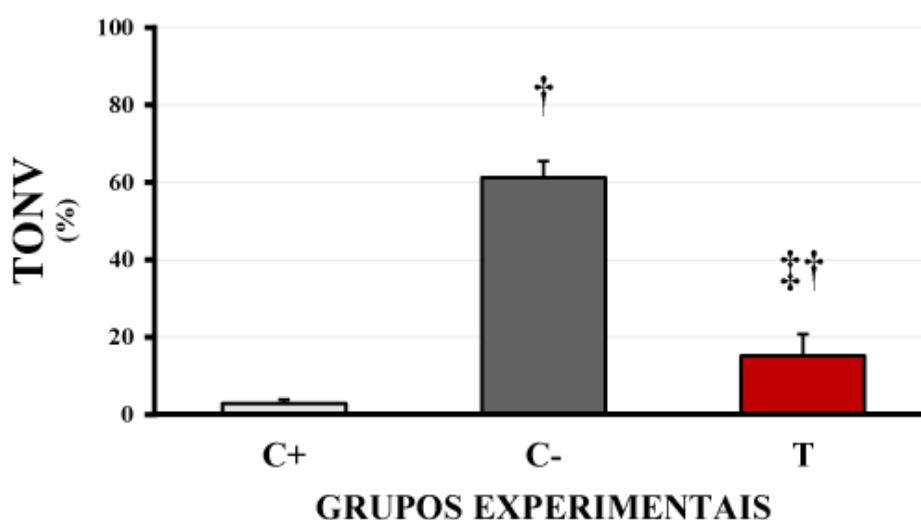
**GRÁFICO 2: Porcentagem de TONV.**

Gráfico apresentando a porcentagem de tecido ósseo não vital (TONV) no sítio de extração dental e em suas adjacências nos diferentes grupos experimentais. Teste estatístico: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI. Fonte: elaborado pelo autor.

## 5. DISCUSSÃO

As drogas com ação antirreabsortiva, como zoledronato, se mostram uma opção muito efetiva para o tratamento de osteopatias que desencadeiam osteopenia/osteoporose, assim como, para controle de dor óssea, regulação da hipercalcemia e inibição da progressão de metástase óssea em neoplasias malignas osteotrópicas<sup>1; 3</sup>. Todavia, um efeito adverso ocasionado por este tipo de droga é a ONM-M, cujo tratamento, seja ele preventivo ou curativo, ainda é um grande desafio para a odontologia<sup>10; 18; 19; 20; 21</sup>. Dentre as principais proposta terapêutica preventiva para a ONM-M está a antibioticoterapia prolongada, no entanto, esta estratégia pode se mostrar falha em muitos casos<sup>25; 27</sup>. O propósito do presente estudo foi avaliar a efetividade e a segurança de múltiplas sessões de aPDT, empregando um novo agente fotossensibilizador, o butil azul de toluidina (BuAT), associado ao laser de baixa potência (LBP), no sítio de extração dental de ratas que apresentam os principais fatores de risco para o desenvolvimento da ONM-M. A aPDT, empregando o BuAT associado ao LBP, exerceu efeitos positivos sobre o processo de reparo alveolar e evitou a ocorrência da ONM-M pós exodontia.

O estudo da etiopatogenia de muitas doenças, assim como, a avaliação da efetividade e segurança de propostas de tratamento, sejam elas preventivas e/ou curativas apresentam inúmeras limitações nos estudos em humanos. Diante disso, modelos experimentais apropriados em animais contribuem muito para a elucidação da etiopatogenia e para a proposição/avaliação de tratamentos, e com isso desempenham um importante papel no direcionamento de algumas pesquisas clínicas em humanos. No presente estudo foi empregado um modelo experimental animal de ONM-M estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa. Neste modelo experimental foram utilizadas ratas senescentes, tendo em vista que a ONM-M acomete com maior frequência mulheres com idade avançada. O uso de potentes drogas antirreabsortivas empregadas para complementação da terapia oncológica está relacionado com a maioria dos casos de ONM-M, em função disso empregou-se o zoledronato, o bisfosfonato mais potente, buscando mimetizar um protocolo para a complementação da terapia oncológica, no entanto, fazendo uma adequação que levou em consideração principalmente a superfície corporal e o metabolismo mais

