

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DO DEBRIDAMENTO
MECÂNICO NO TRATAMENTO DA PERI-IMPLANTITE
EXPERIMENTAL EM RATAS TRATADAS COM ZOLEDRONATO

LUAN FELIPE TORO

ORIENTADOR: PROF. ASSOC. EDILSON ERVOLINO

COORIENTADOR: PROF. ASSOC. CLÁUDIO APARECIDO CASATTI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Toro, Luan Felipe.

Avaliação da eficácia e segurança do debridamento mecânico no tratamento da peri-implantite experimental em ratas tratadas com zoledronato / Luan Felipe Toro. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Edilson Ervolino

Coorientador: Cláudio Aparecido Casatti

Capes: 20600003

1. Ácido zoledrônico. 2. Desbridamento. 3. Implantes dentários. 4. Osteonecrose. 5. Peri-implantite.

Palavras-chave: Ácido zoledrônico; Desbridamento; Implantes dentários; Osteonecrose; Peri-implantite.

LUAN FELIPE TORO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DO DEBRIDAMENTO MECÂNICO NO
TRATAMENTO DA PERI-IMPLANTITE EXPERIMENTAL EM RATAS TRATADAS
COM ZOLEDRONATO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Orientador: Prof. Assoc. Edilson Ervolino

Coorientador: Prof. Assoc. Cláudio Aparecido Casatti

Comissão examinadora:

Prof. Assoc. Edilson Ervolino

Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araçatuba, UNESP

Orientador

Prof. Dr. Gestter Willian Lattari Tessarin

Centro Universitário do Norte de São Paulo, UNORTE

Prof^a. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto

Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araçatuba, UNESP

Prof. Tit. Valdir Gouveia Garcia

Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araçatuba, UNESP

Prof^a. Tit. Maeli Dal Pai

Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP

Aprovada em ____/____/____.

Botucatu – SP

DADOS CURRICULARES

LUAN FELIPE TORO

- Nascimento:** 03 de novembro de 1992
Birigui – SP
- Filiação:** Valdir Olgado Toro
Márcia Sueli Jorge Toro
- 2008 - 2010:** Ensino Médio
Escola Estadual “Prof^a. Regina Valarini Vieira”, Birigui – SP
- 2011 - 2016:** Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araçatuba – SP
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
- 2017 - 2019:** Curso de Mestrado Acadêmico em Biologia Geral e Aplicada
Área de concentração: Biologia Celular Estrutural e Funcional
Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu – SP
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
- 2019 - 2023:** Curso de Doutorado em Biologia Geral e Aplicada
Área de concentração: Biologia Celular Estrutural e Funcional
Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu – SP
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

edicatória

Aos meus pais, Valdir e Marcia.

À minha irmã, Aniele.

Por sempre viverem meus sonhos. Esta conquista é nossa!



gradecimentos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, em primeiro lugar, e à **Nossa Senhora**, minha constante fonte de intercessão junto a Ele, pelo dom da vida e por me permitirem alcançar tamanha realização. Pela saúde sempre intacta em meio aos tempos turbulentos pelos quais passamos. Pela fortaleza, consolo e amparo nos momentos mais difíceis e duvidosos. Pelos incontáveis sorrisos, alegrias e vitórias conquistadas ao longo do caminho. Minha eterna reverência, gratidão e amor!

Ao meu pai, **Valdir O. Toro**, exemplo de hombridade, caráter, disciplina e afeto. À minha mãe, **Marcia S. J. Toro**, tradução literal das palavras doação e dedicação. Pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões e por não medirem quaisquer esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos. Os meus passos até aqui só foram possíveis porque eu tinha um solo firme para me sustentar. Obrigado por tanto, sempre. Eu amo vocês!

À minha irmã, **Aniele M. T. Fagundes**, meu exemplo de organização, empenho, capricho e vontade de ser cada dia melhor. Por todas as conversas, preocupações e conselhos. Eu amo você e estarei sempre aqui torcendo pela sua felicidade! E ao meu **Apolo**, por me ensinar da maneira mais pura e espontânea que o verdadeiro amor independe das espécies.

Ao meu eterno mestre, orientador e hoje grande amigo, **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**, por me estender as mãos desde a iniciação científica. Por me ensinar não somente a histologia que eu tanto amo, ou as bases da pesquisa científica, mas por sempre ir além do profissional, demonstrando que é possível ser gigante sem precisar diminuir qualquer pessoa. Por toda convivência durante estes doze anos e pelas portas que me abriu. Por ter me ajudado a dar os primeiros passos na vida acadêmica, por ter contribuído diretamente para que eu me tornasse mestre, depois docente e, hoje, doutor. Sonhamos juntos, voamos alto e chegamos longe, meu professor! Minha eterna gratidão, admiração e respeito!

Ao meu coorientador, **Prof. Assoc. Cláudio A. Casatti**, pelos ricos conhecimentos transmitidos, pelo companheirismo e preocupações de um verdadeiro amigo durante todos estes anos. Ao **Prof. Tit. Valdir G. Garcia**, meu coorientador durante o mestrado, e um dos grandes idealizadores e responsáveis diretos pela execução deste trabalho. Agradeço por todo auxílio intelectual e prático, assim como pela sua disposição e prontidão na resolução dos problemas e contratempos que surgiram pelo caminho. À **Profª. Assoc. Letícia H. Theodoro** que, com sua vasta experiência, objetividade e visão futurista, sempre colaborou e ofereceu o suporte necessário à realização de todos os projetos desenvolvidos em nosso laboratório.

À **Profª. Assoc. Daniela C. dos Santos**, à **Profª. Assoc. Mariza A. Matsumoto** e à **Profª. Assoc. Letícia H. Theodoro**, pela valiosa participação e colaboração no Exame Geral

de Qualificação que precedeu esta tese. Toda análise crítica, sugestões, comentários e discussões foram fundamentais para o aprimoramento da versão final ora apresentada.

Aos membros da comissão examinadora do processo de defesa desta tese de doutorado, **Prof. Dr. Gestter W. L. Tessarin, Profª. Assoc. Mariza A. Matsumoto, Prof. Tit. Valdir G. Garcia, Profª. Tit. Maeli Dal Pai e Prof. Assoc. Edilson Ervolino**, pela prontidão, gentileza e disponibilidade em realizarem a avaliação deste trabalho. A indicação de tais nomes reflete a certeza de que cada um, com a sua devida expertise, apresentará grandiosa contribuição para o aprimoramento deste texto e para o direcionamento das futuras etapas desta pesquisa.

Aos integrantes atuais e aos que passaram pelo nosso **Laboratório de Osteobiologia Aplicada à Odontologia**, conduzido com maestria pelo **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**, e constituído por alunos de graduação e de pós-graduação, em níveis de mestrado e doutorado. Em especial, aos meus amigos **João M. de Mello Neto, Thamires P. C. Souza, Eduardo Q. M. de Souza, Jéssica de O. A. Freire, Isabella Z. Guiati, Vinícius F. Ganzaroli, Mariane B. Olivo, Daniela P. de Sá, Cristian Statkiewicz, Fernanda F. V. dos Santos, Letícia C. Ferreira, Tiago E. da Rocha, Nathália J. de Araújo, Luy de A. Costa, Jéssica S. Santana, Glauco R. C. Silveira, João P. S. Franciscon, Yasmin P. de Souza, Leandro L. da Costa, Vitor H. M. Dourado, Estevão L. Pereira e André B. da Silva**, pela amizade construída, por todo empenho e auxílio nesta e em tantas outras pesquisas realizadas. Trabalhar em uma equipe tão unida e qualificada torna até o mais árduo trabalho uma tarefa prazerosa. Muito obrigado a cada um de vocês!

Ao **Eduardo Q. M. de Souza** e à **Jéssica de O. A. Freire**, pela inestimável colaboração em cada uma das etapas experimentais e laboratoriais deste trabalho, unindo esforços mesmo durante o isolamento social imposto pelo momento pandêmico vivido em prol da realização deste projeto. Sem vocês, nada disso seria possível!

Ao **Alexandre F. da Silva**, pelos incontáveis conselhos e momentos de incentivo. Por acreditar em mim muitas vezes mais do que eu mesmo e vibrar com as minhas conquistas. Obrigado pelo entusiasmo e, sobretudo, pela parceria. Alcançamos mais um degrau! Ao **João M. de Mello Neto**, pela cumplicidade e lutas compartilhadas desde a época da iniciação científica, além da colaboração imediata com as traduções deste texto. Estarei daqui torcendo e sempre aplaudindo as suas vitórias! E ao **Vinícius Fardin**, meu primo, não apenas por estar ao meu lado em todos os momentos, mas pela prontidão, gentileza e auxílio imensurável nos trâmites das etapas finais deste curso, perfazendo a conexão Birigui-Botucatu. Muito obrigado por sonharem comigo e me ajudarem a materializar esta importante conquista!

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP** e, em especial, ao **Instituto de Biociências de Botucatu**, nas pessoas do senhor diretor **Prof. Assoc. Luiz F. R. de Almeida**, e do senhor vice-diretor **Prof. Assoc. Willian F. Zambuzzi**, pela oportunidade de realizar este curso de pós-graduação.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada – PG-BGA**, nas pessoas da senhora coordenadora **Prof^a. Tit. Maeli Dal Pai**, do senhor vice-coordenador **Prof. Assoc. Luís A. Justulin Junior**, e do senhor ex-coordenador **Prof. Tit. José M. Sforcin**, pela eficiência exemplar, dedicação, senso de justiça e transparência na gestão deste conceituado programa de pós-graduação, do qual tanto me orgulho em carregar tais títulos acadêmicos.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, minha casa de formação, nas pessoas do senhor diretor **Prof. Tit. Glauco I. Miyahara**, e do senhor vice-diretor **Prof. Tit. Alberto C. B. Delbem**, pela possibilidade de execução desta e de tantas outras pesquisas desde a época da graduação.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela concessão de Bolsa de Doutorado, e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão de Auxílio Regular à Pesquisa (processo FAPESP nº. 2019/17769-1), fundamental para a realização deste projeto.

À empresa **Dentfix®**, pela gentileza no desenvolvimento, fabricação e fornecimento dos implantes de titânio e dos cicatrizadores utilizados nesta pesquisa.

À **Disciplina de Histologia e Embriologia**, do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, representada pelos docentes **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**, **Prof. Assoc. Cláudio A. Casatti**, **Prof^a. Assoc. Mariza A. Matsumoto** e **Prof^a. Ass. Dra. Alaíde Gonçalves**, pela possibilidade de realização das mais diversas atividades acadêmicas enquanto aluno de graduação e de pós-graduação, incluindo o Estágio Docência, requisito para a conclusão deste curso. O caminho foi longo e repleto de obstáculos, mas se tornou muito mais seguro quando trilhado ao lado de grandes mestres. Minha eterna gratidão por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional!

Aos docentes da **Disciplina de Anatomia**, do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Prof. Tit. José A. de Oliveira**, **Prof^a. Assoc. Roberta Okamoto** e **Prof. Ass. Dr. Paulo R. Botacin**, pelo prazeroso convívio diário e por todos os ensinamentos dentro desta fascinante área do conhecimento.

A todos os **docentes** do Instituto de Biociência de Botucatu – UNESP e da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, minhas grandes fontes de inspiração, com os quais tive a honra de conviver e aprender a cada dia. Em especial, ao **Prof. Assoc. Juliano M. de Almeida** e à **Profª. Tit. Sandra H. P. de Oliveira**, pela amizade e incontáveis auxílios e ensinamentos, e ao **Prof. Assoc. Leonardo P. Faverani**, pela parceria e gentileza no fornecimento das fotografias clínicas que ilustram a introdução desta tese.

Aos **servidores técnico-administrativos** do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, e em especial, à **Sandra Cristina Vidotto**, supervisora da Seção Técnica de Pós-Graduação, bem como ao **Davi B. de O. Müller**, ex-supervisor da Seção Técnica de Pós-Graduação, por toda cordialidade, disposição e prontidão no direcionamento e na resolução das dúvidas e dos contratempos que surgiram durante o curso.

Ao **Departamento de Ciências Básicas** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, nas pessoas da chefe de departamento **Profª. Tit. Doris H. Matsushita**, e da vice-chefe de departamento **Profª. Ass. Dra. Alaíde Gonçalves**, e aos seus **servidores técnico-administrativos**, em especial à **Eliseide M. F. S. Navega**, ao **André L. M. Piedade**, ao **Arnaldo C. dos Santos** e ao **José A. G. Junqueira**, pelo auxílio e suporte na realização das mais diversas tarefas diárias, além de todo aprendizado e agradável convivência.

Aos **colegas de pós-graduação e companheiros de departamento**, com o quais tive a oportunidade de estudar, pesquisar e viver momentos indescritíveis, dentro e fora da universidade. Minha gratidão por todo carinho e auxílio gentilmente prestados ao longo desta caminhada. Sigam firmes no propósito, alçando vôos cada vez mais altos!

À **Fundação Educacional de Andradina – FEA**, na pessoa da senhora diretora acadêmica **Profª. Dra. Carla R. S. B. Guerra**, ao **Centro Universitário Toledo – UNITOLED** WYDEN, nas pessoas do senhor reitor **Prof. Leandro M. Lopes**, e da senhora pró-reitora acadêmica **Profª. Dra. Marisa R. Lopes**, e ao **Centro Universitário de Santa Fé do Sul – UNIFUNEC**, nas pessoas do senhor reitor **Prof. Dr. Guilherme H. Yamanari**, e do senhor pró-reitor acadêmico e de extensão **Prof. Dr. Max D. Faria**, por me confiarem suas salas de aula e permitirem a vivência completa da docência. E a todos os meus estimados **alunos**, pelo carinho, respeito e possibilidade de transmitir não somente o pouco conhecimento que me cabe, mas de aprender a cada nova aula. Chego nesta importante etapa da minha vida com a convicção de que ser professor é a mais nobre missão que desejo sempre levar adiante.

A todos os meus **familiares**, pelo incessável apoio e incentivo. À minha querida avó paterna, **Esther O. Toro** (*in memoriam*), que tanto me incentivou e sonhava junto comigo

estas conquistas. Conseguimos, vizinha! Vou carregar este título com o mesmo carinho que orgulhosamente me chamava, mesmo antes de conquistá-lo. Ao meu avô paterno **Urbano T. Costa** (*in memoriam*), à minha avó materna **Marli C. Jorge**, e ao meu avô materno **Jaime Jorge**, por todas as orações e amor incondicional que vivemos até hoje. Aos meus tios e primos, **Josiane J. Fardin**, **Márcio Fardin**, **Thaís Fardin** e **Vinícius Fardin**, pela participação em todas as etapas da minha vida. Ao meu cunhado **Gustavo F. da S. Molck**, pela parceria e auxílios sempre pautados em um conhecimento admirável.

Aos grandes **amigos** que encontrei ao longo da vida, **Desirée A. Caldeira**, **Carolina C. S. Lacerda**, **Diva G. Demarchi**, **Raquel L. Balesteros**, **Rafaela B. Érnica**, **Natalie B. Alvares**, **Marina S. Gonçalves**, **Denis Contini**, **Márcio R. Contardi**, **Rafael da S. Gonsalves**, **Jeferson R. C. dos Anjos**, **Jaqueline S. Hassumi**, **Jadison J. Conforte**, **Henrique R. Matheus**, **Ana M. V. Vasques** e **Juliana R. Becker**, por sempre estarem ao meu lado, oferecendo apoio nas dificuldades e comemorando cada conquista.

E por fim, meu profundo respeito aos **animais** utilizados nesta pesquisa, por servirem à ciência com suas próprias vidas.

pígrafe

**“A tarefa não é tanto ver o que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”**

Arthur Schopenhauer

esumo

TORO, L. F. Avaliação da eficácia e segurança do debridamento mecânico no tratamento da peri-implantite experimental em ratas tratadas com zoledronato. 2023. 115 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP.

RESUMO

A osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONMM) é um efeito adverso desencadeado pelo uso de drogas com ação antirreabsortiva sobre o tecido ósseo, como é o caso dos bisfosfonatos (BFs). Nos últimos anos tem aumentado o número de casos de ONMM relacionada aos implantes odontológicos (ONMM-IO), durante ou após o uso destes fármacos. Estudos correlacionam tal terapia medicamentosa e a peri-implantite (PI) com o desencadeamento da ONMM-IO. Assim, um tratamento efetivo e seguro para a PI ao longo de uma terapia com BFs pode significar a manutenção do implante e evitar a ocorrência da ONMM-IO. O debridamento mecânico (DM) é o tratamento padrão e a primeira opção de escolha para a maioria dos casos de PI, porém, sua efetividade e segurança em pacientes sob terapia com drogas antirreabsortivas ainda não foram esclarecidas. Diante disso, o objetivo primário do presente estudo foi avaliar a efetividade e a segurança do emprego do DM no tratamento da peri-implantite experimental (PiE) em ratas com implantes osseointegrados e posteriormente tratadas com zoledronato. Ratas Wistar senescentes foram inicialmente submetidas à exodontia do incisivo superior direito e à instalação imediata de um implante de titânio no local. Após 8 semanas, nas ratas em que os implantes se encontravam osseointegrados (N=24), foi realizada a exposição da plataforma do implante e a instalação de um cicatrizador. Os animais foram divididos nos grupos: C (Controle), ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM. Na 9ª semana, foi iniciado o tratamento medicamentoso, o qual consistiu na administração de 0,45ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (grupo C) ou 0,45ml da mesma solução acrescida de 100µg/Kg de zoledronato (grupos ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM), a cada 4 dias, durante 10 semanas. Decorridas 5 semanas do início do tratamento medicamentoso, foi instalada uma ligadura de algodão ao redor dos implantes para indução da PiE nos grupos ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM, a qual foi mantida em posição por 5 semanas (grupo ZOL-PiE) ou por 2 semanas (grupo ZOL-PiE-DM), quando foi removida e executado o tratamento local pelo DM. A eutanásia foi efetuada na 19ª semana. As maxilas contendo os implantes foram dissecadas, submetidas ao processamento laboratorial, e as secções histológicas foram coradas pela hematoxilina-eosina para análise histopatológica, análise

histométrica da porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e da porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) na região peri-implantar, ou destinadas à reação imunoistoquímica para detecção e quantificação do fator de necrose tumoral alfa (TNF α), da interleucina 1 beta (IL-1 β), do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), da osteocalcina (OCN), e da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Os dados foram analisados estatisticamente com nível de significância de 5%. No grupo C, os tecidos situados ao redor do implante exibiram aspectos de normalidade. No tecido conjuntivo peri-implantar em ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM foi observada a presença de infiltrado inflamatório de grau leve, intenso e moderado, respectivamente. Da mesma forma, a imunomarcagem para TNF α e IL-1 β acompanhou os achados histopatológicos. ZOL e ZOL-PiE-DM apresentaram menor imunomarcagem para VEGF em relação ao grupo C. Houve menor quantidade de células TRAP-positivas, bem como menor imunomarcagem para OCN nos grupos tratados com zoledronato em relação ao grupo C, sendo que ZOL-PiE-DM apresentou ainda menor imunomarcagem para OCN em relação ao ZOL. A PTO-T não diferiu entre os grupos, porém, ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM apresentaram maior PTO-NV em relação ao grupo C, sendo que ZOL-PiE-DM apresentou ainda maior PTO-NV em relação ao ZOL e ao ZOL-PiE. Conclui-se que o DM, empregado de forma convencional e como monoterapia, não se mostrou uma proposta efetiva e, tampouco, segura para o tratamento da PiE em ratas tratadas com dose oncológica de zoledronato, podendo se constituir em um fator de risco agravante e/ou desencadeador da ONMM-IO.

Palavras-chave: Ácido zoledrônico. Desbridamento. Implantes dentários. Osteonecrose. Peri-implantite.



Abstract

TORO, L. F. Evaluation of the effectiveness and safety of mechanical debridement for the treatment of experimental peri-implantitis in rats treated with zoledronate. 2023. 115 p. Thesis (Doctoral degree) - Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu/SP.

ABSTRACT

Medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) is an adverse drug reaction triggered by the use of antiresorptive agents, such as bisphosphonates (BPs). There has been an increase in dental implant-related MRONJ (MRONJ-DI) cases reported before and after the use of these drugs. Previous studies have shown that there is a correlation between peri-implantitis (PI) in patients undergoing treatment with BPs and the onset of MRONJ-DI. Thus, safe and effective treatment of PI in patients undergoing BPs therapy is needed. Mechanical debridement (MD) is the gold standard approach for the treatment of PI. However, its effectiveness and safety have not been confirmed in patients undergoing antiresorptive drug therapy. Therefore, this study aimed to evaluate the effectiveness and safety of MD for the treatment of experimental peri-implantitis (EPI) in rats undergoing zoledronate therapy. Senescent female Wistar rats were initially submitted to the extraction of the upper right incisor and immediate titanium implant placement. Eight weeks after the implant placement, healing abutments were installed in the osseointegrated implants (N=24) and the animals were divided into four groups as follows: C (Control), ZOL, ZOL-PiE and ZOL-PiE-DM. For ten weeks, rats were submitted to systemic treatment with 0.45ml of sodium chloride solution (0.9%) (group C) or 0.45ml of this same solution plus 100µm/Kg of zoledronate (groups ZOL, ZOL-PiE and ZOL-PiE-DM), every four days. Five weeks after the beginning of the systemic treatment, a cotton ligature was installed around the dental implants to induce EPI in groups ZOL-PiE and ZOL-PiE-DM. The ligature was maintained for five weeks (group ZOL-PiE) or two weeks (group ZOL-PiE-DM), when it was removed and DM was performed. Euthanasia was performed at nineteenth week. The upper jaws were dissected and submitted to laboratory processing. The histological sections were submitted to hematoxylin-eosin staining for histopathological analysis and histometric analysis of the percentage of total bone tissue (PTBT) and the percentage of non-vital bone tissue (PNVBT) in the peri-implant area, or intended for immunohistochemical reaction for detection and quantification of tumor necrosis factor alfa (TNF α), interleukin 1 beta (IL-1 β), vascular endothelial growth factor (VEGF), osteocalcin (ONC) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). Data were

analyzed considering $p < 0.05$ as statistically significant. In group C, peri-implant tissues had a normal pattern of cellularity and structure. In groups ZOL, ZOL-PiE and ZOL-PiE-DM there was a mild, intense and moderate inflammatory infiltrate in the connective tissues, respectively. Similarly, immunolabeling for TNF α and IL-1 β followed histopathological findings. ZOL and ZOL-PiE-DM showed lower immunolabeling for VEGF compared to group C. The number of TRAP-positive cells and the immunolabeling for OCN were lower in the groups treated with zoledronate compared to group C. ZOL-PiE-DM had even lower immunolabeling for OCN compared to ZOL. There was no difference in PTBT between groups, however, in ZOL, ZOL-PiE and ZOL-PiE-DM there was higher PNVBT compared to group C. ZOL-PiE-DM had even higher PNVBT compared to ZOL and ZOL-PiE. Hence, MD used conventionally as monotherapy is not a safe and effective therapy for EPI treatment in rats treated with oncologic dose of zoledronate, which may constitute a risk and/or trigger for the onset of MRONJ-DI.

Keywords: Debridement. Dental implants. Osteonecrosis. Peri-implantitis. Zoledronic acid.