acelerado do rato. Além disso, este estudo procurou criar uma condição clínica local desfavorável capaz de elevar significativamente as chances da ocorrência de ONM-M. Estudos clínicos mostram que a exodontia é um importante fator de risco local, especialmente quando há algum foco infeccioso/inflamatório associado ao dente<sup>3; 12; 14</sup>. Diante disso, no presente estudo foi realizada a exodontia de um molar inferior acometido por periodontite experimental.

Um grande diferencial do presente estudo foi utilizar um novo agente fotossensibilizador fenotiazínico, o BuAT, na aPDT, o qual foi associado ao LBP. Atualmente, os fotossensibilizadores fenotiazínicos estão entre os mais empregados na aPDT. Dentre os principais membros desta família estão o azul de metileno e o azul de toluidina. Em função de sua natureza catiônica tais fotossensibilizadores interagem tanto com bactérias Gram-positivas quanto com bactérias Gram-negativas<sup>46</sup> e até mesmo com outros microrganismos, ou seja, possuem um amplo espectro de ação, o que faz com que sejam muito empregados para controle de infecções em diferentes locais. O azul de toluidina é um dos agentes fotossensibilizadores mais empregados na odontologia, especialmente como terapia adjuvante ao tratamento mecânico convencional da periodontite. O BuAT foi desenvolvido por meio de modificações físico-químicas na estrutura do azul de toluidina. Tais modificações foram realizadas para melhorar ainda mais os seus efeitos fotodinâmicos, dentre elas estão, o aumento da capacidade lipofílica e a diminuição do comportamento de coagregação molecular, o que resulta em maior capacidade de interação celular e maior eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio<sup>46</sup>.

Nuernberg et al. (2020)<sup>50</sup> realizaram o primeiro estudo in vivo em animais onde o tratamento periodontal foi efetuado com raspagem e alisamento radicular aliado com aPDT, empregando diferentes concentrações de BuAT em associação com irradiação com LBP. Neste estudo foi comprovada grande eficácia aPDT, empregando o BuAT e LBP, como tratamento coadjuvante da periodontite experimental, especialmente quando o BuAT foi utilizado na concentração de 0,5mg/ml. Utilizando esta concentração de BuAT na aPDT houve redução da perda óssea alveolar, modulação da inflamação local e favorecimento do processo de reparo tecidual. Foi baseado em tal estudo que empregamos o BuAT na concentração de 0,5mg/ml na aPDT, e os efeitos positivos citados neste estudo corroboram os achados do presente estudo,

especialmente no que se refere a modulação da inflamação local e favorecimento do processo de reparação tecidual.

No presente estudo foi constatado que o emprego da aPDT, empregando como agente fotoantimicrobiano, o BuAT, em associação com a irradiação com LBP se mostrou uma terapia preventiva efetiva para evitar a ocorrência de ONM-M pós-exodontia. Este tratamento preventivo foi capaz de promover a regeneração epitelial, modular a resposta inflamatória local, melhorar a reparação do tecido conjuntivo e estimular a neoformação óssea alveolar. Além disso, provocou uma redução significativa na quantidade de tecido ósseo não vital no sítio de extração dental e em suas adjacências, uma característica histológica comum quando se emprega medicamentos com potente ação antirreabsortiva.