Listas

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Aspecto histológico do tecido ósseo em condições de normalidade, com destaque para as células típicas e sua relação estrutural com a matriz óssea..	32
FIGURA 2 -	Estrutura química dos bisfosfonatos nitrogenados e representação da via do mevalonato, com destaque para o local de atuação destes fármacos	34
FIGURA 3 -	Fotografias evidenciando algumas das principais características clínicas da ONMM-IO	41
FIGURA 4 -	Fluxograma dos procedimentos executados ao longo do período experimental, com destaque para os eventos compreendidos durante o plano de tratamento medicamentoso e os diferentes grupos experimentais	50
FIGURA 5 -	Sequência de procedimentos cirúrgicos e clínicos executados ao longo do período experimental.....	55
FIGURA 6 -	Representação gráfica e fotografia evidenciando as características estruturais do implante de titânio e do cicatrizador utilizados no presente estudo	56
FIGURA 7 -	Posicionamento relativo e orientação do complexo implante-cicatrizador na maxila dos animais e representação das áreas de interesse para as análises microscópicas	61
FIGURA 8 -	Aspecto histopatológico do tecido conjuntivo peri-implantar nos diferentes grupos experimentais e morfologia dos osteoclastos mediante os tratamentos medicamentosos	69
FIGURA 9 -	Porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e aspecto histopatológico do tecido ósseo peri-implantar nos diferentes grupos experimentais	70
FIGURA 10 -	Porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) e aspecto histopatológico do tecido ósseo peri-implantar nos diferentes grupos experimentais, com destaque para as áreas de tecido ósseo não vital	71
FIGURA 11 -	Imunomarcagem para TNF α no tecido conjuntivo peri-implantar dos diferentes grupos experimentais.....	74
FIGURA 12 -	Imunomarcagem para IL-1 β no tecido conjuntivo peri-implantar dos diferentes grupos experimentais.....	75
FIGURA 13 -	Imunomarcagem para VEGF no tecido conjuntivo peri-implantar dos diferentes grupos experimentais.....	76
FIGURA 14 -	Imunomarcagem para OCN no tecido ósseo peri-implantar dos diferentes grupos experimentais.....	77

FIGURA 15 - Imunomarcção para TRAP no tecido ósseo peri-implantar dos diferentes grupos experimentais.....	78
---	-----------

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Peso corporal médio dos animais de cada grupo experimental durante os diferentes momentos de aferição ao longo do experimento **66**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%.....	porcentagem
±.....	mais ou menos
®	marca registrada comercial
°C.....	graus Celsius
°GL	graus GL (Gay Lussac)
µg/Kg.....	microgramas por quilograma
µm.....	micrômetros
AAOMS.....	Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais, <i>American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons</i>
AI.....	áreas de interesse
ALE	Alemanha
AM.....	Amazonas, Brasil
ANOVA.....	Análise de Variância
APCs.....	células apresentadoras de antígeno, <i>Antigen Presenting Cells</i>
aPDT.....	terapia fotodinâmica antimicrobiana, <i>Antimicrobial Photodynamic Therapy</i>
BFs.....	bisfosfonatos
BRA	Brasil
CA.....	Califórnia, Estados Unidos da América
CCAC	Conselho Canadense de Cuidado Animal, <i>Canadian Council on Animal Care</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA.....	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
DAMPs.....	padrões moleculares associados a danos, <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DM.....	debridamento mecânico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético, <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EUA	Estados Unidos da América
FL	Flórida, Estados Unidos da América
FOA-UNESP	Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
g.....	gramas
GO	Goiás, Brasil

HE.....	hematoxilina-eosina
IBB-UNESP	Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
IL	interleucina, <i>Interleukin</i>
IM	intramuscular
IO.....	implantes odontológicos
IP.....	intraperitoneal
IV	intravenosa
LLLT	fotobiomodulação com <i>laser</i> de baixa potência, <i>Low-Level Laser Therapy</i>
LPS	lipopolissacarídeos
M.....	molar
MD.....	Maryland, Estados Unidos da América
mg/Kg	miligramas por quilograma
ml.....	mililitros
ml/Kg.....	mililitros por quilograma
mm.....	milímetros
mM	milimolares
mm ²	milímetros quadrados
MO.....	Missouri, Estados Unidos da América
NaCl.....	cloreto de sódio
NI.....	Niedersachsen, Alemanha
nº.....	número
OCN.....	osteocalcina, <i>Osteocalcin</i>
ONMM	osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa
ONMM-IO.....	osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa relacionada aos implantes odontológicos
PAMPs.....	padrões moleculares associados a patógenos, <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBS	tampão fosfato-salino, <i>Phosphate Buffered-Saline</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
RANKL	ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B, <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand</i>
RAR.....	raspagem e alisamento radicular
RJ.....	Rio de Janeiro, Brasil
rpm.....	rotações por minuto
SIPMO.....	Sociedade Italiana de Patologia e Medicina Oral, <i>Società Italiana di Patologia e Medicina Orale</i>
SP.....	São Paulo, Brasil
TNF.....	fator de necrose tumoral, <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAP	fosfatase ácida resistente ao tartarato, <i>Tartrate-Resistant Acid Phosphatase</i>
UMB	unidade multicelular básica
VEGF.....	fator de crescimento do endotélio vascular, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A -	Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA-UNESP	115
---------------------	---	------------



umário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	30
2	OBJETIVOS.....	45
3	METODOLOGIA.....	47
3.1	ANIMAIS UTILIZADOS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	48
3.1.1	Protocolo de habituação dos animais	48
3.1.2	Anestesia geral	49
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	49
3.2.1	Exodontia do incisivo superior e instalação do implante de titânio.....	50
3.2.2	Reabertura e exposição da plataforma do implante de titânio	51
3.2.3	Definição dos grupos experimentais e plano de tratamento medicamentoso	52
3.2.3.1	<i>Grupos experimentais</i>	<i>53</i>
3.2.4	Peri-implantite experimental (PiE) induzida por ligadura	53
3.2.5	Tratamento local por debridamento mecânico (DM).....	54
3.2.6	Cuidados pós-operatórios de rotina	54
3.2.7	Eutanásia e obtenção das amostras	54
3.3	PROCESSAMENTO LABORATORIAL	56
3.3.1	Coloração pela hematoxilina-eosina (HE)	57
3.3.2	Reação imunoistoquímica	57
3.4	ANÁLISE DOS DADOS.....	59
3.4.1	Análise da condição geral de saúde dos animais e exame clínico intraoral.....	59
3.4.2	Análises microscópicas	60
3.4.2.1	<i>Áreas de interesse (AI) para as análises microscópicas.....</i>	<i>60</i>
3.4.2.2	<i>Análise histopatológica.....</i>	<i>61</i>
3.4.2.3	<i>Análises histométricas</i>	<i>62</i>
3.4.2.4	<i>Análises imunoistoquímicas.....</i>	<i>62</i>
3.4.3	Análise estatística dos dados.....	63
4	RESULTADOS	64
4.1	CONDIÇÃO GERAL DE SAÚDE DOS ANIMAIS E EXAME CLÍNICO INTRAORAL	65
4.1.1	Peso corporal dos animais.....	66
4.2	ASPECTO HISTOPATOLÓGICO DOS TECIDOS PERI-IMPLANTARES.....	66

4.3	PORCENTAGEM DE TECIDO ÓSSEO TOTAL (PTO-T) NA REGIÃO PERI-IMPLANTAR	68
4.4	PORCENTAGEM DE TECIDO ÓSSEO NÃO VITAL (PTO-NV) NA REGIÃO PERI-IMPLANTAR	68
4.5	PADRÃO DE IMUNOMARCAÇÃO PARA $TNF\alpha$, IL-1 β , VEGF, OCN E TRAP	72
4.6	$TNF\alpha$, IL-1 β , VEGF E OCN NOS TECIDOS PERI-IMPLANTARES.....	72
4.7	TRAP NO TECIDO ÓSSEO PERI-IMPLANTAR.....	73
5	DISCUSSÃO.....	79
5.1	PROBLEMATIZAÇÃO E CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	80
5.2	PROPOSIÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	82
5.3	ASPECTOS CELULARES E TECIDUAIS DA REGIÃO PERI-IMPLANTAR..	87
5.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PROPOSIÇÕES FUTURAS	96
6	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICES	114
	APÊNDICE A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA-UNESP	115



Introdução

1 INTRODUÇÃO

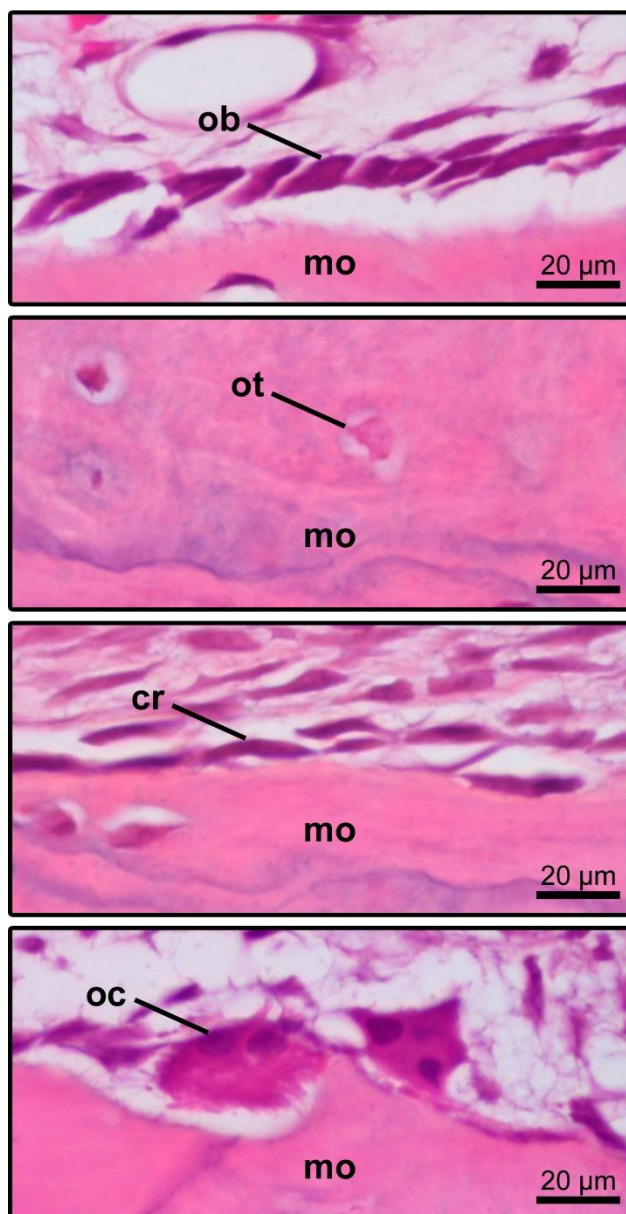
O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, constituído basicamente por uma matriz extracelular mineralizada, denominada de matriz óssea, rica em fibras colágenas, proteínas não-colagenosas e cristais de hidroxiapatita, e por células típicas, dentre as quais estão os osteoblastos, os osteócitos, as células de revestimento ósseo e os osteoclastos (ANSARI; SIMS, 2020; BUCKWALTER *et al.*, 1996) (FIGURA 1). O tecido ósseo é o principal constituinte tecidual do osso enquanto órgão e, por esta razão, exerce importantes funções no organismo dos vertebrados, como suporte e proteção de órgãos e tecidos moles, locomoção, armazenamento de cálcio e fosfato, além de servir como arcabouço para abrigar a medula óssea (DATTA *et al.*, 2008). Apesar de sua aparência inerte, o osso é uma estrutura altamente complexa e dinâmica, sendo constantemente remodelado pela atuação conjunta de todas as células ósseas, com especial destaque à ação exercida pelos osteoclastos, que realizam a reabsorção óssea, e pelos osteoblastos, responsáveis pela subsequente neoformação da matriz (LOPES *et al.*, 2018; SIMS; GOOI, 2008).

O processo de remodelação óssea culmina com a substituição do tecido pré-existente por um tecido ósseo recém sintetizado, sendo que tal evento biológico pode ser didaticamente dividido em três etapas: I) a ativação e o início da reabsorção óssea pelos osteoclastos; II) o período de transição (ou período de reversão) entre a reabsorção e a neoformação óssea e; III) a formação óssea pelos osteoblastos (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015; MATSUO; IRIE, 2008; SIMS; GOOI, 2008). Estes eventos ocorrem às custas de ações coordenadas das células ósseas, as quais, conjuntamente, constituem uma estrutura anatômica temporária denominada de unidade multicelular básica (UMB). Dentro da UMB, a atividade celular é combinada, ou também dita acoplada, seguindo o princípio de que a quantidade de osso reabsorvido pelos osteoclastos deve ser igual à quantidade de osso neoformado pelos osteoblastos (SIMS; GOOI, 2008). Entretanto, tais células também são capazes de atuar de modo independente, e este equilíbrio pode ser influenciado por diferentes fatores locais e/ou sistêmicos, incluindo estimulações biomecânicas, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e, principalmente, hormônios (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

Assim, a remodelação óssea normal é um processo fisiológico necessário para que ocorra o reparo de lesões e fraturas nos ossos, para que haja adaptação do esqueleto frente às diferentes forças mecânicas que nele incidem, bem como para garantir a homeostase do cálcio no organismo. Porém, o desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea pode resultar em diversas doenças e desordens esqueléticas (YAO *et al.*, 2020). Deste modo, nas situações em

que ocorre a maior ativação dos osteoclastos e/ou a redução da atividade dos osteoblastos, observa-se progressiva diminuição da massa óssea e a consequente alteração de sua microarquitetura, o que caracteriza as condições clínicas de osteopenia, osteoporose e/ou lesões osteolíticas (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015; YAO *et al.*, 2020). Diante disso, com o intuito de frear o desbalanço metabólico, reduzindo a reabsorção óssea excessiva nestas condições em especial, a indústria farmacêutica desenvolveu fármacos com atividade antirreabsortiva, dentre os quais destacam-se os bisfosfonatos pela sua alta eficácia e ampla utilização (RUSSEL, 2011).

FIGURA 1 - Aspecto histológico do tecido ósseo em condições de normalidade, com destaque para as células típicas e sua relação estrutural com a matriz óssea.



Abreviações: *cr*, célula de revestimento ósseo; *mo*, matriz óssea; *ob*, osteoblasto; *oc*, osteoclasto; *ot*, osteócito. Coloração: HE. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20µm. FONTE: O Autor (2023).

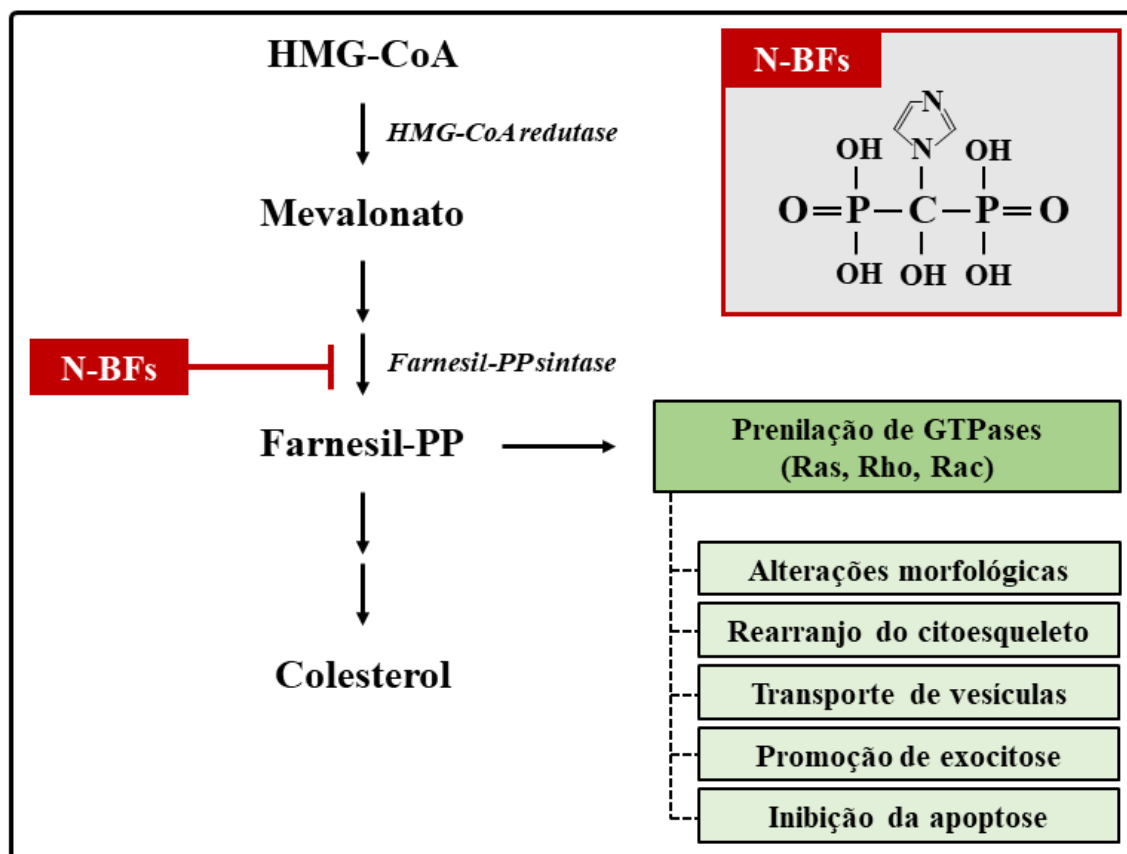
Os bisfosfonatos (BFs) constituem uma classe de medicamentos com potente ação inibitória sobre o processo de reabsorção óssea e que, deste modo, apresenta grande efetividade no tratamento de distúrbios esqueléticos que desencadeiam osteopenia, osteoporose e lesões ósseas líticas, tais como a própria osteoporose relacionada ao envelhecimento ou ao tratamento crônico com glicocorticóides, doença de Paget, osteogênese imperfeita, mieloma múltiplo, paratireoidismo primário, dentre outras (DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008; HAMADEH; NGWA; GONG, 2015). Além disso, os BFs mais potentes são comumente empregados como adjuvantes na terapia oncológica, com o intuito de evitar a progressão de metástases ósseas, controlar a hipercalcemia e a dor óssea em neoplasias malignas osteotrópicas, como é o caso dos tumores de mama, próstata, rim e pulmão (ORYAN; SAHVIEH, 2021; VANNALA; PALAIAN; SHANKAR, 2020). Com o avanço recente nas pesquisas sobre os mais diferentes efeitos dos BFs, estes vêm sendo empregados também no tratamento de alterações não relacionadas ao esqueleto, como é o caso das doenças neurodegenerativas. Existe ainda o interesse na utilização dos BFs como carreadores ósseos para outros tipos de drogas, como antibióticos, hormônios e medicamentos antineoplásicos. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar a real eficácia e segurança da utilização dos BFs para tais finalidades (CREMERS *et al.*, 2019).

A estrutura química dos BFs é relativamente simples, sendo análoga ao pirofosfato endógeno, e constituída por um carbono central ligado de forma covalente a dois grupamentos fosfatos e duas cadeias laterais, chamadas de R1 e R2 (FIGURA 2). Enquanto R1 é responsável por mediar a afinidade das moléculas do fármaco pelos cristais de hidroxiapatita presentes na matriz óssea, R2 é a responsável pelas principais propriedades farmacológicas do medicamento, incluindo a sua potência (EBETINO, 2011; ROGERS *et al.*, 2011; ROGERS; MÖNKKÖNEN; MUNOZ, 2020; SOARES *et al.*, 2016). A presença ou a ausência de nitrogênio na cadeia lateral R2 permite classificar quimicamente os BFs em nitrogenados e não nitrogenados (CHADA *et al.*, 2013), e tal característica está intimamente relacionada ao mecanismo de ação destes fármacos (EBETINO, 2011; ROGERS *et al.*, 2011; ROGERS; MÖNKKÖNEN; MUNOZ, 2020; SOARES *et al.*, 2016).

Os BFs nitrogenados são os mais utilizados na atualidade e dentre eles estão: pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato e zoledronato, sendo que este último apresenta a maior potência relativa quando comparado aos demais (ORYAN; SAHVIEH, 2021). Estes fármacos são capazes de alterar o metabolismo ósseo pela interrupção da via do mevalonato nos osteoclastos, por meio da inativação da enzima farnesil-PP sintase. Tal ação impede a formação dos produtos farnesil-PP e geranilgeranil-PP, os quais

se mostram essenciais à prenilação de pequenas proteínas GTPases, como Ras, Rho e Rac. A ausência destas proteínas, por sua vez, está diretamente relacionada com importantes alterações morfológicas e no citoesqueleto dos osteoclastos, o que impossibilita a formação da zona clara e da zona pregueada, necessárias ao acoplamento destas células na matriz óssea e à criação do microambiente propício para a reabsorção, além de prejudicar o tráfego intracelular de vesículas. A ausência destas GTPases parece ainda estar associada com a inibição da osteoclastogênese e com a indução prematura da apoptose em osteoclastos ativos (CREMERS *et al.*, 2019; EBETINO, 2011; ROGERS *et al.*, 2011; ROGERS; MÖNKKÖNEN; MUNOZ, 2020; SOARES *et al.*, 2016) (FIGURA 2).

FIGURA 2 - Estrutura química dos bisfosfonatos nitrogenados e representação da via do mevalonato, com destaque para o local de atuação destes fármacos.



Abreviação: N-BFs, bisfosfonatos nitrogenados. FONTE: O Autor (2023).

Devido à sua peculiar característica de adsorção aos tecidos mineralizados, a liberação dos BFs ocorre principalmente quando existe a reabsorção da região de tecido ósseo na qual estão depositados, fato este que responde por sua longa meia-vida. Ao ser liberado, o fármaco pode então ser fagocitado pelos osteoclastos e retornar à circulação sistêmica, sendo excretado pela via renal ou até mesmo reincorporado ao osso (CREMERS *et al.*, 2019). Este processo

farmacocinético cíclico dos BFs no organismo parece ser o principal responsável pela sua detecção em pequenas quantidades na urina de pacientes até mesmo dez anos após a interrupção do tratamento medicamentoso (SAMPAIO; VELOSO; BARBOSA, 2010).

O uso de BFs, assim como o de quaisquer outros fármacos, pode estar relacionado à ocorrência de reações adversas. A maior parte destas reações está associada aos distúrbios do trato gastrointestinal superior, à toxicidade renal, além de dores musculares e articulares, reações de hipersensibilidade, dentre outras (PAPAPETROU, 2009). Entretanto, uma reação adversa que merece destaque, principalmente dentro da área odontológica, é a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONMM), a qual tem sido observada cada vez com maior frequência em função da crescente utilização desta classe de fármacos e também em razão do aumento significativo na expectativa de vida da população de modo geral (LUNGU *et al.*, 2018; MARX, 2003; RUGGIERO *et al.*, 2014; RUGGIERO *et al.*, 2022).

A ONMM foi definida pela Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais (AAOMS, *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*) como a condição patológica caracterizada pela presença de osso exposto na região maxilofacial, ou osso que pode ser sondado através de fístula intra ou extraoral, por um período maior do que oito semanas, em pacientes submetidos a tratamento prévio ou atual com droga antirreabsortiva, sozinha ou combinada com imunomoduladores, e/ou droga antiangiogênica, e que não possuem histórico de radioterapia ou doença metastática nesta região (RUGGIERO *et al.*, 2022). Para a Sociedade Italiana de Patologia e Medicina Oral (SIPMO, *Società Italiana di Patologia e Medicina Orale*), a ONMM é uma reação medicamentosa adversa, descrita como a progressiva destruição e morte do osso, que acomete a mandíbula e a maxila de pacientes expostos ao tratamento com medicamentos conhecidos por aumentarem o risco da doença, na ausência de um tratamento prévio com radiação (CAMPISI *et al.*, 2020). Além dos BFs, que são os mais frequentemente associados à ocorrência da ONMM, outros medicamentos com atividade antirreabsortiva também têm sido relacionados, como é o caso do Denosumab, um potente inibidor seletivo do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL, *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand*) (ELEUTHERAKIS-PAPAIAKOVOU; BAMIAS, 2017; HAMADEH; NGWA; GONG, 2015). Assim, à medida em que surgem novos relatos e estudos acerca desta condição, as suas definições e nomenclaturas vão sendo atualizadas, constituindo-se, inclusive, em controversos pontos de discussão entre os mais renomados pesquisadores da área.

A ONMM pode ser distinguida de outras afecções ósseas com base em seu histórico e exame clínico (RUGGIERO *et al.*, 2022). Segundo estes aspectos, a ONMM foi categorizada nos seguintes estadiamentos: I) paciente de risco - paciente assintomático e sem a presença de osso exposto, porém, que foi tratado com droga antirreabsortiva por via intravenosa (IV) ou oral; II) estágio 0 - não há evidência de osso necrótico exposto, porém, estão presentes sintomas não específicos ou sinais clínicos e radiográficos e/ou histopatológicos de osteonecrose; III) estágio 1 - presença de osso necrótico exposto ou osso que pode ser sondado através de fístula em paciente assintomático, sem evidências de infecção e/ou inflamação; IV) estágio 2 - presença de osso necrótico exposto ou osso que pode ser sondado através de fístula em paciente sintomático, com evidências de infecção e/ou inflamação e; V) estágio 3 - presença de osso necrótico exposto ou osso que pode ser sondado através de fístula em paciente sintomático, com evidências de infecção e um ou mais dos seguintes sinais clínicos: necrose óssea que se estende além da região de osso alveolar, fratura patológica, fístula extraoral, comunicação com os seios da face ou com a cavidade nasal e osteólise que se estende para a borda inferior da mandíbula ou assoalho do seio maxilar (RUGGIERO *et al.*, 2014; RUGGIERO *et al.*, 2022).

A presença da ONMM compromete significativamente a qualidade de vida do paciente e, além disso, a progressão da doença pode culminar em consequências devastadoras (CAMINHA *et al.*, 2020; TENORE *et al.*, 2020). Seu tratamento pode ser extremamente longo, se mostrar falho e deixar graves sequelas. A conduta clínica atual adotada para o tratamento da ONMM tem se baseado no estadiamento supracitado, porém, não existe ainda um protocolo padrão universalmente aceito, sendo que na maioria dos casos emprega-se a terapia medicamentosa combinada ou não à cirúrgica. A terapia medicamentosa consiste, predominantemente, no uso prolongado de agentes antimicrobianos, enquanto que a terapia cirúrgica transita de conservadora à agressiva, desde a curetagem e/ou remoção dos sequestros ósseos até a ressecção parcial da maxila ou da mandíbula acometida (HAYASHIDA *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2017; MADEIRA *et al.*, 2020; RUGGIERO *et al.*, 2014). Cada vez mais terapias adjuvantes ao tratamento têm sido propostas, como é o caso da utilização de pentoxifilina, tocoferol, teriparatida e terapias com ozônio, oxigênio hiperbárico e *laser*. Todavia, a conduta clínica ideal seria aquela capaz de evitar o desencadeamento da ONMM, atuando de forma preventiva (EL-RABBANY *et al.*, 2017; HAYASHIDA *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2015).

A dificuldade no tratamento da ONMM deve-se, em grande parte, à limitada compreensão de sua etiopatogenia, a qual, supostamente, apresenta uma natureza multifatorial

e extremamente complexa (RUGGIERO *et al.*, 2022). Ainda que as primeiras descrições de ONMM tenham sido relatadas no ano de 2003 (MARX, 2003; MIGLIORATI, 2003; WANG; GOODGER; POGREL, 2003), somente nos últimos dez anos as pesquisas experimentais e clínicas têm tomado consistência e buscado desvendar as reais causas e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento desta condição patológica.

Na atualidade são apontados como supostos fatores etiopatogênicos da ONMM: I) a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos, capaz de desregular o processo de remodelação óssea e, assim, permitir o acúmulo de sucessivas microfraturas no tecido ósseo, o que resulta em áreas de tecido não vital, favorecendo o estabelecimento de infecções secundárias com o subsequente aumento da necrose óssea; II) o potente efeito antiangiogênico das drogas antirreabsortivas, capaz de levar à necrose avascular do tecido ósseo; III) o favorecimento à infecção intrinsecamente induzido pelos BFs; IV) o efeito citotóxico dos BFs sobre várias linhagens celulares, dificultando o reparo de tecidos moles e duros da região bucomaxilofacial posteriormente a procedimentos invasivos; V) a presença de disfunções imunológicas inatas ou adquiridas, o que compromete a resposta protetiva e reparadora e; VI) fatores genéticos predisponentes, provavelmente relacionados a mutações em genes envolvidos com o *turnover* ósseo, com a formação de colágeno e angiogênese, com a resposta imunológica ou com certas doenças ósseas metabólicas (AGHALOO; HAZBOUN; TETRADIS, 2015; BADEL *et al.*, 2013; KUROSHIMA; SASAKI; SAWASE, 2019; RUGGIERO *et al.*, 2022).

A incidência da ONMM tem se mostrado entre 0,01 e 0,04% em pacientes que fazem uso de BFs menos potentes ou em menor dosagem, administrados pela via oral, os quais são predominantemente prescritos para o tratamento da osteoporose, como é o caso do alendronato. No entanto, esta incidência aumenta para até 12% em pacientes que utilizam BFs mais potentes ou em maior dosagem, administrados pela via IV, os quais são principalmente prescritos para a complementação da terapia oncológica, como é o caso do zoledronato (KHAN *et al.*, 2017; KUROSHIMA; SASAKI; SAWASE, 2019; MCGOWAN; MCGOWAN; IVANOVSKI, 2018; OTTO *et al.*, 2012). A dose utilizada para o tratamento da osteoporose é usualmente denominada de dosagem osteoporótica, enquanto que a dose empregada como adjuvante à terapia oncológica é denominada de dosagem oncológica (TORO, 2019). Assim, o risco de ocorrência da ONMM é consideravelmente maior na dosagem oncológica do que na dosagem osteoporótica (RUGGIERO *et al.*, 2022). Além disso, conforme já mencionado, devido ao seu efeito cumulativo nos tecidos mineralizados, a incidência da ONMM pode atingir até 21% dos pacientes após o terceiro ano de uso destes

fármacos (KHAN *et al.*, 2017; KUROSHIMA; SASAKI; SAWASE, 2019; MCGOWAN; MCGOWAN; IVANOVSKI, 2018; OTTO *et al.*, 2012). Em síntese, constata-se que quanto maior a potência antirreabsortiva do fármaco, a sua dosagem e a duração do tratamento, maior é o risco de ocorrência da ONMM (ALDHALAAN; BAQAIS; AL-OMAR, 2020). Ademais, o uso concomitante de BFs e corticosteróides ou quimioterápicos potencializa tal risco (WICK *et al.*, 2022).

Além do risco relacionado ao medicamento, estudos epidemiológicos vêm apontando os principais fatores de risco relacionados ao paciente e às condições locais. A ONMM acomete com maior frequência mulheres (73%), com idade avançada (média de 66 anos e uma variação entre 42-90 anos), supostamente em função da grande quantidade de mulheres que fazem uso de drogas antirreabsortivas para complementação do tratamento do câncer de mama e para osteoporose severa na senescência. A presença de comorbidades associadas, como diabetes, obesidade, anemias e câncer também estão entre os principais riscos. Dentre as condições predisponentes locais encontram-se os procedimentos odontológicos invasivos, tais como as exodontias, que respondem pela grande maioria dos casos, seguidos pelos processos de natureza inflamatório-infecciosa crônica, tais como a periodontite (HALLMER *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2017; KUROSHIMA; SASAKI; SAWASE, 2019; MCGOWAN; MCGOWAN; IVANOVSKI, 2018; OTTO *et al.*, 2012; RUGGIERO *et al.*, 2022).

Atualmente tem sido continuamente reportado um tipo de ONMM relacionada aos implantes odontológicos (IO), a ONMM-IO (FIGURA 3). Com a constante evolução dos biomateriais e nas técnicas operatórias dentro da odontologia, hoje os IO e as próteses implanto-suportadas se constituem na melhor estratégia reabilitadora para a substituição de dentes perdidos, em função de suas características estéticas e funcionais e de sua longevidade (BOSSHARDT; CHAPPUIS; BUSER, 2017; BUSER; SENERBY; BRUYN, 2017). Os IO normalmente são estruturados como um cilindro dotado de espiras, o qual é inserido em loja cirúrgica previamente preparada na maxila ou na mandíbula, imediatamente após uma exodontia ou posteriormente ao reparo alveolar, e nele se conecta um pilar intermediário transmucoso, sobre o qual é parafusada ou cimentada uma prótese (ZOHABIAN, *et al.*, 2015). Após o procedimento cirúrgico de instalação dos IO ocorre o processo de reparação peri-implantar, que envolve o tecido ósseo e os tecidos moles em suas adjacências (INSUA *et al.*, 2017).

Em 1977, Brånemark *et al.* idealizaram e conceituaram a osseointegração como sendo o contato direto entre o tecido ósseo e a superfície do implante, ao nível de resolução da microscopia óptica. Porém, ao longo dos anos, sua definição foi sendo aprimorada e, em

2014, Albrektsson *et al.* postularam o mais atual conceito, caracterizando a osseointegração como uma reação do tipo corpo estranho, na qual o tecido ósseo interfacial é formado como uma reação de defesa do organismo para proteger os seus tecidos do implante. Independente do conceito, deve ser levado em consideração que o sucesso do tratamento reabilitador com IO depende da resposta dos tecidos peri-implantares. Após a conclusão do processo de reparo peri-implantar, incluindo a osseointegração, e ao estarem em plena função na cavidade bucal, os IO passam a depender da colaboração do paciente, com uma adequada higiene bucal (PIRC; DRAGAN, 2017) e, além disso, ficam expostos por um longo período a inúmeras condições desfavoráveis, tais como hábitos deletérios do paciente (tabagismo, por exemplo), efeitos locais de doenças sistêmicas (diabetes e osteoporose, por exemplo) e ação indesejada de alguns medicamentos, como os agentes quimioterápicos e as drogas antirreabsortivas (AGHALOO *et al.*, 2019; CHRCANOVIC; ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2015).

Estudos clínicos evidenciaram que a ONMM-IO pode se manifestar de forma precoce, em cerca de 1/3 dos pacientes, ou como uma complicação tardia, nos outros 2/3 dos pacientes acometidos. Quando estabelecida de forma precoce, normalmente está diretamente relacionada aos procedimentos cirúrgicos de instalação dos IO e, deste modo, ocorre nos primeiros seis meses pós-operatórios, durante o período de reparo peri-implantar (GIOVANNACCI *et al.*, 2016; KWON *et al.*, 2014). Quando manifestada de forma tardia, seu desencadeamento está relacionado à presença do implante já osseointegrado, após seis meses de sua instalação, ou seja, depois de concluído o processo de reparação peri-implantar (BENNARDO *et al.*, 2020; ESCOBEDO *et al.*, 2020; GIOVANNACCI *et al.*, 2016; GOSS *et al.*, 2010; JACOBSEN *et al.*, 2013; LAZAROVICI *et al.*, 2010; LÓPEZ-CEDRÚN *et al.*, 2013; POGREL; RUGGIERO, 2018). Uma característica peculiar deste último tipo é que a maioria dos pacientes tratados com BFs e que manifestaram a ONMM-IO faziam uso da dosagem oncológica e desenvolveram a doença nos três primeiros anos do tratamento medicamentoso (STAVROPOULOS *et al.*, 2018). Corroborando tais achados, um estudo clínico conduzido por Pichardo *et al.* (2020) verificou que a ONMM-IO é prevalente em pacientes que iniciaram o tratamento com drogas antirreabsortivas posteriormente à instalação dos IO.

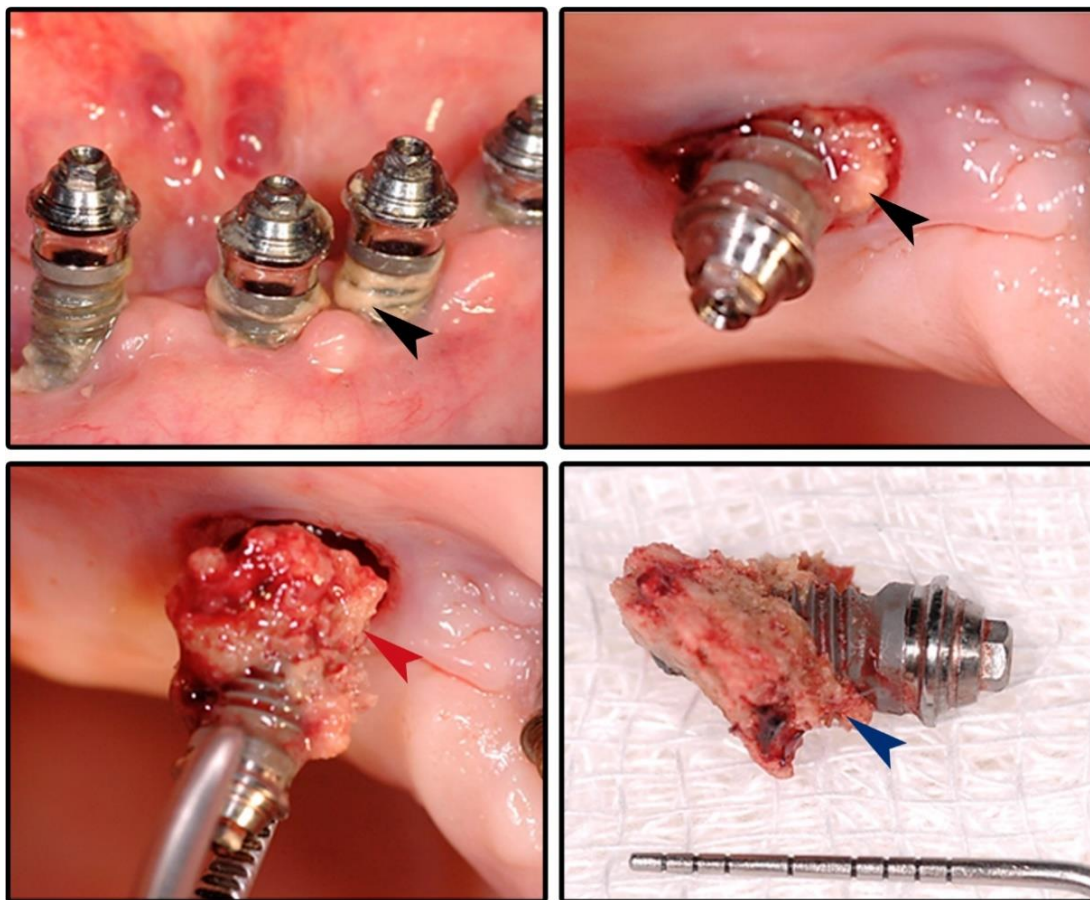
Diante disso, com o intuito de evitar a ocorrência da ONMM-IO, a AAOMS recomendou a contraindicação dos IO em pacientes tratados com dosagem oncológica de BFs administrados pela via IV. Todavia, segundo a mesma recomendação, os IO não estão contraindicados em pacientes tratados com dosagem osteoporótica de BFs administrados pela via oral, porém, é dever do cirurgião-dentista alertá-los quanto ao mínimo risco (GRANT *et*

al., 2008). Com esta medida preventiva, busca-se evitar o desencadeamento da ONMM-IO relacionada aos procedimentos cirúrgicos de instalação dos IO, o que perfaz a minoria dos casos, conforme exposto. No entanto, uma condição que deve ser vista com preocupação é aquela apresentada por pacientes que já possuem IO osseointegrados na cavidade bucal e que, em um determinado momento da vida, necessitam iniciar e manter um tratamento medicamentoso com drogas antirreabsortivas, seja na dosagem oncológica ou na dosagem osteoporótica por um tempo prolongado, tendo em vista que tais pacientes constituem a maioria dos casos de ONMM-IO relatados na atualidade (SHER *et al.*, 2021).

Kown *et al.* (2014) avaliaram as principais características clínicas, radiográficas e histopatológicas das lesões de ONMM-IO e descreveram três padrões principais de destruição óssea ao redor dos IO nestas condições: I) tipo congelado - abundante necrose óssea ao redor do implante e nas adjacências do osso alveolar, com discreta inflamação nos tecidos moles peri-implantares, graus variados de infiltrado inflamatório nos espaços medulares e extensas áreas de tecido ósseo haversiano desprovido de componentes celulares; II) tipo osteolítico - extensa osteólise ao redor do implante, com ou sem a formação de sequestros ósseos, intensa inflamação nos tecidos moles peri-implantares e presença de espículas ósseas viáveis ou necróticas, à semelhança do que ocorre na osteomielite e; III) tipo em bloco - grande sequestro ósseo em bloco contendo o implante aderido ao osso peri-implantar necrótico, sem grande perda de sua osseointegração. Às vezes os três padrões podem coexistir na mesma lesão, dependendo do grau de destruição óssea e da severidade da infecção associada (KOWN *et al.*, 2014) (FIGURA 3).

Dentre as consequências clínicas preocupantes relacionadas com a ONMM-IO está o comprometimento de grandes extensões das maxilas ou da mandíbula e a frequente ocorrência de fratura patológica nestes ossos, em especial quando a necrose se encontra acompanhada de sequestrações ósseas, como observado nos tipos osteolítico e em bloco. Enquanto Otto *et al.* (2011) reportaram fratura patológica em cerca de 3% dos pacientes acometidos por ONMM pós-exodontia, Escobedo *et al.* (2020) verificaram que esta condição acomete cerca de 60% dos indivíduos com ONMM-IO. Assim, esta é uma característica que compromete substancialmente a qualidade de vida do paciente, dificulta sobremaneira a sua reabilitação e, na maioria das vezes, resulta em sequelas que prejudicam as funções de todo o aparelho estomatognático.

FIGURA 3 - Fotografias evidenciando algumas das principais características clínicas da ONMM-IO.



Símbolos: *setas pretas*, áreas de exposição óssea na cavidade bucal ao redor dos implantes odontológicos; *seta vermelha*, implante odontológico e sequestro ósseo sendo removidos em bloco; *seta azul*, osso necrótico aderido ao implante odontológico explantado. FONTE: O Autor (2023), elaborada com fotografias gentilmente cedidas pelo Prof. Assoc. Leonardo Perez Faverani (FOA-UNESP).

Alguns estudos clínicos têm reportado uma forte correlação entre a presença de peri-implantite (PI) e a ocorrência da ONMM-IO em pacientes que fizeram ou faziam uso de drogas antirreabsortivas (KWON *et al.*, 2014; PICHARDO *et al.*, 2020; SEKI *et al.*, 2021; TEMPESTA *et al.*, 2022; TROELTZSCH *et al.*, 2016). A PI é uma condição patológica primariamente iniciada por bactérias, no entanto, fortemente influenciada por fatores locais e sistêmicos, e que acomete os tecidos peri-implantares, caracterizada por inflamação no tecido conjuntivo e pela perda progressiva do tecido ósseo de suporte, podendo culminar, inclusive, com a explantação dos IO (SCHWARZ *et al.*, 2018).

Dados epidemiológicos indicam que a PI acomete cerca de 56% dos pacientes com IO e pode se apresentar inicialmente de forma assintomática, apenas com sinais de sangramento à sondagem e perda óssea parcial, o que dificulta o estabelecimento de um diagnóstico adequado nesta fase. Com a evolução do quadro, por sua vez, comumente são observadas grandes profundidades de sondagem, com a formação de verdadeiras bolsas peri-implantares,

supuração, drenagem sinusal, além de dor, tumefação e recessão da mucosa peri-implantar (LANG; SALVI; SCULEAN, 2019; SCHWARZ *et al.*, 2018; SMEETS *et al.*, 2014; TING *et al.*, 2018). Assim, além de consistir em um fator que pode levar à perda dos IO presentes na cavidade bucal, em pacientes submetidos ao tratamento com drogas antirreabsortivas, a PI pode também se constituir em um importante fator de risco local para o desencadeamento da ONMM-IO, com consequências negativas ainda maiores. Deste modo, o diagnóstico precoce e o seu tratamento efetivo são cruciais para a longevidade da terapia reabilitadora com IO e para se evitar a ocorrência da ONMM-IO (PICHARDO *et al.*, 2020; TEMPESTA *et al.*, 2022; TROELTZSCH *et al.*, 2016).

Devido à sua complexa patogenia e à existência de múltiplos fatores que podem contribuir diretamente para a progressão da PI, diferentes protocolos clínicos vêm sendo descritos e adotados como recursos terapêuticos para esta condição, os quais compreendem desde abordagens não cirúrgicas até cirurgias conservadoras, regenerativas e/ou ressectivas, ou mesmo a combinação de diferentes técnicas (EPHROS; KIM; DEFALCO, 2020; SANTOS-MARTINS *et al.*, 2022). Contudo, ainda não existem diretrizes universalmente estabelecidas e aceitas pela comunidade científica, o que torna a experiência clínica do profissional, em grande parte dos casos de PI, a principal responsável pela definição da conduta a ser empregada (POLYMERI *et al.*, 2022).

De maneira geral, a escolha do tratamento depende da severidade e da extensão da doença, porém, a descontaminação local, com a remoção dos depósitos bacterianos e dos fatores retentivos de placa, seja como monoterapia ou como adjuvante a outras modalidades terapêuticas, parece sempre se mostrar indicada. Assim, o debridamento mecânico (DM) é considerado o tratamento padrão e consiste na primeira opção de escolha para a grande maioria dos casos de PI (FIGUERO *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2014). O DM realizado com instrumentais odontológicos manuais, como curetas plásticas, de titânio ou de fibras de carbono, apresenta inúmeras vantagens sobre as demais formas de tratamento, dentre elas: maior simplicidade técnica de execução, menor custo para o cirurgião-dentista e para o paciente, menor tempo de tratamento e redução da morbidade associada ao procedimento clínico (WAGNER *et al.*, 2021). Além disso, estudos têm relatado que o DM se mostra eficaz no controle da PI, principalmente quando empregado como tratamento inicial e na mucosite peri-implantar, e que abordagens mais complexas, como as terapias cirúrgicas, não demonstraram benefícios adicionais sobre os tratamentos mais simples (RENVERT; POLYZOIS, 2018; WAGNER *et al.*, 2021).

Convém destacar que o sucesso no manejo da PI em pacientes submetidos ao tratamento com drogas antirreabsortivas pode significar a manutenção dos IO osseointegrados em função e, inclusive, pode se constituir em uma importante estratégia para evitar a ocorrência da ONMM-IO. Em contrapartida, o insucesso neste tratamento, além de culminar com a perda dos IO, pode resultar na ocorrência da ONMM-IO. No entanto, a escassez de estudos clínicos e experimentais relacionados à eficácia e à segurança do DM no tratamento da PI em pacientes submetidos à terapia com drogas antirreabsortivas dificulta o estabelecimento de uma conduta segura e baseada em evidências científicas. Em um estudo clínico, Tempesta *et al.* (2022) reportaram que o tratamento mecânico convencional não se mostrou plenamente eficaz no controle da PI em pacientes osteoporóticos que faziam uso de medicamentos com ação antirreabsortiva. Resultados semelhantes também foram relatados por Seki *et al.* (2021) e Yuan *et al.* (2012).

Ademais, deve-se levar em consideração o fato de que o tratamento mecânico da PI, à semelhança da raspagem e alisamento radicular (RAR), proposta o tratamento da periodontite, embora seja menos invasivo do que as alternativas cirúrgicas, é capaz de provocar certo trauma nos tecidos peri-implantares e, assim, até mesmo exacerbar a resposta inflamatória em um primeiro momento. Segundo o estudo experimental desenvolvido por Araújo (2017), o emprego da RAR em ratos submetidos ao tratamento com zoledronato não alterou a perda óssea alveolar, no entanto, aumentou consideravelmente a quantidade de tecido ósseo não vital na região e provocou a exacerbação da resposta inflamatória local, levando a um quadro condizente com o estágio 0 da ONMM. Estudos clínicos também reportaram o desencadeamento da ONMM após a RAR de sítios com doença periodontal em pacientes sob tratamento com drogas antirreabsortivas (BRAUN; IACONO, 2006; DINIZ-FREITAS *et al.*, 2018). Além disso, como a periodontite é apontada também como um fator de risco para a ONMM, assim como a PI, os casos em que o seu tratamento mecânico foi o verdadeiro desencadeador da manifestação clínica da doença podem ter sido subestimados.

Diante do exposto, verifica-se que o DM convencional exige muita cautela por parte do cirurgião-dentista no tratamento da PI em pacientes sob terapia com medicamentos antirreabsortivos. Ao passo em que parece exercer um papel vantajoso e benéfico por desorganizar o biofilme, reduzir a contaminação bacteriana local e levar à diminuição da resposta inflamatória relacionada à presença de infecção, pode acarretar um trauma mecânico aos tecidos peri-implantares e se constituir em um fator de risco adicional e ponto de gatilho para o desencadeamento da ONMM-IO, com consequências ainda mais graves e debilitantes. Assim, devido à escassez de estudos experimentais adequados e aos controversos achados

clínicos disponíveis na literatura, ainda não é possível estabelecer a real efetividade e segurança desta proposta terapêutica, tornando necessário o seu emprego e avaliação em modelos experimentais padronizados e que reúnam as principais características clínicas nas quais se desenvolvem tais alterações.

Ojetivos

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo primário avaliar a efetividade e a segurança do emprego do debridamento mecânico no tratamento da peri-implantite experimental induzida por biofilme com o uso de ligadura, em implantes já osseointegrados na maxila de ratas senescentes e submetidas à terapia posterior com dosagem oncológica de zoledronato, principalmente no que diz respeito à capacidade de tal abordagem terapêutica em prevenir ou desencadear a ONMM-IO, quando comparada à progressão da peri-implantite na ausência de qualquer tratamento local.