O emprego do BuAT na aPDT se mostrou uma estratégia efetiva para prevenir a ocorrência de ONM-M pós-exodontia em animais, todavia, deve ser levado em consideração que o fotossensibilizador é um dos componentes da aPDT. A utilização de estratégias que visam o aprimoramento de tais agentes é de suma importância, pois com elas se pode potencializar sobremaneira os efeitos benéficos da aPDT. No entanto, mesmo empregando agentes fotossensibilizadores tradicionais os efeitos positivos da aPDT na prevenção da ONM-M tem sido reportados tanto em estudos animais quanto em relatos de casos em humanos.

Os achados do presente estudo corroboram com um estudo prévio empregando um outro agente fotoantimicrobiano fenotiazínico. Ervolino et al. (2019)<sup>52</sup>, empregaram este mesmo modelo experimental para avaliar a ação preventiva da aPDT no sítio de extração dental. O estudo empregou como fotoantimicrobiano o azul de metileno, na concentração de 100 µg/ml, tempo de pré-irradiação de 60 segundos, seguido da irradiação com LBP (660 nm, 35 mW, 74,2 J/cm<sup>2</sup>) aplicado por 60 segundo no centro da ferida cirúrgica com uma ponteira de 0,0283 cm<sup>2</sup> aos 0, 2 e 4 dias pós-exodontia. O referido estudo mostrou que a aPDT melhorou o processo de reparo alveolar e evitou a ocorrência da ONM-M.

Sarkarat et al. (2018)<sup>53</sup>, empregando um modelo experimental semelhante, também reportaram que a aPDT se mostrou efetiva na prevenção da ONM-M. Neste estudo empregou-se como fotossensibilizador a indocianina

verde (1 mg/ml) com imediata irradiação com LBP (808 nm, 250 W, 39,04 J/cm<sup>2</sup>) em três pontos distintos: superfície vestibular e superfície lingual do sítio de extração, empregando uma ponteira de 7 mm de diâmetro, e interior do alvéolo dental, empregando uma ponteira de 1 mm de diâmetro. As sessões de aPDT foram realizada imediatamente após a exodontia e se repetiram semanalmente por sete semanas<sup>53</sup>.

Estudos clínicos em humanos reportaram uma série de casos clínicos onde a aPDT foi empregada preventivamente após a extração dental ou a remoção de implantes em pacientes que faziam uso de bisfosfonato de uso oral na dose osteoporótica. Os estudos empregaram como fotossensibilizador o cloreto de metilenotionina (10 mg/ml) com tempo de pré-irradiação de 180 segundos, seguida da irradiação local com LBP (660 nm, 100 mW) empregando uma sonda que, com movimentos circulares, permanecia irradiando uma área de cerca de 3cm<sup>2</sup> durante 60s com uma fluência de 3,6 J/cm<sup>2</sup>, e cuja densidade energética total variou de acordo com a dimensão da ferida cirúrgica. Após a aPDT os pacientes foram submetidos semanalmente a sessões de fotobiomodulação empregando o LBP durante seis semanas. Ao longo de todo o período avaliado não foi observada nenhuma alteração nas feridas cirúrgicas. Nestes estudos concluiu-se que a aPDT pode ser uma promissora estratégia de prevenção para evitar a ocorrência de ONM-M em pacientes sob tratamento de osteoporose com bisfosfonatos e submetidos à extração dental ou remoção de implantes<sup>54; 55</sup>.

Além do agente fotossensibilizador, a luz utilizada na aPDT também é capaz de potencializar ainda mais os efeitos positivos desta terapia. No presente estudo optou-se pelo emprego da irradiação com LBP especialmente por seus efeitos bioestimulatórios. O LBP é capaz de estimular a reparação de tecidos moles e tecidos duros via incremento da proliferação celular, estimulação da síntese de colágeno, aumento da neovascularização, e redução nos níveis de citocinas com atividade pró-inflamatórias<sup>56; 57; 58; 59; 60</sup>. Estudos empregando apenas o LBP, ou seja, apenas a fotobiomodulação local, sem o uso de agente fotossensibilizador, reportaram efeitos positivos locais importantes em modelos experimentais de ONM-M<sup>61</sup> e em casos clínicos em humanos<sup>62; 63; 64</sup>.