Os objetivos secundários do presente estudo foram: avaliar os efeitos da terapia com dosagem oncológica de zoledronato sobre os tecidos situados ao redor de implantes já osseointegrados na cavidade bucal e verificar se a presença de tais implantes pode consistir em um fator predisponente para a ONMM durante o tratamento com drogas antirreabsortivas e; avaliar os efeitos da terapia com dosagem oncológica de zoledronato sobre os tecidos situados ao redor de implantes osseointegrados acometidos pela peri-implantite e verificar se ocorrem alterações potencialmente capazes de colocar tal condição patológica como um fator de risco precipitante para a ocorrência da ONMM-IO durante o tratamento com drogas antirreabsortivas.



etodologia

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS UTILIZADOS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

No presente estudo foram utilizadas 50 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com 14 meses de idade e peso corporal médio de 380g no início do período experimental. Os animais foram obtidos no Biotério Central do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IBB-UNESP) e, posteriormente, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Ciências Básicas (disciplina de Histologia e Embriologia) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA-UNESP), sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas escuro, temperatura ambiente controlada 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 $55 \pm 5\%$, e acondicionamento em gaiolas plásticas com, no máximo, quatro animais por gaiola, onde tiveram livre acesso à água e ao alimento (ração industrializada Presence® Ratos e Camundongos, Neovia Nutrição e Saúde Animal Ltda., Paulínia/SP, BRA). Todas as medidas cabíveis foram tomadas para se minimizar e/ou reduzir o número de animais utilizados, bem como evitar o seu sofrimento.

Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados segundo as normas preconizadas pelo “*Guide to the care and use of experimental animals*”, elaborado pelo Conselho Canadense de Cuidado Animal (CCAC, *Canadian Council on Animal Care*), e de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA-UNESP em 10/05/2019 (Processo FOA nº. 00330-2019; vide APÊNDICE A).

3.1.1 Protocolo de habituação dos animais

Ao serem trazidos do Biotério Central para o Biotério de Experimentação, os animais passaram por um período de habituação, com a principal finalidade de promover a sua familiarização com o ambiente e com o operador, além de minimizar o estresse provocado por algumas manobras pré-operatórias e de manipulação. Tal protocolo compreendeu os 14 dias que antecederam o início dos experimentos, sendo que neste período, a cada quatro dias, cada animal foi suavemente manuseado entre as mãos do operador por um tempo de 30 segundos,

no qual foram regularmente aplicadas as manobras de restrição que simularam àquelas que seriam empregadas no posterior protocolo experimental.

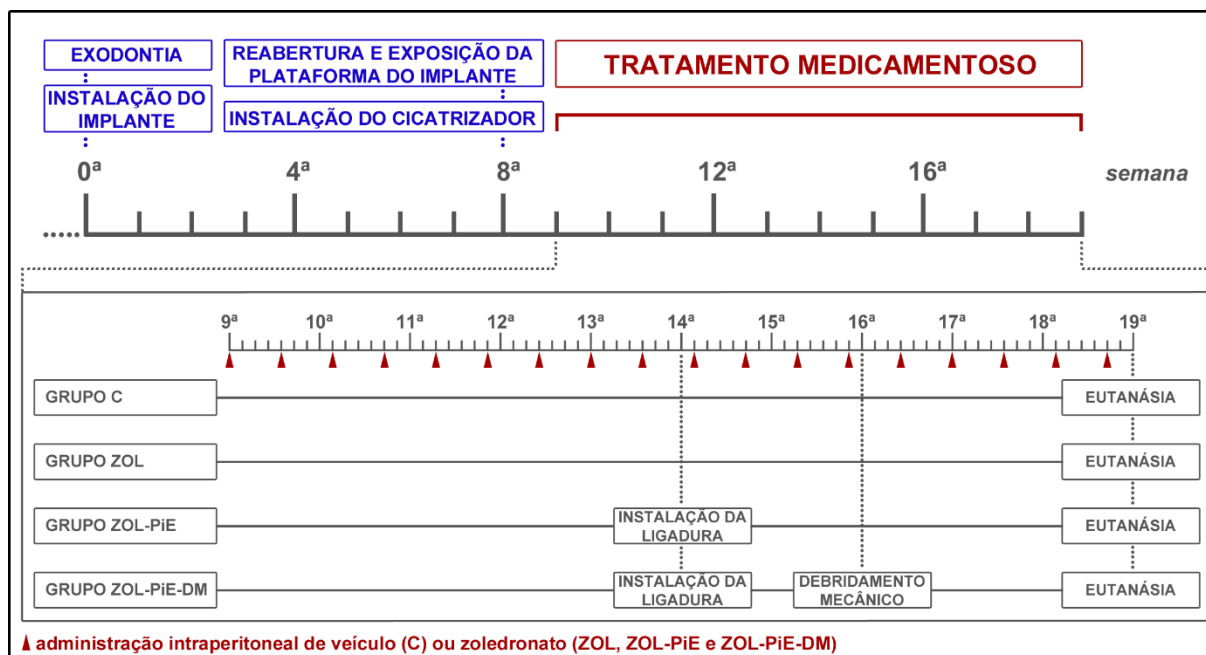
3.1.2 Anestesia geral

Para todos os procedimentos cirúrgicos e/ou que envolveriam dor, desconforto ou necessidade de imobilização do animal por um tempo prolongado, isto é, para a exodontia do incisivo superior e instalação do implante de titânio, reabertura e exposição da plataforma do implante de titânio, instalação da ligadura de algodão, remoção da ligadura de algodão e execução do debridamento mecânico e eutanásia, os animais foram adequadamente anestesiados, via injeção intramuscular (IM), de cloridrato de cetamina (80mg/Kg; Cetamin[®], Syntec do Brasil Ltda., Santana do Parnaíba/SP, BRA) acrescido de cloridrato de xilazina (10mg/Kg; Xilazin[®], Syntec do Brasil Ltda.). Tal associação medicamentosa, dosagem e mecanismo de indução anestésica mostraram-se efetivos e estão de acordo com os protocolos preconizados por Ervolino *et al.* (2019), Statkiewicz *et al.* (2018) e Toro *et al.* (2019).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os procedimentos executados ao longo de todo o período experimental nos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais podem ser observados, de forma cronológica e sintetizada, por meio do fluxograma ilustrado na FIGURA 4.

FIGURA 4 - Fluxograma dos procedimentos executados ao longo do período experimental, com destaque para os eventos compreendidos durante o plano de tratamento medicamentoso e os diferentes grupos experimentais.



FONTE: O Autor (2023).

3.2.1 Exodontia do incisivo superior e instalação do implante de titânio

No primeiro dia do período experimental, com todos os animais submetidos à anestesia geral, foi realizada a exodontia do incisivo superior direito, seguida pela instalação imediata de um implante de titânio no respectivo sítio de extração dental (FIGURA 4). Para isso, inicialmente foi realizada antisepsia extraoral com solução tópica de polivinilpirrolidona iodo (PVPI) 10% e antisepsia intraoral com solução tópica de digluconato de clorexidina 0,12%. Com o auxílio de um instrumental odontológico do tipo Hollembach 3S (Quinelato®, Schobell Industrial Ltda., Rio Claro/SP, BRA) foram realizados o descolamento e a sindesmotomia dos tecidos periodontais de proteção, seguidos de uma cuidadosa luxação do incisivo superior direito, por meio de movimentos de alavanca interfixa e inter-resistente nos sentidos méso-distal e vestibulo-palatino do elemento dentário, com o intuito de romper as fibras principais e secundárias do ligamento periodontal (FIGURA 5a). Com uma pinça clínica romba de maior diâmetro de ponta ativa foi realizada a apreensão do dente na região de seu colo anatômico, seguida por um movimento de tração rotacionada no sentido vestibulo-palatino, culminando com a extração dental (FIGURA 5b, FIGURA 5c). Convém destacar que o incisivo superior destes roedores apresenta o formato aproximado de uma letra C e, devido ao seu crescimento radicular contínuo ao longo da vida do animal, é possível observar a presença da papila dentária apical na extremidade da raiz (LOSCO, 1995).

Deste modo, imediatamente após o procedimento de exodontia, todos os dentes removidos foram avaliados segundo a sua morfologia e presença da papila dentária apical, o que assegurou a inexistência de fraturas e/ou de remanescentes dentais e teciduais no alvéolo.

Em seguida, no alvéolo dental previamente ocupado pelo incisivo superior direito, foi instalado um implante confeccionado em liga de titânio, especialmente projetado para tal finalidade, apresentando formato cilíndrico, com 2,5mm de diâmetro por 5,7mm de comprimento, conexão do tipo hexágono interno e superfície tratada por meio de jateamento e ataque ácido (Dentfix[®], Allied Titanium Eireli, Santa Rita do Passa Quatro/SP, BRA) (FIGURA 6). Com o auxílio de uma chave digital acoplada à conexão interna do implante e por meio de movimentos de rosqueamento, o implante foi inserido até que se obtivesse um travamento primário adequado e, conseqüentemente, a sua estabilização, garantida pelas paredes laterais e pela própria curvatura do alvéolo dental. A inserção do implante foi realizada de forma lenta e gradual, respeitando a resiliência do tecido ósseo, e objetivando a expansão progressiva das paredes laterais do alvéolo, até que fosse alcançado um posicionamento da plataforma do implante a nível gengival ou minimamente subgengival (FIGURA 5d, FIGURA 5e). Imediatamente após a instalação, os tecidos moles peri-implantares foram reposicionados e suturados com fio de seda 4.0 (Shalon Suturas[®], São Luís de Montes Belos/GO, BRA) para estabilização e manutenção do coágulo sanguíneo no local (FIGURA 5f). Findada a presente etapa de procedimentos cirúrgicos, os animais receberam 0,1ml/Kg de associação anti-infecciosa polivalente (Pentabiótico Veterinário[®], Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda., Campinas/SP, BRA), via IM, conforme protocolo para prevenção de infecções (PALIN *et al.*, 2018).

Os implantes foram mantidos em posição, sem qualquer intervenção, por um período de 56 dias (oito semanas), visando a obtenção de sua osseointegração.

3.2.2 Reabertura e exposição da plataforma do implante de titânio

Na 8ª semana pós-operatória foi realizada a reabertura do sítio de implantação, com a conseqüente exposição da plataforma do implante de titânio na cavidade bucal dos animais (FIGURA 4). Para isso, após a anestesia geral e antisepsia, foi realizada a anestesia local com infiltração subperiosteal de lidocaína 2% acrescida de adrenalina 1:100.000 (Alphacaine 100[®], DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro/RJ, BRA), para hemostasia e adequada visualização do campo operatório. Uma incisão linear com lâmina de bisturi 15C foi realizada no rebordo alveolar sobre a região implantada, e um retalho de espessura total foi rebatido

com o auxílio de um instrumental odontológico do tipo Hollembach 3S (Quinelato[®], Schobell Industrial Ltda.), permitindo a exposição e a visualização da plataforma do implante de titânio instalado. Em alguns espécimes, após a confecção e rebatimento do retalho tecidual, houve a necessidade de remoção de uma pequena quantidade de tecido ósseo que recobria a plataforma do implante, sendo então realizada a osteotomia com uma broca esférica nº. 4, montada em motor cirúrgico com 600rpm (Neosurg XT Plus, Neodent[®], JJGC Indústria e Comércio de Materiais Dentários S.A., Curitiba/PR, BRA), acompanhada por irrigação constante com solução salina fisiológica e aspiração com sugador de alta potência.

Um cicatrizador com 1,8mm de altura, especialmente projetado para esta finalidade (Dentfix[®], Allied Titanium Eireli) (FIGURA 6), foi instalado sobre a plataforma do implante com o auxílio de uma chave digital em movimentos de rosqueamento. Neste momento, a estabilidade secundária do implante foi aferida clinicamente e aqueles animais cujos implantes não se encontravam perfeitamente estáveis e osseointegrados foram excluídos do experimento.

Ao final, uma sutura simples interrompida com fio de seda 4.0 (Shalon Sutures[®]) foi realizada para reaproximação e estabilização dos tecidos peri-implantares ao redor do cicatrizador, o qual permaneceu exposto na cavidade bucal. Os animais foram mantidos em observação, sem qualquer intervenção, por um período de sete dias, visando a reparação dos tecidos manipulados previamente à etapa experimental seguinte.

3.2.3 Definição dos grupos experimentais e plano de tratamento medicamentoso

Na 9ª semana do período experimental, ou seja, sete dias após a reabertura e exposição da plataforma do implante de titânio, os animais cujos implantes se encontravam osseointegrados (N=24) foram igualmente e de forma aleatória distribuídos em quatro grupos experimentais: C (Controle), ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM. Foi então iniciado o protocolo medicamentoso, o qual perdurou por dez semanas, ou seja, estendendo-se até a 19ª semana do período experimental (FIGURA 4). O protocolo medicamentoso consistiu na administração intraperitoneal (IP), a cada quatro dias, de 0,45ml de veículo (solução salina fisiológica, NaCl 0,9%), para os animais do grupo C, ou de 0,45ml de veículo acrescido de 100µg/Kg de zoledronato (*Zoledronic Acid Monohydrate*, Sigma-Aldrich Co., St. Louis/MO, EUA), para os animais dos grupos ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM. A dose e o plano de tratamento medicamentoso empregados no presente estudo consistiram em uma adaptação para o rato do protocolo atualmente utilizado para complementação da terapia oncológica em humanos,

segundo estabelecido por estudos prévios (ERVOLINO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2015; STATKIEVICZ *et al.*, 2018; TORO *et al.*, 2019).

3.2.3.1 Grupos experimentais

Grupo C (n=6): os animais receberam injeção IP constituída apenas por veículo, a cada quatro dias, durante dez semanas, ou seja, a partir da 9ª até a 19ª semana do período experimental. A eutanásia foi executada na 19ª semana do período experimental (FIGURA 4).

Grupo ZOL (n=6): os animais receberam injeção IP constituída por veículo acrescido de zoledronato, a cada quatro dias, durante dez semanas, ou seja, a partir da 9ª até a 19ª semana do período experimental. A eutanásia foi executada na 19ª semana do período experimental (FIGURA 4).

Grupo ZOL-PiE (n=6): os animais receberam injeção IP constituída por veículo acrescido de zoledronato, a cada quatro dias, durante dez semanas, ou seja, a partir da 9ª até a 19ª semana do período experimental. Decorridas cinco semanas do início do tratamento medicamentoso, receberam uma ligadura de algodão ao redor do implante instalado para indução da peri-implantite experimental, a qual permaneceu em posição por mais cinco semanas. A eutanásia foi executada na 19ª semana do período experimental (FIGURA 4).

Grupo ZOL-PiE-DM (n=6): os animais receberam injeção IP constituída por veículo acrescido de zoledronato, a cada quatro dias, durante dez semanas, ou seja, a partir da 9ª até a 19ª semana do período experimental. Decorridas cinco semanas do início do tratamento medicamentoso, receberam uma ligadura de algodão ao redor do implante instalado para indução da peri-implantite experimental, a qual permaneceu em posição por um período de duas semanas, quando então foi removida e realizado o tratamento local por meio do debridamento mecânico. A eutanásia foi executada na 19ª semana do período experimental (FIGURA 4).

3.2.4 Peri-implantite experimental (PiE) induzida por ligadura

Na 14ª semana do período experimental, com os animais devidamente anestesiados e após a antissepsia, nos grupos ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM foi instalada uma ligadura de algodão (#24; Coats Corrente Ltda., São Paulo/SP, BRA) ao redor da porção cervical do cicatrizador acoplado ao implante, de modo que tal ligadura se mantivesse posicionada na região do sulco peri-implantar (FIGURA 5g, FIGURA 5h, FIGURA 5i), levando ao acúmulo

de biofilme bacteriano e, conseqüentemente, ao desencadeamento da PiE (FIGURA 5j). No grupo ZOL-PiE, com o objetivo de se avaliar a progressão da doença na ausência de qualquer tratamento local, a ligadura foi mantida em posição até o final do período experimental. No grupo ZOL-PiE-DM, a ligadura foi mantida em posição por um período de duas semanas, quando então foi removida e executado o tratamento local por meio do debridamento mecânico (FIGURA 4).

3.2.5 Tratamento local por debridamento mecânico (DM)

Na 16ª semana, ou seja, duas semanas após a instalação da ligadura de algodão, com os animais devidamente anestesiados e após a antissepsia, no grupo ZOL-PiE-DM foi realizada a remoção da ligadura seguida por uma única sessão de DM com curetas manuais plásticas (Supremo® Instrumentos Cirúrgicos, São Paulo/SP, BRA) (FIGURA 4), através de movimentos de tração em sentido méso-distal (nas faces vestibular e lingual) e movimentos de tração em sentido vestibulo-palatino (nas faces mesial e distal) nas espiras do implante expostas na cavidade bucal, nos espaços existentes entre elas e na região de conexão com o cicatrizador (FIGURA 5k, FIGURA 5l).

3.2.6 Cuidados pós-operatórios de rotina

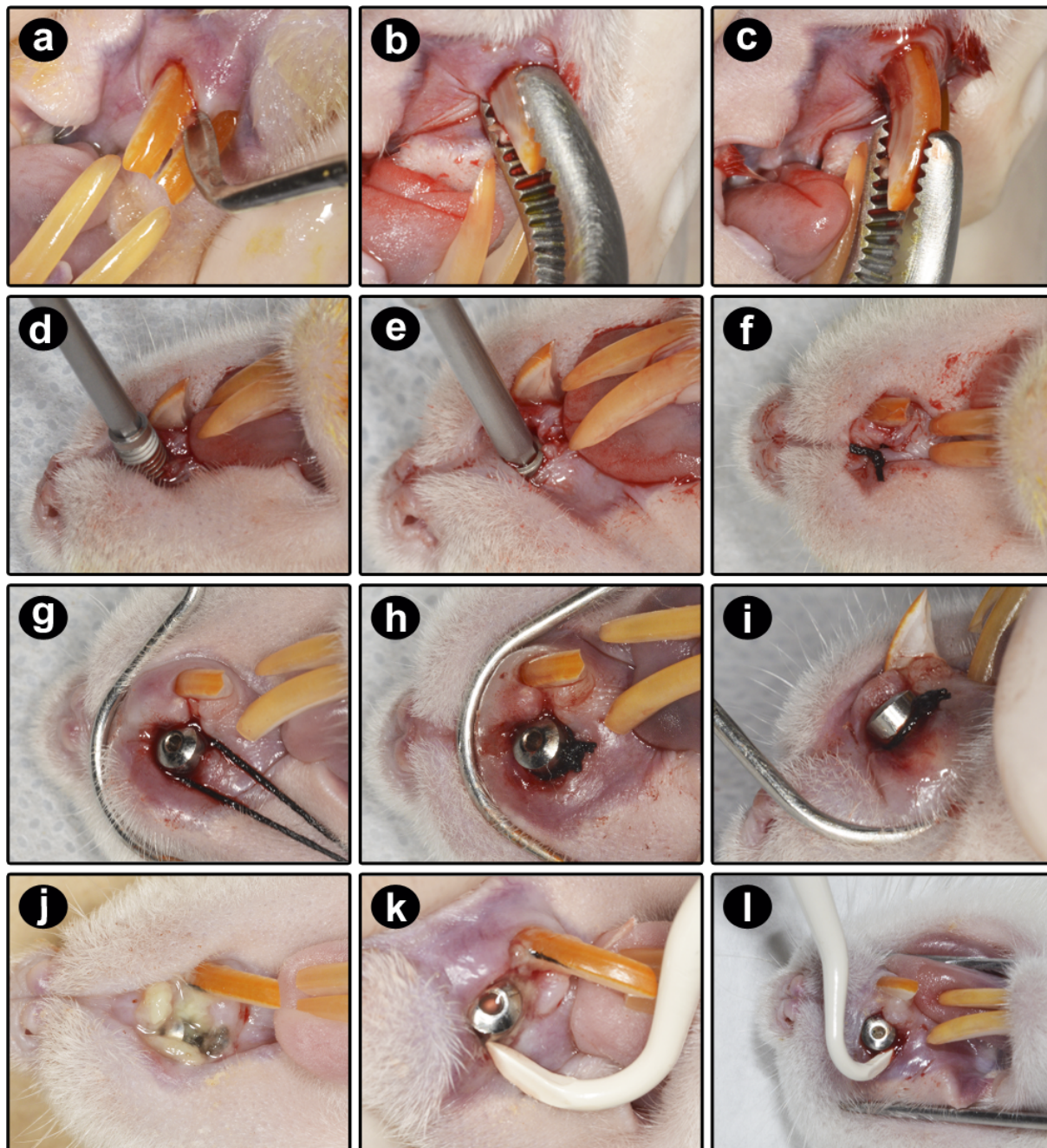
Desde a instalação do implante até o final do período experimental, todos os animais foram submetidos à dieta exclusiva com ração industrializada triturada, com o objetivo de facilitar a sua alimentação e minimizar o estresse biomecânico da mastigação sobre o implante instalado. Além disso, devido ao crescimento contínuo dos incisivos dos roedores, semanalmente os incisivos inferiores foram cortados ao nível de sua região coronária de esmalte e dentina sem, contudo, haver exposição pulpar, com o intuito de evitar uma ação mecânica prejudicial destes dentes sobre a área em que o implante foi instalado.

3.2.7 Eutanásia e obtenção das amostras

Findado o período experimental, ou seja, na 19ª semana, todos os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à eutanásia (FIGURA 4), por meio de perfusão transcardíaca com 100ml de solução salina fisiológica acrescida de 0,1% de heparina, seguida por 800ml de solução fixadora, constituída de 4% de formaldeído (*Paraformaldehyde*, Sigma-

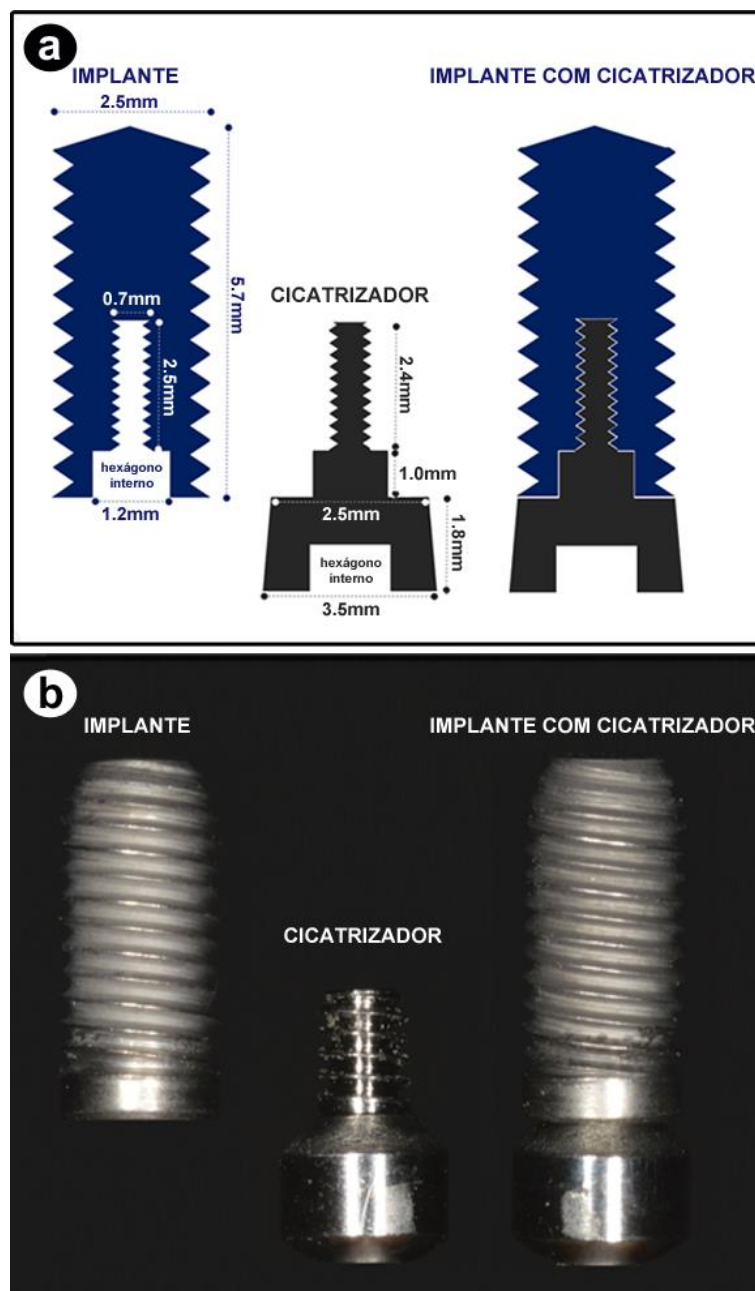
Aldrich Co.) em tampão fosfato-salino (PBS, *Phosphate Buffered-Saline*), 0,1M, pH 7,4. As maxilas contendo os implantes foram dissecadas e submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora pelo período de 48 horas para o processamento laboratorial subsequente.

FIGURA 5 - Sequência de procedimentos cirúrgicos e clínicos executados ao longo do período experimental.



(a-c) Sindesmotomia e luxação, apreensão e exodontia do incisivo superior direito. (d-f) Instalação do implante de titânio no alvéolo previamente ocupado pelo incisivo superior direito, por meio de movimentos de rosqueamento com chave digital acoplada à conexão interna do implante, seguida pela sutura dos tecidos moles peri-implantares. (g-i) Instalação e posicionamento da ligadura de algodão ao redor da porção cervical do cicatrizador acoplado ao implante para indução da peri-implantite experimental. (j-l) Acúmulo de biofilme ao redor da ligadura de algodão após duas semanas de sua instalação e utilização de curetas manuais plásticas para a execução do debridamento mecânico nos animais do grupo ZOL-PiE-DM. FONTE: O Autor (2023).

FIGURA 6 - Representação gráfica e fotografia evidenciando as características estruturais do implante de titânio e do cicatrizador utilizados no presente estudo.



(a) Desenho esquemático da estrutura do implante de titânio e do cicatrizador com as suas respectivas dimensões. (b) Fotografia evidenciando o implante de titânio e o cicatrizador de forma individualizada e acoplados um ao outro. Abreviação: *mm*, milímetros. FONTE: O Autor (2023).

3.3 PROCESSAMENTO LABORATORIAL

Após o período de fixação, as maxilas foram lavadas em água corrente por 12 horas e, em seguida, foram imersas em solução desmineralizadora, constituída por 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, *Ethylenediaminetetraacetic Acid*, Sigma-Aldrich Co.) em PBS, durante 70 dias. Após a completa desmineralização, os espécimes foram novamente

lavados em água corrente por 24 horas e os implantes foram cuidadosamente desrosqueados e removidos com o auxílio de uma chave digital acoplada à conexão interna dos cicatrizadores instalados aos implantes.

As amostras foram então desidratadas pelo etanol (Synth[®], Labsynth Produtos Para Laboratórios Ltda., Diadema/SP, BRA) em série crescente de concentração (de 70°GL a 100°GL), diafanizadas pelo xilol (Synth[®], Labsynth Produtos Para Laboratórios Ltda.), impregnadas pela parafina histológica (Synth[®], Labsynth Produtos Para Laboratórios Ltda.) em estufa com temperatura controlada (56°C a 58°C) e, por fim, incluídas na parafina histológica, de modo que o longo eixo da loja anteriormente ocupada pelo implante ficasse paralelo à superfície do bloco de parafina. A microtomia foi executada com 5µm de espessura, seguindo um plano de corte longitudinal em relação à loja anteriormente ocupada pelo implante, com progressão no sentido látero-lateral, ou seja, de mesial para distal. Os cortes seriados correspondentes à região central de tal loja foram coletados e as secções histológicas foram montadas em lâminas de vidro silanizadas para microscopia de luz (Platinum Line[®] StarFrost, Mercedes Medical LLC., Sarasota/FL, EUA) (TORO, 2019).

3.3.1 Coloração pela hematoxilina-eosina (HE)

Para a análise histopatológica e análises histométricas nas respectivas áreas de interesse, secções histológicas das amostras de cada grupo experimental foram submetidas à coloração pela HE. Para isso, foi realizada a desparafinização inicial em estufa com temperatura controlada (56°C a 58°C), seguida pela desparafinização completa pelo xilol, reidratação pelo etanol em sequência decrescente de concentração (de 100°GL a 70°GL) e imersão em hematoxilina de Harris e eosina, durante 45 segundos e 5 minutos, respectivamente. Após o processo de coloração, as lâminas histológicas foram novamente banhadas pelo etanol em sequência crescente de concentração (de 70°GL a 100°GL), banhadas pelo xilol e, por fim, recobertas com lamínulas de vidro (Olen[®], Kasvi Produtos Laboratoriais, São José dos Pinhais/PR, BRA) fixadas em meio de montagem (PermOUNT[®], Fisher Scientific Company LLC., San Diego/CA, EUA) (TORO, 2019).

3.3.2 Reação imunoistoquímica

A reação imunoistoquímica foi direcionada à detecção dos seguintes biomarcadores: fator de necrose tumoral (TNF, *Tumor Necrosis Factor*) alfa (TNFα) e interleucina (IL,

Interleukin) 1 beta (IL-1 β), duas das principais citocinas com atividade pró-inflamatória; fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*), um regulador da angiogênese e vasculatura; osteocalcina (OCN, *Osteocalcin*), um marcador da atividade de células da linhagem osteoblástica e; fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, *Tartrate-Resistant Acid Phosphatase*), um marcador de células da linhagem osteoclástica.

Para a análise de quantificação da densidade de imunomarcção ou contagem de células imunomarcadas nas respectivas áreas de interesse, secções histológicas das amostras de cada grupo experimental foram submetidas à reação imunoistoquímica por meio da técnica da imunoperoxidase indireta. Para isso, foi realizada a desparafinização inicial em estufa com temperatura controlada (56°C a 58°C), seguida pela desparafinização completa pelo xilol e reidratação pelo etanol em sequência decrescente de concentração (de 100°GL a 70°GL). A partir desta e previamente às próximas etapas da reação imunoistoquímica, as secções histológicas foram lavadas em PBS e em PBS acrescido de 0,05% de Triton® X-100 (Sigma-Aldrich Co.).

A recuperação antigênica foi realizada por meio da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato 10mM e pH 6,0 (*Antigen Retrieval Buffer*, Spring Bioscience Corporation, Pleasanton/CA, EUA), colocadas em câmara pressurizada (Decloaking Chamber®, Biocare Medical LLC., Concord/CA, EUA), alcançando a temperatura máxima de 95°C, seguida pelo resfriamento gradual até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram imersas em soluções constituídas de 3% de peróxido de hidrogênio em PBS e de 4% de leite em pó desnatado em PBS, para o bloqueio da peroxidase e da biotina endógenas, respectivamente. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado em solução constituída de 1,5% de soro albumina bovino (BSA, *Bovine Serum Albumine*) em PBS acrescido de 0,05% de Triton® X-100 (Sigma-Aldrich Co.).

As lâminas contendo as amostras de cada grupo experimental foram então divididas em cinco lotes, sendo que cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários, na concentração 1:100, durante 24 horas: anti-TNF α do rato gerado em coelho (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz/CA, EUA), anti-IL-1 β do rato gerado em coelho (Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-VEGF do rato gerado em coelho (Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-OCN do rato gerado em coelho (Santa Cruz Biotechnology Inc.) e anti-TRAP do rato gerado em cabra (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Em sequência, para amplificação do sinal, as secções histológicas foram incubadas em solução contendo anticorpo secundário biotinilado universal, durante 90 minutos, e, posteriormente, tratadas pela estreptavidina conjugada à peroxidase da raiz forte (HRP, *Horseradish Peroxidase*), durante 90 minutos

(*Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit*, Dako North America Inc., Carpinteria/CA, EUA).

A revelação foi realizada utilizando-se como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (*Liquid DAB+ Substrate Chromogen System*, Dako North America Inc.), durante 60 segundos. As secções histológicas incubadas com o anticorpo primário anti-TRAP foram ainda submetidas à contra-coloração com hematoxilina de Harris, enquanto que as demais (anti-TNF α , anti-IL-1 β , anti-VEGF e anti-OCN) não foram contra-coradas a fim de se evitar interferências durante a análise de densidade de imunomarcação. Após o processo de revelação e/ou contra-coloração, as lâminas histológicas foram novamente banhadas pelo etanol em sequência crescente de concentração (de 70°GL a 100°GL), banhadas pelo xilol e, por fim, recobertas com lamínulas de vidro (Olen[®], Kasvi Produtos Laboratoriais) fixadas em meio de montagem (PermOUNT[®], Fisher Scientific Company LLC.). Como controle negativo da reação, as secções histológicas destinadas a esta finalidade foram submetidas às mesmas etapas descritas, suprimindo-se apenas a utilização dos respectivos anticorpos primários. Todas as etapas da reação imunoistoquímica foram executadas de acordo com protocolos padronizados descritos por Ervolino *et al.* (2019) e Toro (2019).

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

3.4.1 Análise da condição geral de saúde dos animais e exame clínico intraoral

Durante todo o período experimental a condição geral de saúde dos animais foi monitorada, sendo que as intercorrências foram registradas e devidamente analisadas. O peso corporal dos animais foi aferido em três momentos distintos ao longo do experimento, ou seja, previamente à exodontia do incisivo superior e instalação do implante de titânio, à reabertura e exposição da plataforma do implante de titânio e à eutanásia, e os resultados obtidos foram expressos em gramas (g), sob a forma de média $\pm$ desvio padrão em cada grupo experimental. O exame clínico intraoral consistiu na inspeção visual minuciosa da região a ser operada ou da região peri-implantar e adjacências nos mesmos momentos supracitados, sendo os resultados dos parâmetros clínicos avaliados descritos qualitativamente.

3.4.2 Análises microscópicas

As análises microscópicas das amostras foram realizadas por um examinador calibrado (L.F.T.) e validadas posteriormente por um histologista certificado (E.E.), ambos cegos aos grupos experimentais. Para a realização destas análises utilizou-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 ao microcomputador. As fotomicrografias das lâminas histológicas foram capturadas segundo as diferentes áreas de interesse para as análises microscópicas (FIGURA 7), com o auxílio do *software* ZEN2 (Blue edition; versão 6.1.7601; Carl Zeiss Microscopy GmbH).

3.4.2.1 Áreas de interesse (AI) para as análises microscópicas

Foram estabelecidas quatro AI distintas para as análises microscópicas, as quais foram denominadas de AI-1, AI-2, AI-3 e AI-4. As dimensões e o respectivo posicionamento das AI estão abaixo descritos e graficamente representados na FIGURA 7.

A AI-1 foi definida como a região compreendida em um retângulo com 6264µm por 4716µm, cujo maior lado acompanhava o longo eixo do implante, contendo todos os tecidos peri-implantares, em toda a extensão do implante.

A AI-2 foi definida como a região compreendida em um retângulo com 2784µm por 2096µm, cujo maior lado acompanhava o longo eixo do implante. Tal retângulo encontrava-se situado do lado palatino da loja anteriormente ocupada pelo implante, englobando as suas espiras centrais, sendo posicionado de modo que em sua metade proximal ao implante estavam incluídos as espiras e os tecidos peri-implantares imediatamente a elas associados, ou seja, aqueles neoformados durante o processo de reparação tecidual e osseointegração, enquanto que em sua metade distal ao implante estava incluído o tecido ósseo pré-existente na região.

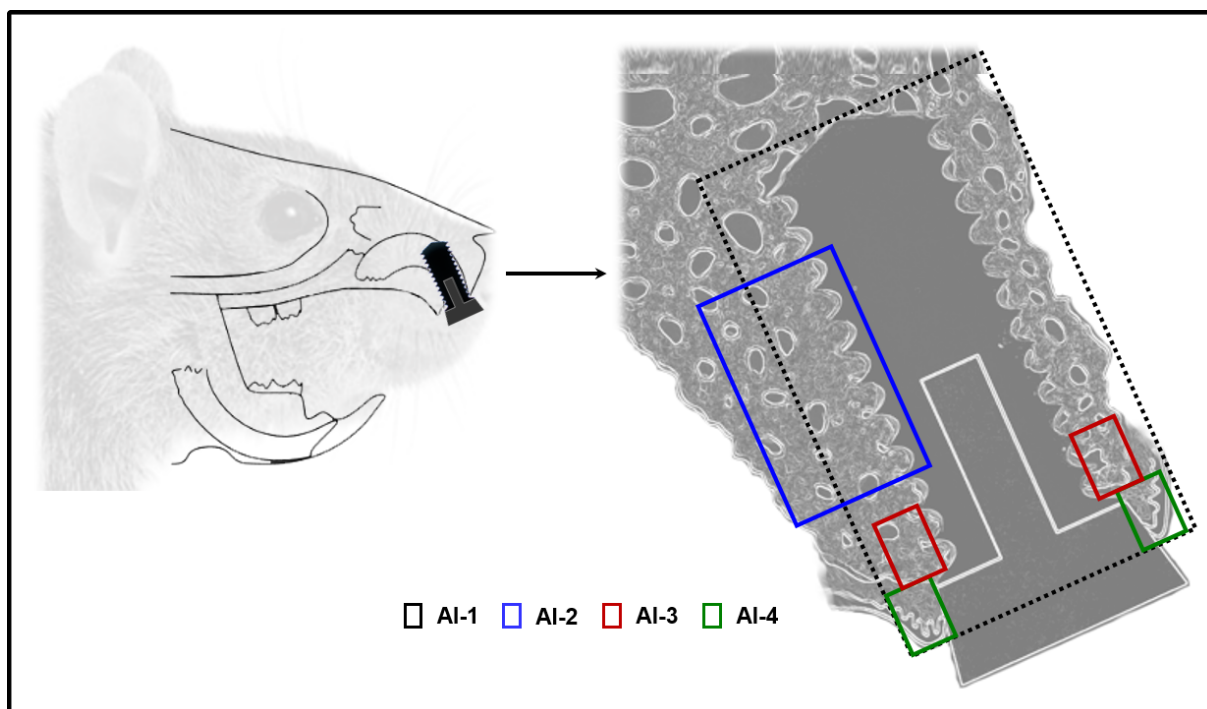
A AI-3 foi definida como a região compreendida em dois retângulos, cada um com 348µm por 262µm, cujos lados maiores acompanhavam o longo eixo do implante. Tais retângulos encontravam-se situados no tecido ósseo peri-implantar do lado palatino e do lado vestibular da loja anteriormente ocupada pelo implante, respectivamente, sendo posicionados no centro do processo alveolar, tendo a crista óssea alveolar como limite coronário.

A AI-4 foi definida como a região compreendida em dois retângulos, cada um com 348µm por 262µm, cujos lados maiores acompanhavam o longo eixo do implante. Tais

retângulos encontravam-se situados na região de mucosa peri-implantar do lado palatino e do lado vestibular da loja anteriormente ocupada pelo implante, respectivamente, tendo em seu centro o tecido conjuntivo peri-implantar supra-alveolar.

As diferentes AI foram estabelecidas segundo o tipo de análise microscópica a ser realizada, a fim de se obter resultados representativos e mais fidedignos da real condição celular e tecidual da região peri-implantar (SOUZA, 2022).

FIGURA 7 - Posicionamento relativo e orientação do complexo implante-cicatrizador na maxila dos animais e representação das áreas de interesse para as análises microscópicas.



Abreviações: AI-1, área de interesse 1; AI-2, área de interesse 2; AI-3, área de interesse 3; AI-4, área de interesse 4. FONTE: O Autor (2023).

3.4.2.2 Análise histopatológica

A análise histopatológica foi efetuada na AI-1 anteriormente descrita. Nesta região foram avaliados os seguintes parâmetros: *a.* padrão de celularidade e estruturação dos tecidos moles peri-implantares, com especial atenção ao tecido conjuntivo peri-implantar; *b.* padrão de celularidade e estruturação do tecido ósseo peri-implantar; *c.* presença, natureza e intensidade da resposta inflamatória local e; *d.* extensão do processo inflamatório, quando existente. Os parâmetros histopatológicos avaliados foram baseados naqueles utilizados por Matheus *et al.* (2018) e Toro (2019).

3.4.2.3 Análises histométricas

As análises histométricas foram direcionadas à quantificação da porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e da porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) na região peri-implantar. Para isso, as fotomicrografias previamente adquiridas da AI-1 e AI-2 foram analisadas por meio do *software* ImageJ® (versão 1.5i; National Institute of Health, Bethesda/MD, EUA) e as respectivas mensurações foram realizadas com o auxílio da ferramenta *Polygon Selections*.

Para a análise histométrica da PTO-T, inicialmente foi mensurada a área total da AI-1 e desta foi subtraída a área referente ao espaço ocupado pelo implante, sendo o resultado definido como 100%. Na sequência, foi mensurada apenas a área ocupada pelo tecido ósseo compreendido dentro da AI-1, à qual foi atribuída a taxa percentual correspondente.

Para a análise histométrica da PTO-NV, inicialmente foi mensurada a área total de tecido ósseo compreendida dentro da AI-2, a qual foi definida como 100%. Na sequência, foi mensurada apenas a área correspondente ao tecido ósseo não vital existente nesta região, ou seja, aquela caracterizada pela presença de lacunas contíguas sem a presença de osteócitos e/ou contendo apenas remanescentes de tais células, à qual foi atribuída a taxa percentual correspondente.

Os resultados de ambas as análises histométricas foram expressos em porcentagem (%), sob a forma de média $\pm$ desvio padrão em cada grupo experimental (TORO, 2019).

3.4.2.4 Análises imunoistoquímicas

Para a análise da imunomarcação para TNF α , IL-1 β e VEGF foram utilizadas as respectivas fotomicrografias previamente adquiridas da AI-4. Para a análise da imunomarcação para OCN, por sua vez, foram utilizadas as respectivas fotomicrografias previamente adquiridas da AI-3. Por meio do *software* ImageJ® (versão 1.5i; National Institute of Health) foi realizada a demarcação da imunomarcação com o auxílio da ferramenta *Color Threshold*, para obtenção da densidade de imunomarcação nas áreas de interesse. Os resultados destas análises imunoistoquímicas foram expressos em porcentagem (%), sob a forma de média $\pm$ desvio padrão em cada grupo experimental (ERVOLINO *et al.*, 2019; SOUZA, 2022).

Para a análise da imunomarcação para TRAP foram utilizadas as respectivas fotomicrografias previamente adquiridas da AI-3. Por meio do *software* ImageJ® (versão 1.5i;

National Institute of Health) foram quantificadas as células imunorreativas para TRAP na área de interesse. O resultado desta análise imunoistoquímica foi expresso em quantidade de células por mm², sob a forma de média $\pm$ desvio padrão em cada grupo experimental (ERVOLINO *et al.*, 2019; TORO, 2019).

3.4.3 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do *software* BioEstat 5.3[®] (Instituto de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, Tefé/AM, BRA). Para a verificação da normalidade de distribuição das amostras, os dados foram submetidos ao teste estatístico de Shapiro-Wilk. Posteriormente, foi aplicado o teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).



Resultados

4 RESULTADOS

4.1 CONDIÇÃO GERAL DE SAÚDE DOS ANIMAIS E EXAME CLÍNICO INTRAORAL

Os animais incluídos no presente estudo apresentaram boas condições gerais de saúde, as quais se mantiveram estáveis durante todo o período experimental. Tais animais toleraram muito bem o protocolo medicamentoso empregado, bem como os procedimentos cirúrgicos, clínicos e de anestesia geral executados.

Ao exame clínico intraoral pré-operatório não foram constatadas alterações dentárias no incisivo superior direito a ser extraído ou lesões pré-existentes na cavidade bucal, em especial nas adjacências ao local de instalação do implante de titânio nas maxilas. No momento de reabertura e exposição da plataforma do implante de titânio, os animais incluídos neste estudo apresentavam o implante já osseointegrado, com adequada estabilidade secundária e resistência tanto à pressão digital de desrosqueamento quanto à instalação do cicatrizador sobre ele acoplado. Neste momento, também não foram constatadas lesões na cavidade bucal dos animais e os tecidos moles peri-implantares se mostravam completamente reparados e com aspecto de normalidade.

Ao exame clínico intraoral realizado previamente à eutanásia e coleta das amostras, ou seja, imediatamente após o término do protocolo medicamentoso, todos os implantes mostravam-se ainda clinicamente estáveis. No entanto, os animais pertencentes aos grupos tratados com zoledronato (ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM) apresentavam vermelhidão acentuada nos tecidos moles peri-implantares quando comparados aos animais do grupo C. ZOL-PiE apresentava um grande acúmulo de biofilme associado à ligadura de algodão, sendo possível constatar edema e eritema ainda mais exacerbados ao redor dos implantes. Os animais do grupo ZOL-PiE-DM apresentavam o quadro clínico de eritema peri-implantar semelhante ao apresentado pelos animais do grupo ZOL, no entanto, sem a presença de biofilme e do considerável edema observados em ZOL-PiE. Convém destacar que a indução da PiE pela ligadura de algodão nos grupos ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM não ocasionou a perda da estabilidade do implante em nenhum dos espécimes. Ao exame clínico também não foram observadas lesões semelhantes à ONMM estabelecidas em nenhum dos animais pertencentes aos grupos tratados com dosagem oncológica de zoledronato.

4.1.1 Peso corporal dos animais

Em uma análise individual e com base no peso corporal absoluto dos animais, todos apresentaram maior peso corporal no início do experimento, previamente à exodontia do incisivo superior e instalação do implante de titânio, quando comparado ao dia da reabertura e exposição da plataforma do implante de titânio, momento em foi realizada a aferição seguinte. Contudo, foi verificada uma boa adaptação aos procedimentos cirúrgicos e à dieta introduzida com ração industrializada triturada, com o posterior ganho de peso ao longo do período experimental.

Em uma análise estatística intragrupo, não houve diferença no peso corporal médio dos animais de um mesmo grupo experimental nos três momentos de aferição ao longo do experimento. Do mesmo modo, em uma análise intergrupos, não houve diferença no peso corporal médio dos animais de diferentes grupos experimentais nos três momentos de aferição (TABELA 1).

TABELA 1 - Peso corporal médio dos animais de cada grupo experimental durante os diferentes momentos de aferição ao longo do experimento.

Grupos experimentais	1ª aferição	2ª aferição	3ª aferição
C	381g ($\pm$ 36g)	348g ($\pm$ 37g)	381g ($\pm$ 30g)
ZOL	413g ($\pm$ 26g)	381g ($\pm$ 30g)	403g ($\pm$ 18g)
ZOL-PiE	389g ($\pm$ 28g)	381g ($\pm$ 28g)	412g ($\pm$ 24g)
ZOL-PiE-DM	321g ($\pm$ 34g)	296g ($\pm$ 11g)	326g ($\pm$ 30g)

Tabela apresentando o peso corporal médio dos animais dos grupos C, ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM, durante os três momentos de aferição (pesagem) ao longo do experimento, sendo eles: 1ª aferição - previamente à exodontia do incisivo superior e instalação do implante de titânio; 2ª aferição - previamente à reabertura e exposição da plataforma do implante de titânio e; 3ª aferição - previamente à eutanásia. Abreviações e símbolos: $\pm$, mais ou menos; g, gramas. FONTE: O Autor (2023).

4.2 ASPECTO HISTOPATOLÓGICO DOS TECIDOS PERI-IMPLANTARES

No grupo C observou-se um tecido conjuntivo denso não-modelado ao redor da região cervical dos implantes, o qual se apresentou com grande quantidade de fibroblastos, raras células inflamatórias e muito vascularizado (FIGURA 8a). O tecido ósseo situado ao redor dos implantes se mostrou com um padrão de celularidade e de estruturação de sua matriz óssea condizentes com um aspecto de normalidade (FIGURA 9b, FIGURA 10b). Neste grupo não se constatou perda óssea peri-implantar e nem reabsorção óssea ativa nas adjacências da

crista óssea alveolar. Os osteoclastos presentes se mostravam com características morfológicas típicas e difusamente distribuídos pelo tecido ósseo peri-implantar (FIGURA 8e).

No grupo ZOL observou-se uma concentração de células inflamatórias confinadas ao tecido conjuntivo peri-implantar, principalmente constituída por células mononucleadas. Este tecido conjuntivo se apresentou pouco fibroso e pouco vascularizado em relação às características comuns de um tecido conjuntivo inflamado (FIGURA 8b). A quantidade de tecido ósseo situado ao redor dos implantes se mostrou similar ao grupo C, no entanto, a quantidade de tecido ósseo não vital nesta região se apresentou nitidamente maior, ou seja, o padrão de celularidade do tecido ósseo se mostrou alterado (FIGURA 9c, FIGURA 10c). Neste grupo também não foi constatada perda óssea peri-implantar.