Tais achados demonstram que cada um dos componentes da aPDT, assim como o seu protocolo, são de extrema importância para o sucesso desta técnica.

Além disso, a busca por aprimorar e melhorar os agentes fotossensibilizadores, a luz empregada, e os protocolos de uso da aPDT são capazes de potencializar seus efeitos benéficos.

A ocorrência da ONM-M reduz a qualidade de vida dos pacientes, especialmente quando ocorre concomitantemente com o tratamento de doenças graves, como o câncer. O tratamento da ONM-M, embora necessário e improtelável, também afetam negativamente tais pacientes, em especial aqueles sob terapia oncológica, tendo em vista que é invasivo, prolongado, de prognóstico duvidoso e pode resultar em graves sequelas. A utilização de estratégias terapêuticas preventivas é o ideal em se tratando da ONM-M. Os achados do presente estudo reforçam ainda mais os estudos em animais que mostram a efetividade da aPDT na prevenção da ONM-M. Além disso, é mais um estudo que procura direcionar futuras pesquisas clínicas envolvendo a prevenção da ONM-M via emprego da aPDT.

Estudos clínicos controlados e randomizados visando o estabelecimento de protocolos preventivos para serem empregados em pacientes que fazem uso de drogas com ação antirreabsortiva e que necessitam de intervenções odontológicas invasivas ainda não foram realizados e são extremamente necessários. A ação antimicrobiana, o potente efeito bioestimulatório, a ausência de efeitos adversos, a não promoção de resistência bacteriana, o baixo custo e a fácil execução, colocam a aPDT como uma das estratégias preventivas mais promissora para se evitar a ONM-M pós-exodontia.

## **6. CONCLUSÃO**

Dentro dos limites e das condições empregadas no presente estudo, conclui-se que o emprego da aPDT, empregando como agente fotoantimicrobiano, o BuAT, em associação com a irradiação com LBP se mostrou uma terapia preventiva capaz de promover a regeneração epitelial, modular a resposta inflamatória local, melhorar a reparação do tecido conjuntivo e estimular a neoformação óssea alveolar, evitando desta forma a ocorrência de ONM-M pós-exodontia.

## REFERÊNCIAS

1. DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin Proc**, v. 83, n. 9, p. 1032-45, 2008.
2. MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. In: (Ed.). **J Oral Maxillofac Surg**. United States, v.61, p.1115-7, 2003.
3. HAMADEH, I. S.; NGWA, B. A.; GONG, Y. Drug induced osteonecrosis of the jaw. **Cancer Treat Rev**, v. 41, n. 5, p. 455-64, 2015.
4. ROGERS, M. J. et al. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 34-41, 2011.
5. ABE, K. et al. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. **Int J Mol Med**, v. 29, p. 1007-15, 2012.
6. COXON, F. P.; ROGERS, M. J. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. **Calcif Tissue Int**, v. 72, n. 1, p. 80-4, 2003.
7. EBETINO, F. H. et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 20-33, 2011.
8. ORY, S. et al. Rho GTPases in osteoclasts: Orchestrators of podosome arrangement. **Eur J Cell Biol Suppl**, v. 87, p. 469-77, 2008.
9. RUSSELL, R. Bisphosphonates: The first 40 years. **Bone**, v. 49, p. 2-19, 2011.
10. RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 72, n. 10, p. 1938-56, 2014.
11. GÓMEZ FONT, R.; MARTÍNEZ GARCÍA, M. L.; OLMOS MARTÍNEZ, J. M. Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments. Update. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 13, n. 5, p. E318-24, 2008.
12. OTTO, S. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 40, n. 4, p. 303-9, 2012.
13. KANG, B. et al. Periapical Disease and Bisphosphonates Induce Osteonecrosis of the Jaws in Mice. **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 7, p. 1631-1640, 2013.
14. MCGOWAN, K.; MCGOWAN, T.; IVANOVSKI, S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: A systematic review. **Oral Dis**, v. 24, n. 4, p. 527-536, May 2018.