No grupo ZOL-PiE observou-se a presença de biofilme bacteriano na superfície dos tecidos moles situados ao redor do implante e um intenso infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo peri-implantar, com predomínio de células mononucleadas apoiadas em uma matriz extracelular com grande comprometimento de sua parte fibrosa. Poucos vasos sanguíneos estavam presentes nesta região e o infiltrado inflamatório observado se estendia até as proximidades do tecido ósseo. A inflamação peri-implantar se mostrou muito mais exacerbada em ZOL-PiE quando comparada aos demais grupos (FIGURA 8c). Foi observada uma discreta perda óssea alveolar peri-implantar, a qual ficou restrita ao terço cervical dos implantes. A quantidade de tecido ósseo não vital na região peri-implantar se mostrou nitidamente maior do que nos grupos C e ZOL, sendo que tais áreas de tecido ósseo não vital exibiam grandes dimensões neste grupo (FIGURA 9d, FIGURA 10d).

No grupo ZOL-PiE-DM constatou-se um moderado infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo situado ao redor dos implantes, predominantemente constituído por células mononucleadas. Neste grupo, observou-se uma moderada quantidade de delicadas fibras colágenas na matriz extracelular do tecido conjuntivo, além de poucos vasos sanguíneos nesta região (FIGURA 8d). Uma discreta perda óssea alveolar estava presente, porém, restrita à região cervical dos implantes. Neste grupo constatou-se um severo comprometimento do padrão de celularidade da matriz óssea, com presença de inúmeras áreas de tecido ósseo não vital, sendo estas muito mais extensas do que as observadas nos demais grupos (FIGURA 9e, FIGURA 10e).

Por fim, nos grupos ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM, observou-se uma quantidade nitidamente menor de osteoclastos quando comparada ao grupo C. Os raros osteoclastos presentes nos grupos tratados com zoledronato se mostravam com morfologia atípica, isto é,

arredondados, hipernucleados, com maiores dimensões e distantes da matriz óssea, sendo estas características indicativas de inatividade em tais células (FIGURA 8f). No grupo ZOL os raros osteoclastos se mostravam difusamente distribuídos pelo tecido ósseo, ao passo em que nos grupos ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM, estas raras células se encontravam nas adjacências da crista óssea alveolar.

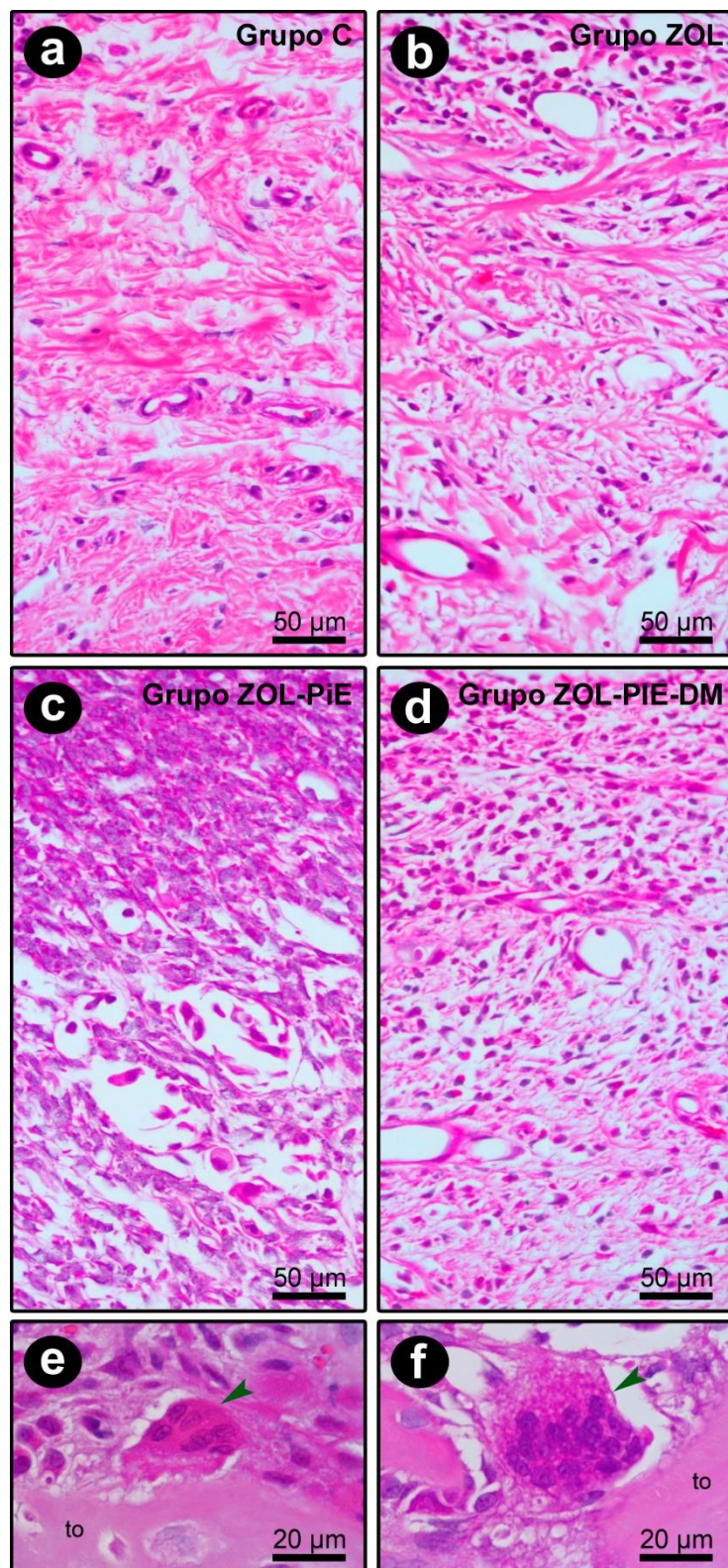
4.3 PORCENTAGEM DE TECIDO ÓSSEO TOTAL (PTO-T) NA REGIÃO PERI-IMPLANTAR

Não houve diferença na PTO-T entre os grupos C, ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM (FIGURA 9a).

4.4 PORCENTAGEM DE TECIDO ÓSSEO NÃO VITAL (PTO-NV) NA REGIÃO PERI-IMPLANTAR

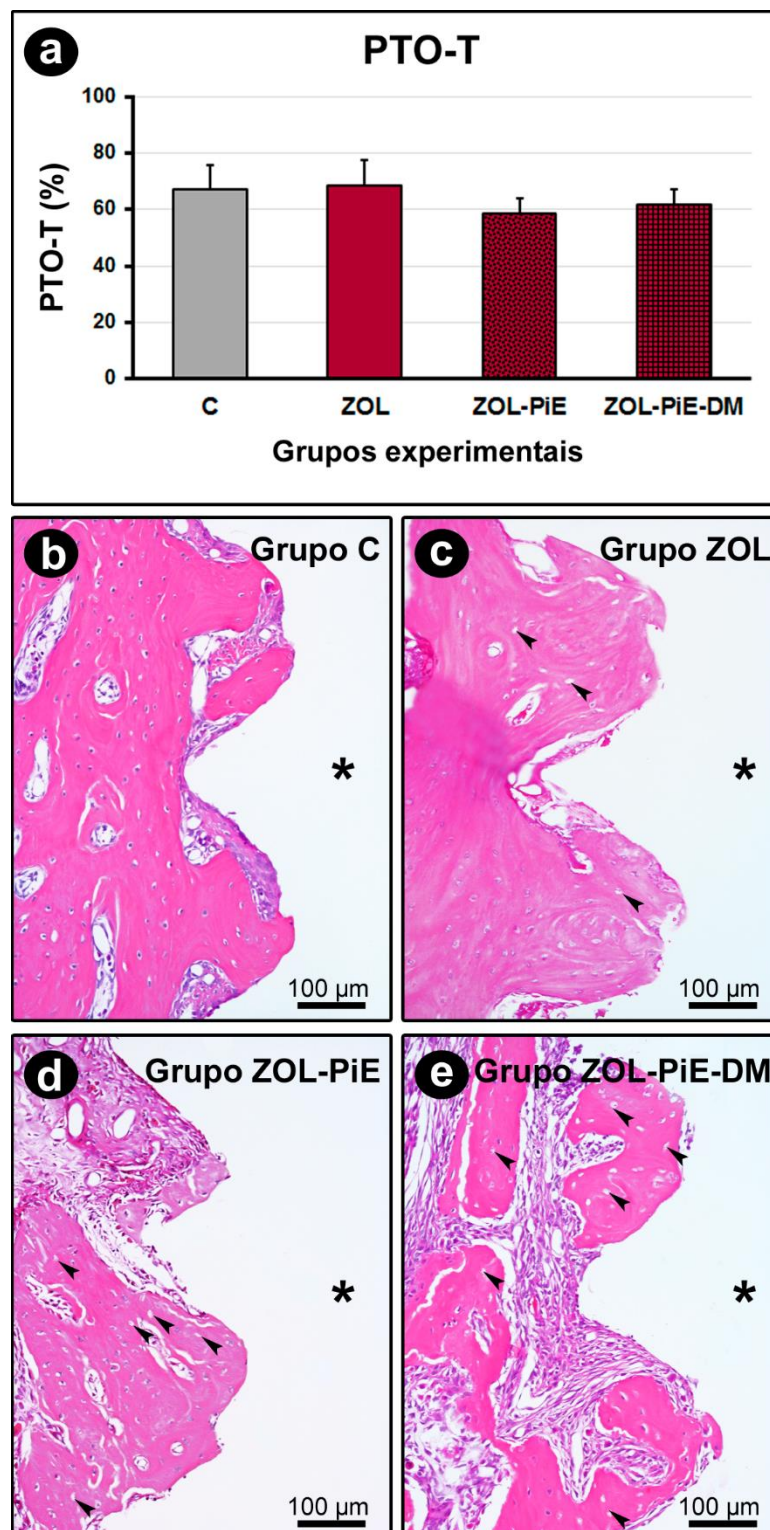
Os grupos ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM apresentaram maior PTO-NV em relação ao grupo C. O grupo ZOL-PiE apresentou maior PTO-NV em relação ao grupo ZOL. O grupo ZOL-PiE-DM apresentou maior PTO-NV em relação aos grupos ZOL e ZOL-PiE (FIGURA 10a).

FIGURA 8 - Aspecto histopatológico do tecido conjuntivo peri-implantar nos diferentes grupos experimentais e morfologia dos osteoclastos mediante os tratamentos medicamentosos.



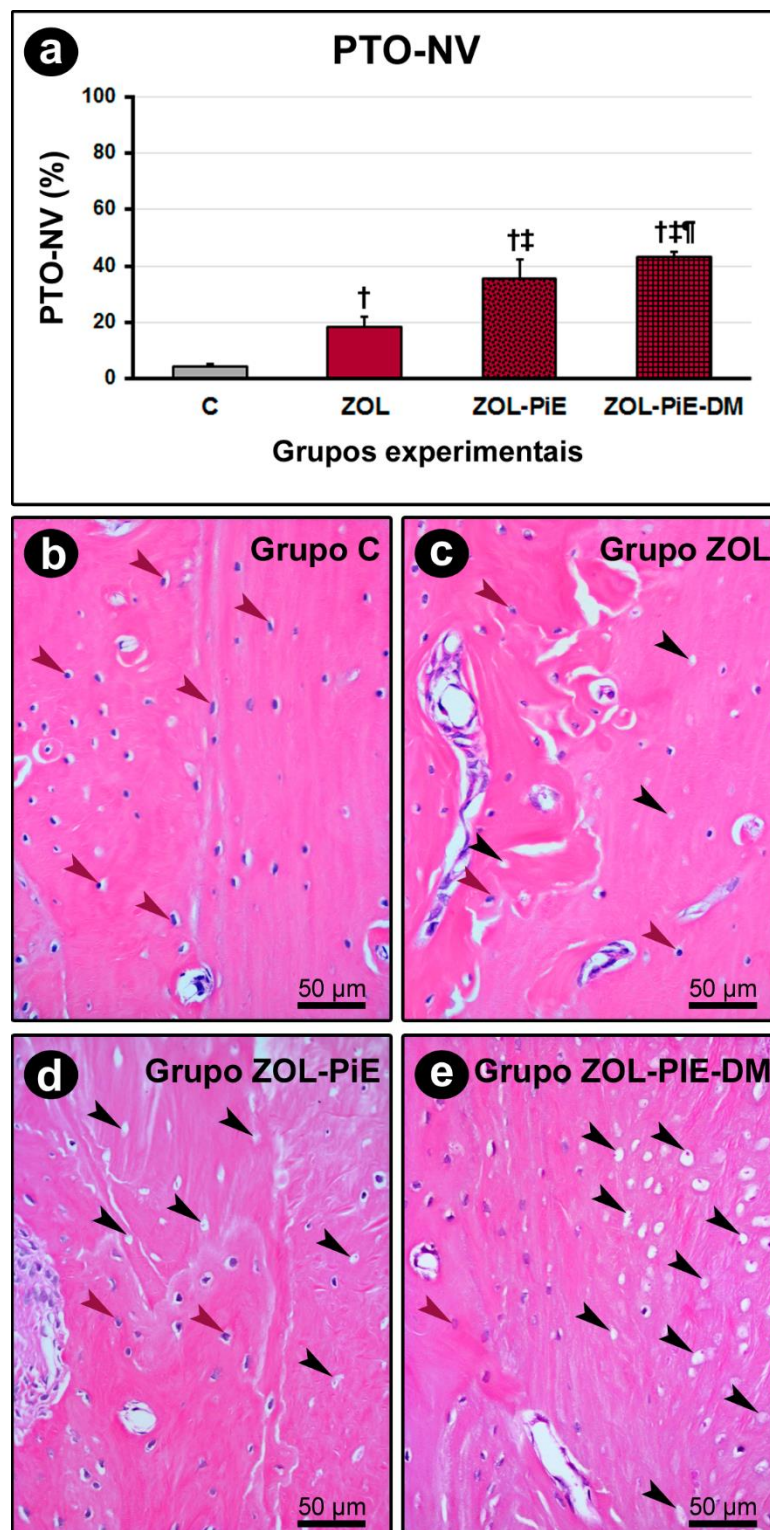
(a-d) Fotomicrografias evidenciando o padrão de celularidade e estruturação do tecido conjuntivo peri-implantar nos grupos C (a), ZOL (b), ZOL-PiE (c) e ZOL-PiE-DM (d). (e) Fotomicrografia evidenciando o aspecto morfológico de um osteoclasto típico no grupo C. (f) Fotomicrografia evidenciando o aspecto morfológico de um osteoclasto atípico, com características de inatividade, no grupo ZOL. Abreviações e símbolos: *setas verdes*, osteoclastos; *to*, tecido ósseo. Coloração: HE. Aumentos originais: 400x (a-d) e 1000x (e-f). Barras de escala: 50µm (a-d) e 20µm (e-f). FONTE: O Autor (2023).

FIGURA 9 - Porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e aspecto histopatológico do tecido ósseo peri-implantar nos diferentes grupos experimentais.



(a) Gráfico apresentando a PTO-T para os grupos C, ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM. **(b-e)** Fotomicrografias evidenciando a quantidade e o padrão de celularidade e estruturação do tecido ósseo situado entre as espiras do implante nos grupos C **(b)**, ZOL **(c)**, ZOL-PiE **(d)** e ZOL-PiE-DM **(e)**. Abreviações e símbolos: %, porcentagem; *, espaço anteriormente ocupado pelas espiras do implante; *PTO-T*, porcentagem de tecido ósseo total; *setas pretas*, lacunas desprovidas de osteócitos. Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100µm. FONTE: O Autor (2023).

FIGURA 10 - Porcentagem de tecido ósseo não vital (PTO-NV) e aspecto histopatológico do tecido ósseo peri-implantar nos diferentes grupos experimentais, com destaque para as áreas de tecido ósseo não vital.



(a) Gráfico apresentando a PTO-NV para os grupos C, ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM. **(b-e)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de celularidade e estruturação do tecido ósseo peri-implantar nos grupos C **(b)**, ZOL **(c)**, ZOL-PiE **(d)** e ZOL-PiE-DM **(e)**, com destaque para as áreas de tecido ósseo não vital. Abreviações e símbolos: %, porcentagem; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-PiE; PTO-NV, porcentagem de tecido ósseo não vital; setas pretas, lacunas desprovidas de osteócitos; setas vermelhas, osteócitos. Coloração: HE. Aumento original: 400x. Barras de escala: 50µm. FONTE: O Autor (2023).

4.5 PADRÃO DE IMUNOMARCAÇÃO PARA TNF α , IL-1 β , VEGF, OCN E TRAP

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de TNF α , IL-1 β , VEGF, OCN e TRAP mostrou alta especificidade na identificação de tais proteínas, a qual foi devidamente comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação.

A imunomarcação para TNF α e IL-1 β estava presente, predominantemente, em células inflamatórias (coloração marrom-escura confinada ao citoplasma) e, em menor intensidade, na matriz extracelular do tecido conjuntivo peri-implantar (FIGURA 11b, FIGURA 11c, FIGURA 11d, FIGURA 11e, FIGURA 12b, FIGURA 12c, FIGURA 12d, FIGURA 12e). A imunomarcação para VEGF estava presente, predominantemente, em fibroblastos (coloração marrom-escura confinada ao citoplasma) e, em menor intensidade, na matriz extracelular do tecido conjuntivo peri-implantar (FIGURA 13b, FIGURA 13c, FIGURA 13d, FIGURA 13e). No tecido ósseo peri-implantar, a imunomarcação para OCN estava presente, predominantemente, em osteoblastos (coloração marrom-escura confinada ao citoplasma) e, em menor intensidade, na matriz óssea (FIGURA 14b, FIGURA 14c, FIGURA 14d, FIGURA 14e). A imunomarcação para TRAP estava presente em osteoclastos (coloração marrom-escura confinada ao citoplasma) (FIGURA 15b, FIGURA 15c, FIGURA 15d, FIGURA 15e). Embora algumas células mononucleadas tenham sido imunomarcadas, foram consideradas na presente análise apenas as células multinucleadas TRAP-positivas, devido à maior efetividade reabsortiva destas últimas.

4.6 TNF α , IL-1 β , VEGF E OCN NOS TECIDOS PERI-IMPLANTARES

Os grupos ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM apresentaram maior densidade de imunomarcação para TNF α e IL-1 β em relação ao grupo C. Os grupos ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM apresentaram maior densidade de imunomarcação para TNF α e IL-1 β em relação ao grupo ZOL. O grupo ZOL-PiE-DM apresentou menor densidade de imunomarcação para TNF α e IL-1 β em relação ao grupo ZOL-PiE (FIGURA 11a, FIGURA 12a).

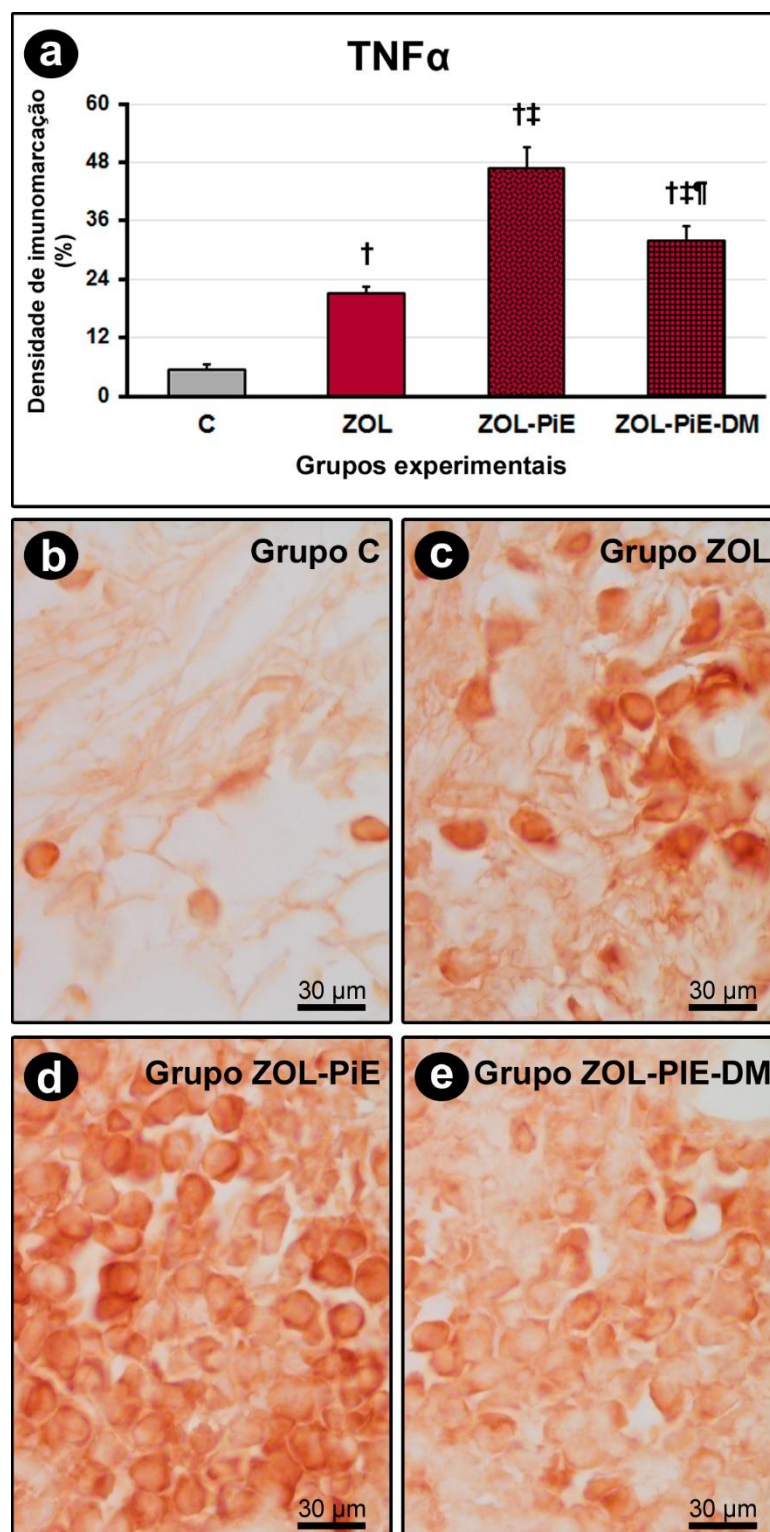
Os grupos ZOL e ZOL-PiE-DM apresentaram menor densidade de imunomarcação para VEGF em relação ao grupo C. O grupo ZOL-PiE apresentou maior densidade de imunomarcação para VEGF em relação ao grupo ZOL (FIGURA 13a).

Os grupos ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM apresentaram menor densidade de imunomarcação para OCN em relação ao grupo C. O grupo ZOL-PiE-DM apresentou menor densidade de imunomarcação para OCN em relação ao grupo ZOL (FIGURA 14a).

4.7 TRAP NO TECIDO ÓSSEO PERI-IMPLANTAR

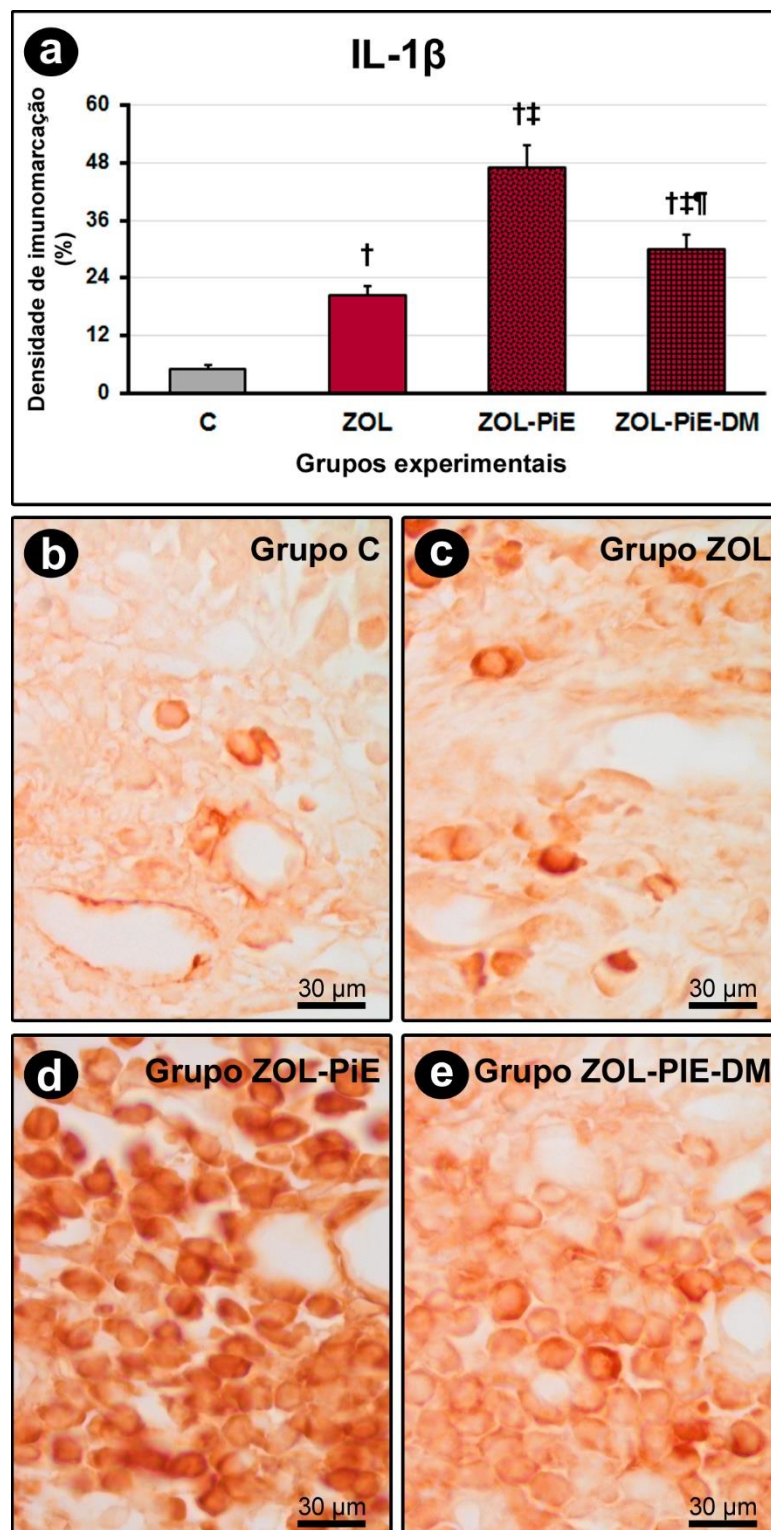
Os grupos ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM apresentaram menor quantidade de células TRAP-positivas em relação ao grupo C (FIGURA 15a).

FIGURA 11 - Imunomarcção para $TNF\alpha$ no tecido conjuntivo peri-implantar dos diferentes grupos experimentais.



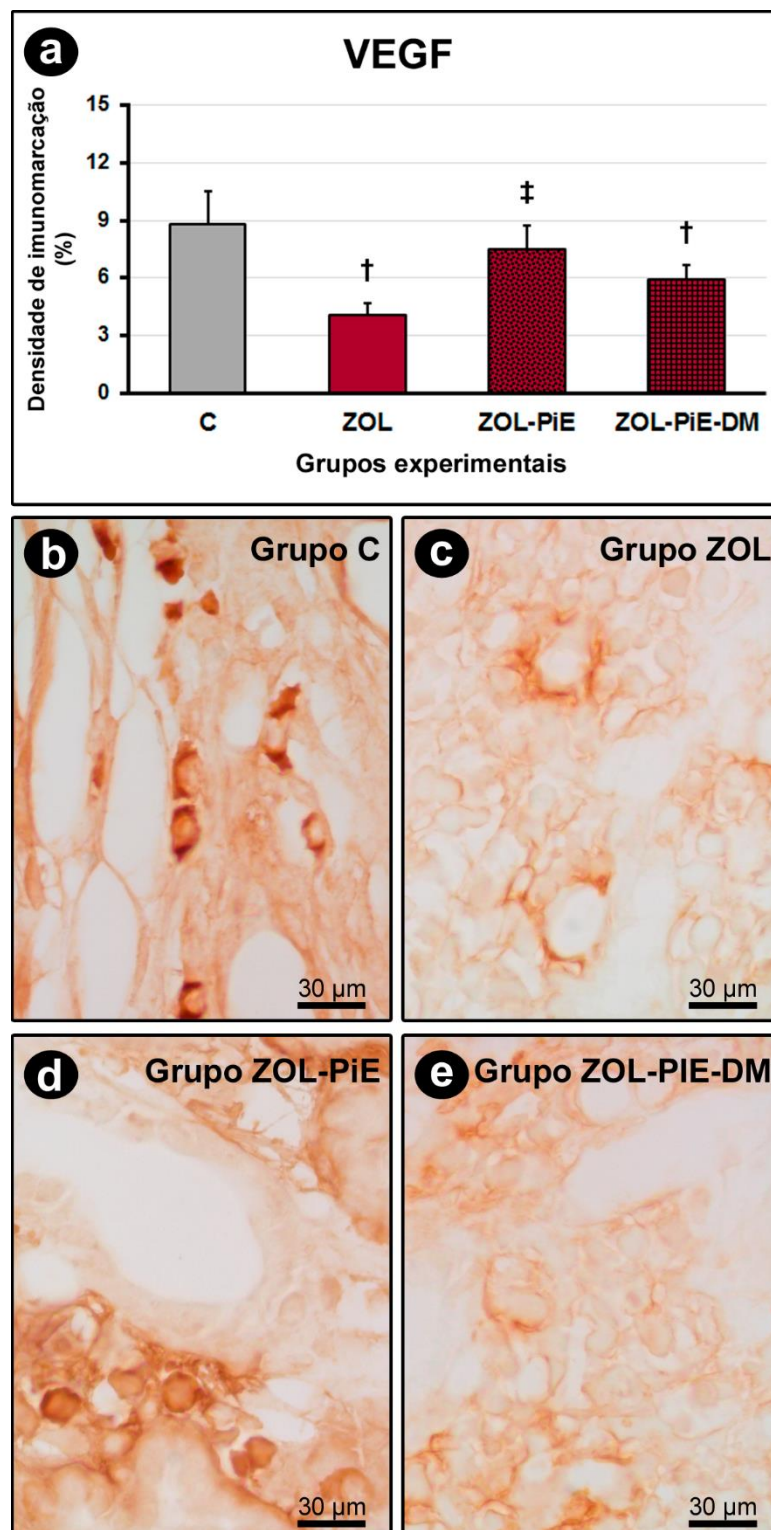
(a) Gráfico apresentando a densidade de imunomarcção para $TNF\alpha$ no tecido conjuntivo peri-implantar dos grupos C, ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM. (b-e) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para $TNF\alpha$ no tecido conjuntivo peri-implantar dos grupos C (b), ZOL (c), ZOL-PiE (d) e ZOL-PiE-DM (e). Abreviações e símbolos: %, porcentagem; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-PiE; $TNF\alpha$, fator de necrose tumoral alfa. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 30 μm . FONTE: O Autor (2023).

FIGURA 12 - Imunomarcção para IL-1 β no tecido conjuntivo peri-implantar dos diferentes grupos experimentais.

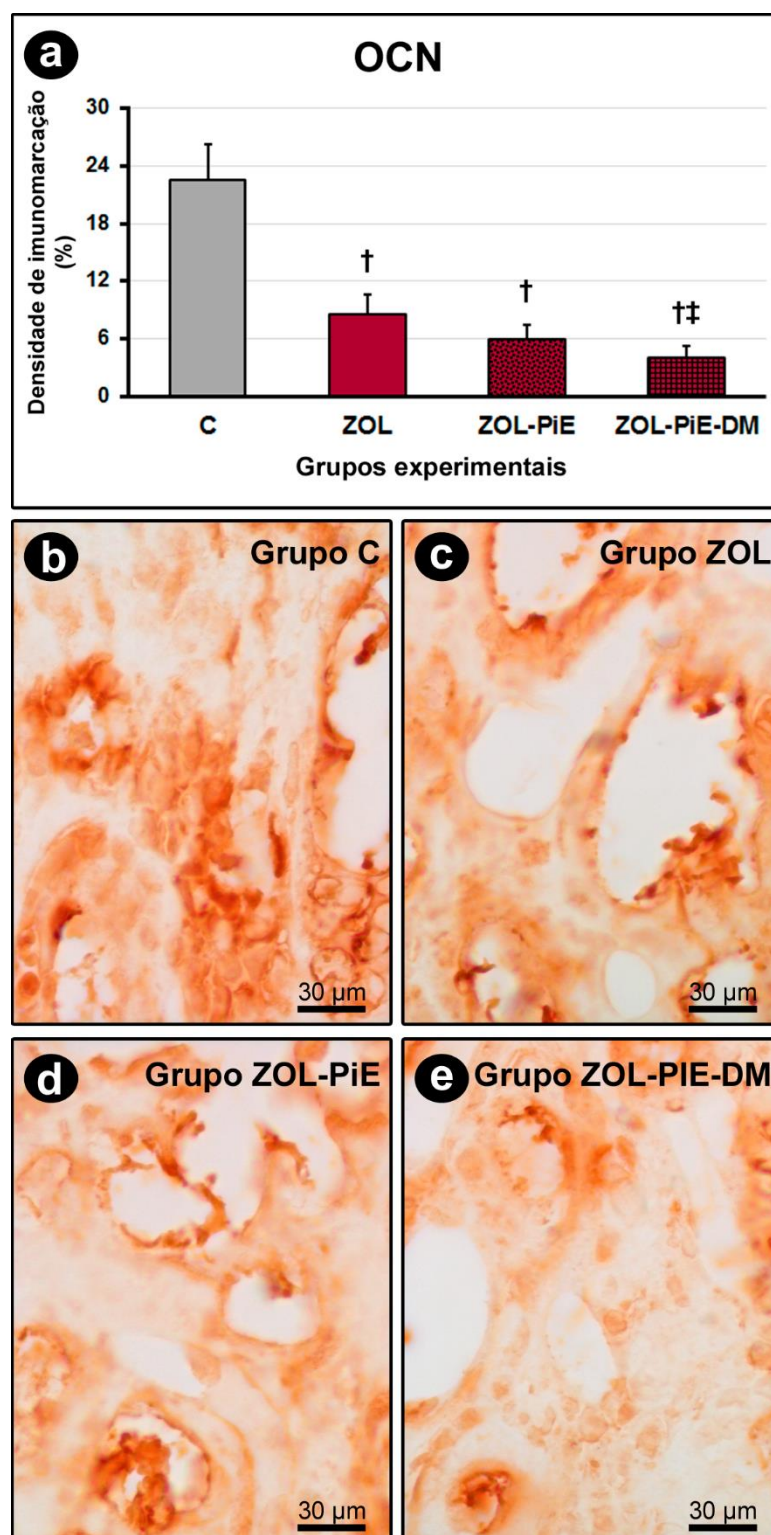


(a) Gráfico apresentando a densidade de imunomarcção para IL-1 β no tecido conjuntivo peri-implantar dos grupos C, ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM. **(b-e)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para IL-1 β no tecido conjuntivo peri-implantar dos grupos C **(b)**, ZOL **(c)**, ZOL-PiE **(d)** e ZOL-PiE-DM **(e)**. Abreviações e símbolos: %, porcentagem; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C; ††, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL-PiE; IL-1 β , interleucina 1 beta. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 30 μ m. FONTE: O Autor (2023).

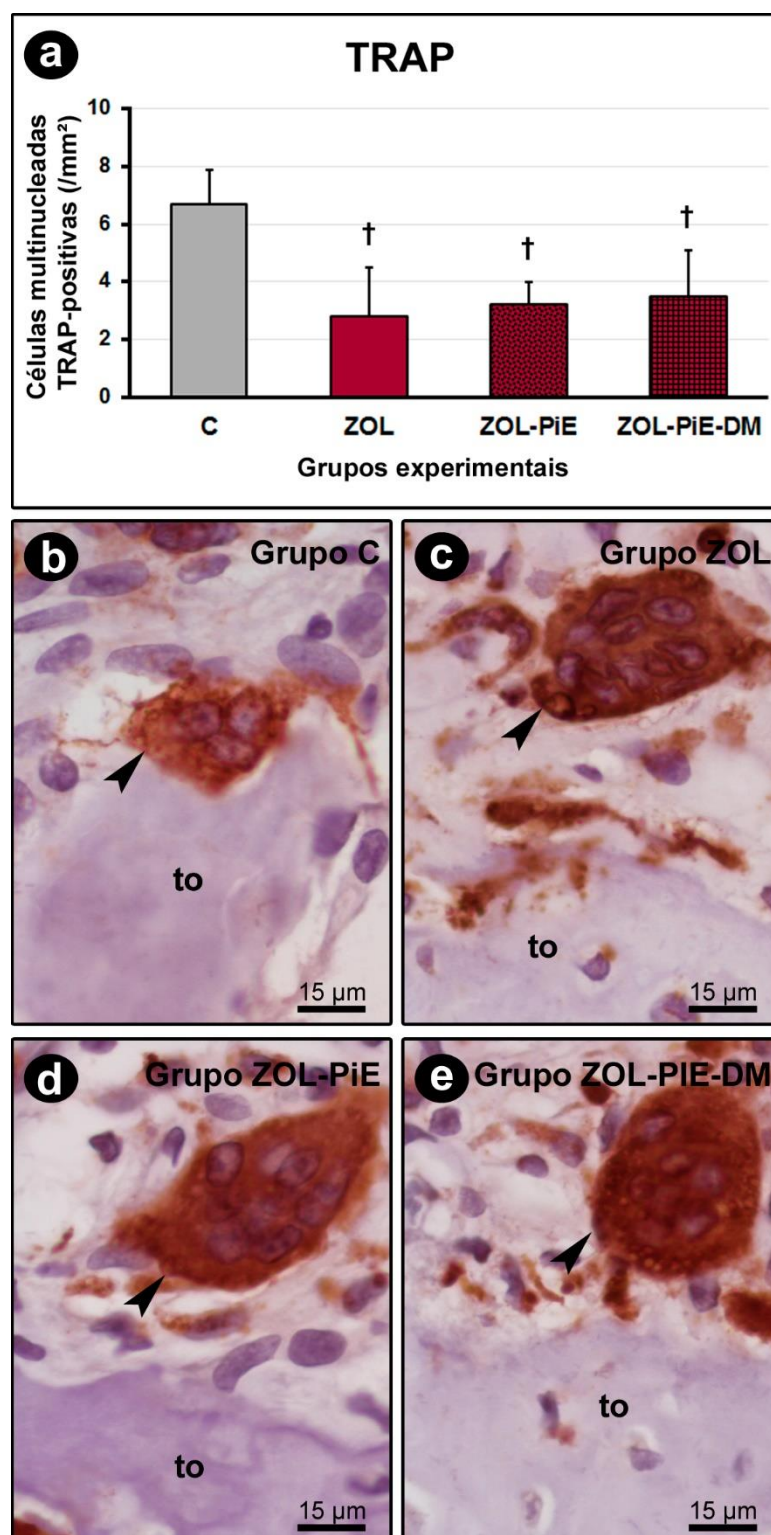
FIGURA 13 - Imunomarcção para VEGF no tecido conjuntivo peri-implantar dos diferentes grupos experimentais.



(a) Gráfico apresentando a densidade de imunomarcção para VEGF no tecido conjuntivo peri-implantar dos grupos C, ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM. (b-e) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para VEGF no tecido conjuntivo peri-implantar dos grupos C (b), ZOL (c), ZOL-PiE (d) e ZOL-PiE-DM (e). Abreviações e símbolos: %, porcentagem; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 30μm. FONTE: O Autor (2023).

FIGURA 14 - Imunomarcção para OCN no tecido ósseo peri-implantar dos diferentes grupos experimentais.

(a) Gráfico apresentando a densidade de imunomarcção para OCN no tecido ósseo peri-implantar dos grupos C, ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM. (b-e) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OCN no tecido ósseo peri-implantar dos grupos C (b), ZOL (c), ZOL-PiE (d) e ZOL-PiE-DM (e). Abreviações e símbolos: %, porcentagem; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; OCN, osteocalcina. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 30µm. FONTE: O Autor (2023).

FIGURA 15 - Imunomarcção para TRAP no tecido ósseo peri-implantar dos diferentes grupos experimentais.

(a) Gráfico apresentando a quantidade de células multinucleadas TRAP-positivas por mm² no tecido ósseo peri-implantar dos grupos C, ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM. (b-e) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP no tecido ósseo peri-implantar dos grupos C (b), ZOL (c), ZOL-PiE (d) e ZOL-PiE-DM (e). Abreviações e símbolos: /mm², por milímetro quadrado; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C; setas pretas, células multinucleadas TRAP-positivas imunomarcadas; to, tecido ósseo; TRAP, fosfatase ácida resistente ao tartarato. Contra-coloração: hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 15µm. FONTE: O Autor (2023).

iscussão

5 DISCUSSÃO

5.1 PROBLEMATIZAÇÃO E CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os excelentes resultados estéticos e funcionais alcançados nas últimas décadas fizeram dos IO e das próteses implanto-suportadas uma das melhores estratégias para a reabilitação oral, seja para a reposição unitária ou para a substituição de múltiplos dentes perdidos (BLOCK, 2018). Ao passo em que as técnicas operatórias e os biomateriais utilizados na odontologia têm constantemente evoluído para atender as mais diferentes necessidades dos pacientes, a ampla divulgação das vantagens e a popularização dos tratamentos reabilitadores têm tornado o emprego dos IO e das próteses por eles suportadas cada vez mais acessível. Sendo assim, inúmeros pacientes portadores de IO osseointegrados na cavidade bucal envelheceram ou envelhecerão ao longo dos próximos anos e, muitos destes, em função do aumento substancial na expectativa de vida, serão acometidos por doenças comuns da senescência, dentre as quais destacam-se as osteopatias que desencadeiam osteopenia, osteoporose ou lesões ósseas líticas (SCHIMEL *et al.*, 2018).

Tais doenças são tratadas, predominantemente, com drogas antirreabsortivas, como por exemplo os BFs, os quais se mostram extremamente efetivos para estas finalidades, no entanto, estes referidos fármacos exercem ações ainda pouco conhecidas sobre os tecidos peri-implantares. Nos últimos anos, supostamente pelo exposto anteriormente, têm sido continuamente reportados casos de ONMM-IO, porém, poucos são os estudos que exploram a fisiopatologia desta condição. Estudos clínicos recentes evidenciaram uma forte correlação entre as drogas antirreabsortivas, a PI e a ONMM-IO (KWON *et al.*, 2014; PICHARDO *et al.*, 2020; SEKI *et al.*, 2021; TEMPESTA *et al.*, 2022; TROELTZSCH *et al.*, 2016). Todavia, o efeito predisponente que a PI exerce sobre os ossos da região maxilo-mandibular a ponto de desencadear a ONMM-IO ao longo de um tratamento com estas drogas ainda não foi investigado. O tratamento da PI constitui-se em um desafio para a odontologia mesmo em condições de normalidade sistêmica e, deste modo, em uma situação na qual o paciente está sob terapia com drogas antirreabsortivas, o desafio se torna ainda maior.

O DM é o tratamento padrão e a primeira opção de escolha para a maioria dos casos de PI, pois visa eliminar os seus principais agentes etiológicos, por meio da remoção dos depósitos bacterianos e dos fatores retentivos de placa na região peri-implantar (FIGUERO *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2014). Contudo, apesar de suas vantagens e eficácia já atestadas (RENVERT; POLYZOIS, 2018; WAGNER *et al.*, 2021), tal manobra terapêutica parece não

responder adequadamente em pacientes tratados com drogas antirreabsortivas, segundo relatos clínicos (SEKI *et al.*, 2021; TEMPESTA *et al.*, 2022; YUAN *et al.*, 2012). Além disso, o DM pode acarretar certo trauma mecânico aos tecidos peri-implantares, agravando o quadro inflamatório em um primeiro momento, o que pode torná-lo um fator de risco adicional e ponto de gatilho para o desencadeamento da ONMM-IO, à semelhança do que ocorre com a RAR durante o tratamento da periodontite (ARAÚJO, 2017; BRAUN; IACONO, 2006; DINIZ-FREITAS *et al.*, 2018). A escassez de estudos clínicos e experimentais adequados também é um fator que limita o estabelecimento da segurança e da eficácia de tal proposta terapêutica nestas condições em especial. Diante disso, o presente estudo propôs avaliar a efetividade e a segurança do emprego do DM no tratamento da PiE em implantes já osseointegrados na maxila de ratas posteriormente submetidas à terapia com dosagem oncológica de zoledronato, principalmente no que diz respeito à sua capacidade de evitar ou desencadear a ONMM-IO, quando comparado à progressão da PiE na ausência de qualquer tratamento local. Ademais, buscou-se verificar os efeitos desta terapia medicamentosa sobre os tecidos situados ao redor dos implantes na presença e na ausência da PiE, com o intuito de caracterizar o potencial risco da presença do implante e/ou da peri-implantite no desencadeamento da ONMM.

Em síntese, foi possível observar que o tratamento medicamentoso com dosagem oncológica de zoledronato na presença do implante osseointegrado já se mostrou capaz de provocar uma resposta inflamatória leve nos tecidos moles peri-implantares e levou à ocorrência de uma quantidade considerável de tecido ósseo não vital e de alterações ao nível celular na região de interesse. Tais características mostraram-se ainda mais exacerbadas durante o tratamento medicamentoso com zoledronato na presença da PiE, o que permite categorizar ambas as situações como potenciais fatores de risco locais para o desencadeamento da ONMM. O tratamento da PiE por meio do DM, apesar de ter sido capaz de reduzir o processo inflamatório nos tecidos moles peri-implantares para um grau moderado, aumentou significativamente a quantidade de tecido ósseo não vital nesta área, ampliando ainda mais a região condizente com o estágio 0 da ONMM, segundo o estadiamento proposto por Ruggiero *et al.* (2022). Sendo assim, nossos achados sugerem que o DM não se mostrou efetivo e, tampouco, seguro no tratamento da PiE em ratas submetidas à terapia com dosagem oncológica de BFs, podendo se constituir em um importante fator de risco agravante e/ou desencadeador da ONMM-IO.

5.2 PROPOSIÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

Os estudos sobre a ONMM em humanos apresentam certa limitação quando o objetivo é investigar os fatores etiológicos e a sua patogenia, os efeitos das drogas antirreabsortivas sobre determinados tecidos e até mesmo a ação de novas propostas terapêuticas, sejam elas de natureza curativa ou preventiva. Neste contexto, estudos experimentais em modelos animais têm sido de grande importância, pois auxiliam sobremaneira na elucidação destas pertinentes questões e, com isso, direcionam os estudos clínicos, ganhando o cunho de pesquisa translacional (AGUIRRE; CASTILLO; KIMMEL, 2021b; BARBA-RECREO *et al.*, 2014; ERVOLINO *et al.*, 2019; JANG; KIM; CHA, 2015; KIM *et al.*, 2016; KOLPAKOVA *et al.*, 2017; MERGONI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2015; STATKIEVICZ *et al.*, 2018; TORO *et al.*, 2019).

Ao longo dos anos, as pesquisas epidemiológicas relacionadas com a ONMM ganharam consistência e, assim, os fatores de risco foram se tornando evidentes (KHAN *et al.*, 2017; KUROSHIMA; SASAKI; SAWASE, 2019; MCGOWAN; MCGOWAN; IVANOVSKI, 2018). Contudo, ainda são raros os estudos que buscam realmente incorporar tais fatores durante o delineamento de seus modelos experimentais. Em contrapartida, esta tem sido uma constante proposta idealizada por nosso grupo de pesquisas, objetivando sempre aproximar ainda mais os modelos em animais das reais condições e/ou situações clínicas observadas na população. Sabe-se que dentre os fatores de risco relacionados ao paciente estão o sexo feminino, a idade avançada e a utilização de potentes drogas com atividade antirreabsortiva, administradas de forma parenteral, pela via IV (KHAN *et al.*, 2017; MCGOWAN; MCGOWAN; IVANOVSKI, 2018; OTTO *et al.*, 2011; RUGGIERO *et al.*, 2022). Buscando analogia com tais características, o modelo experimental proposto e empregado no presente estudo utilizou fêmeas senescentes com, aproximadamente, 20 meses de idade ao término do experimento, e que foram submetidas ao tratamento com zoledronato, o mais potente dos BFs, administrado pela via IP. A dose de zoledronato e o plano de tratamento utilizados consistiram em uma adaptação para o rato do atual protocolo preconizado para a complementação da terapia oncológica em humanos, segundo estudos experimentais prévios (ERVOLINO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2015; STATKIEVICZ *et al.*, 2018; TORO *et al.*, 2019), e tendo-se em vista que tal dosagem é a mais frequentemente associada com a ocorrência da ONMM (RUGGIERO *et al.*, 2022).