15. HANASONO, M. M. et al. Mandibulectomy and Free Flap Reconstruction for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws. **JAMA Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 139, n. 11, p. 1135-1142, 2013.
16. RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 67, n. 5 Suppl, p. 2-12, 2009.
17. WEITZMAN, R. et al. Critical review: Updated recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in cancer patients-May 2006. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 62, p. 148-52, 2007.
18. AGHALOO, T.; HAZBOUN, R.; TETRADIS, S. Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaws. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 27, n. 4, p. 489-96, 2015.
19. BADEL, T. et al. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate. **Coll Antropol**, v. 37, p. 645-51, 2013.
20. MIGLIORATI, C. A. et al. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates in cancer: a narrative review. **Nat Rev Endocrinol**, v. 7, n. 1, p. 34-42, 2011.
21. ALLEN, M. R.; BURR, D. B. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 67, n. 5 Suppl, p. 61-70, 2009.
22. SHANNON, J.; MODELEVSKY, S.; GRIPPO, A. A. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. **J Am Geriatr Soc**, v. 59, n. 12, p. 2350-5, 2011.
23. SIDDIQI, A.; PAYNE, A. G.; ZAFAR, S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a medical enigma? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 108, n. 3, p. e1-8, 2009.
24. LAM, D. K. et al. A review of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws and its management. **J Can Dent Assoc**, v. 73, n. 5, p. 417-22, 2007.
25. HOEFERT, S.; EUFINGER, H. Relevance of a prolonged preoperative antibiotic regime in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 69, n. 2, p. 362-80, 2011.
26. LITTLE, J. W. et al. Antibiotic prophylaxis in dentistry: an update. **Gen Dent**, v. 56, n. 1, p. 20-8, 2008.
27. LÓPEZ-JORNET, P. et al. Perioperative antibiotic regimen in rats treated with pamidronate plus dexamethasone and subjected to dental extraction: a study of the changes in the jaws. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 69, n. 10, p. 2488-93, 2011.
28. KUNIN, C. M. et al. Report of a symposium on use and abuse of antibiotics worldwide. **Rev Infect Dis**, v. 12, n. 1, p. 12-9, 1990.

29. PAGE, C. P. et al. Antimicrobial prophylaxis for surgical wounds. Guidelines for clinical care. **Arch Surg**, v. 128, n. 1, p. 79-88, 1993.
30. HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Curr Opin Microbiol**, v. 33, p. 67-73, 2016.
31. QIAO, J. et al. Photodynamic effects on human periodontal-related cells in vitro. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 11, n. 3, p. 290-9, 2014.
32. STEIN, E. et al. Phenothiazine chloride and soft laser light have a biostimulatory effect on human osteoblastic cells. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 1, p. 71-7, 2009.
33. GUZZARDELLA, G. A. et al. Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. **Lasers Med Sci**, v. 17, n. 3, p. 216-20, 2002.
34. OZAWA, Y. et al. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. **Bone**, v. 22, n. 4, p. 347-54, 1998.
35. TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 17, n. 6, p. 388-91, 1988.
36. BRAUN, A. et al. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 10, p. 877-84, 2008.
37. DARRAS-VERCAMBRE, S. et al. Photodynamic action of red light for treatment of erythrasma: preliminary results. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 22, n. 3, p. 153-6, 2006.
38. LUI, J.; CORBET, E. F.; JIN, L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 46, n. 1, p. 89-96, 2011.
39. ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N. A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 237-49, 2012.
40. SCHINDL, A. et al. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **Br J Dermatol**, v. 148, n. 2, p. 334-6, 2003.
41. THEODORO, L. H. et al. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontally infected tooth sockets in rats. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 2, p. 677-83, 2015.
42. BATINJAN, G. et al. Thermographic monitoring of wound healing and oral health-related quality of life in patients treated with laser (aPDT) after impacted

mandibular third molar removal. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 43, n. 12, p. 1503-8, 2014.

43. BATINJAN, G. et al. Assessing Health-Related Quality of Life with Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) and Low Level Laser Therapy (LLLT) after Third Molar Removal. **J Lasers Med Sci**, v. 4, n. 3, p. 120-6, 2013.

44. NEUGEBAUER, J.; JOZSA, M.; KÜBLER, A. Antimicrobial photodynamic therapy for prevention of alveolar osteitis and post-extraction pain. **Mund Kiefer Gesichtschir**, v. 8, n. 6, p. 350-5, 2004.

45. MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers Med Sci**, v. 22, n. 2, p. 83-91, 2007.

46. WAINWRIGHT, M.; O'KANE, C.; RAWTHORE, S. Phenothiazinium photosensitisers XI. Improved toluidine blue photoantimicrobials. **J Photochem Photobiol B**, v. 160, p. 68-71, 2016.

47. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.

48. SORKHDINI, P. et al. Effect of hydrosoluble chlorine-mediated antimicrobial photodynamic therapy on clinical parameters and cytokine profile in ligature-induced periodontitis in dogs. **J Periodontol**, v. 84, n. 6, p. 793-800, 2013.

49. SOUKOS, N. S.; GOODSON, J. M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontol 2000**, v. 55, n. 1, p. 143-66, 2011.

50. NUERNBERG, M. A. A. et al. Effects of butyl toluidine blue photosensitizer on antimicrobial photodynamic therapy for experimental periodontitis treatment in rats. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 31, p. 101868, 2020.

51. SILVA, P. G. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 9, p. 1237-45, 2015.

52. ERVOLINO, E. et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. **Bone**, v. 120, p. 101-113, 2019.

53. SARKARAT, F. et al. Efficacy of Photodynamic Therapy in Minimizing Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws After Dental Extraction: A Preliminary Animal Study. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 77, n. 2, p. 307-314, 2019.

54. POLI, P. P.; SOUZA, F.; MAIORANA, C. Adjunctive use of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaws: A case report. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 23, p. 99-101, 2018.

55. POLI, P. P. et al. Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in the prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw following dentoalveolar surgery: A case series. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 27, p. 117-123, 2019.
56. WOODRUFF, L. D. et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. **Photomed Laser Surg**, v. 22, n. 3, p. 241-7, 2004.
57. PINHEIRO, A. L.; GERBI, M. E. Photoengineering of bone repair processes. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 2, p. 169-78, 2006.
58. GARCIA, V. G. et al. Influence of low-level laser therapy on wound healing in nicotine-treated animals. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 2, p. 437-43, 2012.
59. USUMEZ, A. et al. Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 6, p. 1807-13, 2014.
60. GARCIA, V. G. et al. Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 42, n. 7, p. 1196-1202, 2014.
61. STATKIEVICZ, C. et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. **J Photochem Photobiol B**, v. 184, p. 7-17, 2018.
62. DEL PILAR RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, M. et al. The Effectiveness of the Low-Level Laser, Antibiotic and Surgical Therapy in the Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws: A Case Report. **J Lasers Med Sci**, v. 11, n. 1, p. 98-103, 2020.
63. MOMESSO, G. A. C. et al. Successful Use of Lower-Level Laser Therapy in the Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. **J Lasers Med Sci**, v. 8, n. 4, p. 201-203, 2017.
64. VESCOVI, P. et al. Tooth extractions in high-risk patients under bisphosphonate therapy and previously affected with osteonecrosis of the jaws: surgical protocol supported by low-level laser therapy. **J Craniofac Surg**, v. 26, n. 3, p. 696-9, 2015.