No que diz respeito às pesquisas experimentais em animais envolvendo os IO, a instalação de implantes de titânio em tíbias tem sido o modelo clássico e o mais utilizado para

a avaliação do processo de reparo peri-implantar, especificamente da osseointegração (CLOKIE; WARSHAWSKY, 1995; MARTINS *et al.*, 2018; MATHEUS *et al.*, 2018; TALEBIAN *et al.*, 2021; YAGIHARA *et al.*, 2016), em virtude das facilidades operatórias, da previsibilidade do curso de reparação tecidual e da similaridade estrutural que o tecido ósseo desta região apresenta com o tecido ósseo alveolar (GLOSSEL *et al.*, 2010). Contudo, neste modelo experimental, alguns fatores inerentes à cavidade bucal e que podem estar diretamente relacionados com as taxas de sucesso e sobrevida dos IO e, principalmente, com o desenvolvimento da ONMM-IO, não são levados em consideração, tais como a presença da microbiota local, a oclusão dentária e carga funcional da mastigação à qual os IO estão constantemente submetidos, além da própria diferença na origem embrionária do tecido ósseo da região bucomaxilofacial e do esqueleto apendicular (GLOSSEL *et al.*, 2010). Diante disso, na tentativa de contornar os vieses supracitados e, ao mesmo tempo, mimetizar de forma mais fidedigna as condições de desenvolvimento da ONMM-IO, neste estudo foi proposta a instalação do implante de titânio na cavidade bucal dos animais, o que representou um grande desafio metodológico a ser superado.

Poucos são os modelos experimentais, principalmente em ratos, que instalam IO na cavidade bucal de tais animais. Ademais, quando existentes, ocorrem predominantemente na maxila e, na maioria das vezes, no sítio de extração do primeiro molar superior (HE *et al.*, 2022; KOUTOUZIS *et al.*, 2017; TAKAMORI *et al.*, 2017) ou na região do diastema natural situado anteriormente aos molares superiores destes roedores (SUN *et al.*, 2020; YUE *et al.*, 2020), o que implica na utilização de implantes mais curtos, para que não haja envolvimento do seio maxilar. A utilização dos implantes de comprimento reduzido, como o empregado na maioria dos casos, dificultaria a colocação de uma ligadura de algodão para indução da PiE e, além disso, esta condição patológica instalada poderia acarretar um nível de perda óssea capaz de provocar a explantação da estrutura em um curto espaço de tempo. A redução no período de progressão da PiE visando a manutenção da sobrevida do implante na cavidade bucal, por sua vez, poderia ainda dificultar as análises e a compreensão das respostas adaptativas dos tecidos peri-implantares aos níveis celular e tecidual. Com base nestas considerações, foi utilizado um implante de titânio especialmente projetado para esta finalidade, apresentando 2,5mm de diâmetro por 5,7mm de comprimento, ou seja, um implante relativamente longo quando comparado aos empregados em outros estudos, alguns destes com implantes de até 2,0mm de comprimento (HE *et al.*, 2022; KOUTOUZIS *et al.*, 2017). A instalação foi realizada de forma imediata e subsequente à exodontia do incisivo superior, com referência à técnica de instalação de IO imediatos, a qual vem sendo utilizada com alto índice de sucesso

pelos clínicos na atualidade, e evitando, assim, a necessidade de um tempo cirúrgico adicional (AMID; KADKHODAZADEH; MOSCOWCHI, 2021).

Como uma gama de estudos clínicos tem apontado a forte correlação entre a ocorrência da ONMM-IO e a presença da PI em pacientes que fizeram ou faziam uso de drogas antirreabsortivas (KWON *et al.*, 2014; PICHARDO *et al.*, 2020; SEKI *et al.*, 2021; TEMPESTA *et al.*, 2022; TROELTZSCH *et al.*, 2016), a indução da PiE no modelo experimental proposto, especialmente após a conclusão do processo de osseointegração e durante o protocolo medicamento com zoledronato, objetivou elucidar se a presença desta condição poderia se constituir em um fator de risco precipitante para a ocorrência ONMM-IO, além de possibilitar a avaliação do seu tratamento por meio do DM. Vários modelos experimentais destinados ao estudo da patogênese da PI foram publicados ao longo dos últimos anos, e os mais diferentes métodos de indução da PiE foram sugeridos com base nos seus fatores etiológicos já conhecidos e nas vantagens e desvantagens pertinentes à cada uma das técnicas propostas.

Alguns autores têm sugerido a aplicação de lipopolissacarídeos (LPS), um dos principais componentes celulares das bactérias gram-negativas, na região da mucosa ou do sulco peri-implantar, com o intuito de estimular a resposta imunológica do hospedeiro, desencadeando uma potente resposta inflamatória, à semelhança do que ocorre na PI (HE *et al.*, 2022; TAKAMORI *et al.*, 2017). Contudo, apesar da sensibilidade e precisão na indução desta resposta, tal modelo não se assemelha à PI humana devido à ausência da colonização bacteriana (SUN *et al.*, 2020). Outro modelo sugerido utilizou implantes com a superfície colonizada por bactérias patogênicas previamente à sua instalação e osseointegração (FREIRE *et al.*, 2011). Porém, esta simulação mostra-se ainda mais distante da realidade clínica. Alguns estudos recentes têm utilizado a inoculação de bactérias relacionadas à patogênese da doença periodontal e da PI na região peri-implantar, principalmente *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* e *S. oralis*, individualmente ou conjugadas (KOUTOUZIS *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2020). Entretanto, apesar dos resultados favoráveis à sua validação, este modelo exige grandes cuidados técnicos prévios e durante sua execução, os quais variam desde o isolamento, cultura em anaerobiose e quantificação bacteriológica, até a preparação das soluções e suas efetivas aplicações locais (KOUTOUZIS *et al.*, 2017).

No presente estudo, a PiE foi induzida por meio da instalação de uma ligadura de algodão ao redor da porção cervical do cicatrizador acoplado ao implante de titânio, especificamente, na região do sulco peri-implantar. O principal propósito desta técnica é possibilitar que o fio alocado na região atue como um fator retentivo de placa, levando ao

acúmulo de biofilme bacteriano e, conseqüentemente, ao desencadeamento da PiE (REINEDAHL *et al.*, 2018; VO *et al.*, 2017). Estudos têm sugerido que a presença da ligadura pode também ser capaz de induzir, por si só, uma resposta imunológica do tipo corpo estranho no hospedeiro, exacerbando o quadro inflamatório (REINEDAHL *et al.*, 2018). As ligaduras foram inicialmente utilizadas e ainda perfazem um modelo bastante difundido para a indução da periodontite experimental em animais (ARAÚJO, 2017; ERVOLINO *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2021; SEGUNDO *et al.*, 2010; STATKIEVICZ *et al.*, 2018; TORO *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2018), porém, com o advento dos IO e os crescentes relatos de PI, a analogia entre estas duas condições patológicas fez com que a instalação de ligaduras fosse adaptada e adotada também para a indução da PiE (HORI *et al.*, 2021; PIRIH *et al.*, 2015; WONG *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2018; YUE *et al.*, 2020). Esta é a técnica mais utilizada na atualidade e, além de se mostrar eficiente e plenamente aceitável como modelo experimental (DE MOLON *et al.*, 2018), ainda conta com um baixo custo e relativa facilidade de execução quando comparada às demais. No entanto, assim como as outras, a proposta apresenta certas limitações. Segundo Sun *et al.* (2020), a lesão traumática provocada pela ligadura está estritamente qualificada ao estudo dos mecanismos patológicos da PI humana.

No presente estudo, o acúmulo de biofilme bacteriano associado à ligadura de algodão, a notável presença de eritema e edema peri-implantares ao exame clínico e a significativa exacerbação do processo inflamatório nos animais do grupo ZOL-PiE revelaram a eficácia da técnica para o objetivo proposto. A perda óssea, parâmetro clássico para a caracterização da PI e da PiE em modelos animais, no entanto, dificilmente pode ser levada em consideração quando se faz presente o tratamento sistêmico com BFs, justamente por tais fármacos impedirem a reabsorção óssea. Contudo, outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisas, utilizando um modelo experimental muito próximo do empregado no presente trabalho (SOUZA, 2022), evidenciou considerável perda óssea e a presença de inúmeros osteoclastos ativos durante a evolução da PiE na ausência do tratamento com zoledronato, o que assegura a efetividade da doença induzida.

Outro fator que merece destaque é o momento em que o protocolo medicamentoso foi instituído, bem como o período em que a PiE foi induzida e tratada. Aproximadamente 35% dos casos relatados de ONMM-IO ocorreram durante o período de reparação peri-implantar, em pacientes que haviam sido tratados com drogas antirreabsortivas e que, após certo tempo, foram submetidos ao procedimento cirúrgico para instalação de IO. Contudo, cerca de 65% dos casos se manifestaram em situação inversa, ou seja, em pacientes que já apresentavam os IO osseointegrados na cavidade bucal e que posteriormente iniciaram o tratamento

medicamentoso antirreabsortivo (BENNARDO *et al.*, 2020; ESCOBEDO *et al.*, 2020; GIOVANNACCI *et al.*, 2016; GOSS *et al.*, 2010; JACOBSEN *et al.*, 2013; KWON *et al.*, 2014; LAZAROVICI *et al.*, 2010; LÓPEZ-CEDRÚN *et al.*, 2013; POGREL; RUGGIERO, 2018). Neste trabalho, o delineamento experimental proposto buscou mimetizar exatamente esta segunda situação descrita, a qual acomete a maioria absoluta dos pacientes. Assim, após a devida instalação dos implantes de titânio, aguardou-se o período de oito semanas, necessário à reparação peri-implantar e osseointegração e, somente depois deste tempo, foi instaurado o protocolo medicamentoso com zoledronato. Como a presença da PI em pacientes sob tratamento com BFs tem sido considerada um fator de risco local para o desencadeamento da ONMM-IO, tal condição foi induzida ao longo do protocolo medicamentoso, o que possibilitou também a avaliação do seu tratamento por meio do DM durante este crítico período. Além disso, o tempo em que tal ligadura permaneceu em posição para a análise da progressão da PiE nos animais do grupo ZOL-PiE foi relativamente longo, bem como os períodos prévio e posterior ao seu tratamento mecânico no grupo ZOL-PiE-DM, os quais permitiram evidenciar e interpretar com clareza as manifestações celulares e teciduais que ali ocorreram.

Diante do exposto, consideramos ter desenvolvido um bom e consistente modelo experimental, totalmente inédito e diferente dos demais modelos em animais até então empregados, porém, metodologicamente delineado com intervenções e procedimentos cientificamente aceitos e/ou embasados nos mais recentes dados epidemiológicos e protocolos clínicos disponíveis. Buscamos mimetizar e reunir em um único modelo experimental as principais situações clínicas nas quais a ONMM-IO se desenvolve, associando os seus maiores fatores de risco em detrimento da facilidade técnica de operacionalização do experimento. O longo período experimental, com duração de 19 semanas, a individualidade anatômica e fisiológica de cada animal e a sempre incessante busca pelo uso racional dos espécimes constituíram-se em fatores desafiadores e complicadores durante o desenvolvimento deste estudo e, por isso, talvez pequenas adaptações e até mesmo melhorias possam ser realizadas durante as futuras utilizações deste modelo ora proposto. Contudo, pelos resultados já obtidos, pretendemos impulsionar novos e inovadores estudos experimentais, em modelos cada vez mais fidedignos, e que possam direcionar com maior segurança os vindouros estudos clínicos.

5.3 ASPECTOS CELULARES E TECIDUAIS DA REGIÃO PERI-IMPLANTAR

Com o crescente e considerável avanço nas pesquisas acerca dos mecanismos de ação das drogas com atividade antirreabsortiva e dos efeitos adversos decorrentes de sua utilização, torna-se inquestionável o fato de que tais medicamentos acarretam importantes alterações na histofisiologia dos mais diversos tecidos biológicos, principalmente quando fatores sistêmicos e/ou locais tornam-se possíveis agravantes para estas manifestações, como é o caso de certos distúrbios metabólicos, da presença de IO osseointegrados, da PI e até mesmo de sua própria abordagem terapêutica por meio do DM. Entretanto, com a iminente progressão das alterações celulares e teciduais, inicialmente observadas apenas ao nível microscópico, as características macroscópicas e clínicas tornam-se então evidentes. No presente estudo, durante todo o período experimental, as condições gerais de saúde dos animais se mantiveram estáveis e, ao final, não houve diferença no peso corporal médio das ratas pertencentes a um mesmo ou a diferentes grupos experimentais, semelhante aos resultados observados por Souza (2022) e por Statkiewicz *et al.* (2018), os quais também avaliaram os referidos parâmetros em animais submetidos à terapia com dosagem oncológica de BFs.

A análise clínica intraoral, por meio da inspeção visual da região peri-implantar nos animais dos grupos tratados com zoledronato, entretanto, já indicava a presença de processo inflamatório local, possivelmente correlacionado ao próprio protocolo medicamentoso administrado nos animais pertencentes a estes grupos, e condicionado à existência dos fatores de risco locais, como a PiE e o DM. Tais características clínicas foram confirmadas posteriormente por meio das análises histopatológica e imunoistoquímica dos espécimes, conforme descrito.

A presença de inflamação, principalmente quando exacerbada e/ou prolongada, tem sido uma característica frequentemente relacionada à ocorrência da ONMM (CHANG; HAKAM; MCCAULEY, 2018; LESCLIOUS *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2021). Atualmente, os achados relativos à patogênese da ONMM são ainda categorizados sob diferentes hipóteses, dentre elas: I) a potente desregulação no processo de remodelação óssea, causada pela supressão da atividade osteoclástica; II) a presença de infecções associadas e oportunistas; III) o efeito citotóxico e a inibição da angiogênese tecidual, provocados pelas drogas antirreabsortivas e; IV) a presença de inflamação e disfunções imunológicas (CHANG; HAKAM; MCCAULEY, 2018; KUROSHIMA; SASAKI; SAWASE, 2019; RUGGIERO *et al.*, 2022), sendo que esta última vem ganhando notoriedade e cada vez mais comprovações de participação direta no desenvolvimento das lesões osteonecróticas (ZHANG *et al.*, 2021).

Corroborando tais achados, a análise histopatológica deste estudo evidenciou a presença de importante infiltrado inflamatório nos tecidos situados ao redor dos implantes de titânio em todos os animais pertencentes aos grupos tratados com zoledronato, ou seja, em ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM, o que não ocorreu nos animais do grupo C, os quais também apresentavam implantes osseointegrados, porém, que não foram submetidos ao tratamento sistêmico com zoledronato. De modo semelhante, verificou-se também uma maior densidade de imunomarcação para $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, duas importantes citocinas com atividade pró-inflamatória, nos grupos tratados com zoledronato em comparação ao grupo C. Estes resultados reforçam as evidências de que a terapia medicamentosa com BFs, na presença de IO osseointegrados, torna tais implantes como potenciais fatores predisponentes para a ocorrência de uma forma específica de osteonecrose medicamentosa, atualmente denominada de ONMM-IO (LAZAROVICI *et al.*, 2010; MASSAAD; MAGREMANNE, 2022; PICHARDO *et al.*, 2020).

Sabe-se que os BFs não atuam de forma exclusiva em osteoclastos, apesar destas células serem consideradas o seu principal alvo de ação (CREMERS *et al.*, 2019), mas que também apresentam efeitos secundários e residuais sobre várias outras linhagens celulares, incluindo as células do sistema imunológico, causando disfunções nas respostas imunológicas inata e adquirida e, conseqüentemente, acarretando desequilíbrios na expressão de citocinas com atividades pró e anti-inflamatórias. Neste contexto, os BFs parecem interferir diretamente na polarização e na ativação dos macrófagos teciduais relacionados à inflamação, modificando drasticamente a razão entre macrófagos dos tipos M1 e M2 ativados (WEHRHAN *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2021). Os macrófagos do tipo M1 apresentam atividade pró-inflamatória, predominantemente, sendo capazes de fagocitar e digerir diferentes patógenos, além de atuarem como células apresentadoras de antígenos (APCs, *Antigen Presenting Cells*). Estes fagócitos produzem diversas citocinas e mediadores pró-inflamatórios, tais como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12 , óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (VIOLA *et al.*, 2019). Em contrapartida, os macrófagos do tipo M2 são considerados anti-inflamatórios e resolutivos, estando relacionados com os eventos de controle da inflamação, remoção de corpos apoptóticos, condução do reparo e da remodelação tecidual, por meio da secreção de $\text{TNF}\beta$, IL-10 e de fatores de crescimento (VIOLA *et al.*, 2019).

Assim, o equilíbrio nas taxas de ativação entre macrófagos M1 e M2, em condições de normalidade sistêmica, mantém a homeostase imunológica orgânica e direciona para a intensificação ou para a resolução do quadro inflamatório. Porém, estudos sugerem que os BFs podem interromper tal equilíbrio, sendo capazes de estimular sobremaneira a polarização

de macrófagos do tipo M1 e, em contrapartida, inibir a polarização do tipo M2, por meio de diferentes vias intracelulares, culminando com o exponencial aumento na quantidade de mediadores pró-inflamatórios, o que atrai e ativa ainda mais macrófagos M1 e outras células de defesa (WEHRHAN *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2019). Deste modo, o resultado da ação dos BFs sobre tais células fagocíticas é a exacerbação e o prolongamento do estado inflamatório, favorecendo a ocorrência de danos teciduais e impedindo a progressão para a fase resolutive subsequente.

Outras células do sistema imunológico também parecem ser diretamente afetadas por efeitos secundários decorrentes do uso de drogas antirreabsortivas. Clézardin e Massaia (2010) postularam que os BFs nitrogenados, como é o caso do zoledronato, são capazes de estimular a expansão clonal e a atividade citotóxica dos linfócitos T, podendo vir a desempenhar, inclusive, um importante papel na imunoterapia contra o câncer. Tem sido relatado também que os BFs exercem um importante papel pró-inflamatório por meio de sua atuação sobre os neutrófilos polimorfonucleares. Um estudo experimental em ratos evidenciou elevado aumento na quantidade de neutrófilos e de diversas citocinas pró-inflamatórias nos animais tratados com BFs, indicando que estas alterações neutrofílicas induzidas por tais drogas poderiam exacerbar a resposta inflamatória local (DE BARROS SILVA *et al.*, 2016). Por outro lado, experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* sugeriram que os BFs modularam negativamente a quimiotaxia e a atividade dos neutrófilos, suprimindo a resposta imunológica inata do hospedeiro (KUIPER *et al.*, 2012). A influência dos BFs sobre as demais células e mecanismos envolvidos com as respostas imunológicas tem sido cada vez melhor compreendida, porém, ainda há muito para ser explorado.

Ademais, no que diz respeito à inflamação, de modo geral, o aumento na intensidade e/ou na extensão do processo inflamatório, bem como a significativa exacerbação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, são parâmetros histopatológicos e moleculares que estão fortemente correlacionados à ocorrência de lesões semelhantes à ONMM em diferentes modelos experimentais atualmente propostos (ARAÚJO, 2017; FUNAYAMA *et al.*, 2019; MORITA *et al.*, 2017; SOMA *et al.*, 2021; STATKIEVICZ *et al.*, 2018). Baseados nesta premissa, Morita *et al.* (2017) demonstraram que camundongos nocaute para as citocinas TNF α , IL-1 α/β e IL-6 se tornaram resistentes ao desenvolvimento de lesões osteonecróticas, mesmo durante a administração de altas dosagens de BFs. Medicamentos como o Etanercepte, um agente inibidor de TNF α , assim como anticorpos neutralizantes para IL-6, têm sido sugeridos como fármacos potencialmente capazes de prevenir a ONMM em ratos tratados com zoledronato e submetidos à exodontia concomitante (SOMA *et al.*, 2021), evidenciando

ainda mais o importante papel da inflamação induzida pelos BFs durante a patogênese desta condição.

No presente estudo, conforme já mencionado, todos os grupos tratados com zoledronato apresentaram nítido infiltrado inflamatório e elevada quantidade de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos situados ao redor do implante, com especial destaque ao tecido conjuntivo pertencente à mucosa peri-implantar. Contudo, convém destacar que nos grupos ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM este quadro se mostrou ainda mais exacerbado, possivelmente devido aos potenciais fatores de risco locais adicionados ao modelo nestes animais. Além disso, dentre todos os grupos, ZOL-PiE foi o que apresentou a maior intensidade e extensão na resposta inflamatória local, com os mais elevados níveis de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, características típicas e condizentes com a evolução do quadro inflamatório-infeccioso induzido. Tais achados são coerentemente explicados com base nos danos de natureza mecânica e biológica provocados pela inserção e manutenção da ligadura na região do sulco peri-implantar. Inicialmente, a própria instalação de um fio de algodão ao redor do cicatrizador acoplado ao implante osseointegrado, em uma mucosa já sensibilizada pelos efeitos deletérios e inflamatórios desencadeados pelo tratamento medicamentoso com zoledronato em curso, seria capaz de provocar um trauma físico, de ordem mecânica, interrompendo a integridade da barreira epitelial e favorecendo, desta forma, a invasão e a colonização bacteriana no local (ZHANG *et al.*, 2021). O fio de algodão também parece atuar como corpo estranho em um primeiro momento, sendo capaz de induzir uma resposta imunológica no hospedeiro, exacerbando ainda mais o processo inflamatório (REINEDAHL *et al.*, 2018).

Soma-se a isso o fato de que, com o grande acúmulo de biofilme microbiano ao redor da ligadura de algodão durante a progressão da doença e a consequente disbiose na microbiota residente, microrganismos patogênicos rapidamente se proliferam e alcançam os tecidos mais profundamente situados (MONJE *et al.*, 2021). A presença de toxinas bacterianas e, principalmente, da endotoxina LPS, oriunda de bactérias gram-negativas, gera respostas auto-amplificadoras, pois é capaz de estimular a ativação de monócitos e macrófagos do tipo M1, induzindo a síntese de ainda mais mediadores químicos da inflamação (BORMANN *et al.*, 2010; CAVAILLON, 2018). Além disso, LPS e outras variadas exotoxinas formadoras de poros também são capazes de ativar inflamassomas, complexos multiproteicos citosólicos expressos em células da linhagem granulocítica, resultando na liberação de $\text{IL-1}\beta$ e IL-18 . Outras exotoxinas ainda se comportam como superantígenos e acarretam a liberação de citocinas pelos linfócitos T (CAVAILLON, 2018).

Embora ainda não se tenha chegado a um consenso definitivo sobre a ONMM ser um evento desencadeado ou sustentado pelo processo infeccioso, sabe-se que a infecção de áreas necróticas invariavelmente ocorre, visto que bactérias em amostras de ONMM são achados bastante frequentes em biópsias (MARX *et al.*, 2005). A presença de infecção estimula a persistência do quadro inflamatório e atrasa sobremaneira o processo de reparo, reiniciando e sustentando o ciclo. Assim, a associação entre a inflamação exacerbada e persistente, o reparo prejudicado e a susceptibilidade à infecção em tecidos previamente debilitados pelos efeitos inerentes aos BFs e submetidos à carga funcional da mastigação pode culminar em desfechos trágicos, o que caracteriza a PiE, e por correlação a PI, como um fator de risco local precipitante para a ocorrência da ONMM-IO.

Com a realização do DM e a consequente remoção dos depósitos bacterianos e do principal fator retentivo de placa, ou seja, a ligadura de algodão, o grupo ZOL-PiE-DM apresentou relativa redução na intensidade do infiltrado inflamatório observado no tecido conjuntivo peri-implantar aos 21 dias pós tratamento e em seus níveis de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, quando comparado ao grupo que não recebeu a mesma terapia mecânica local. Entretanto, as características da inflamação tecidual ainda se mostravam exacerbadas em relação ao grupo ZOL e, principalmente, em relação ao grupo C. Ainda que o DM seja executado de forma manual, por meio de curetas e instrumentais que possam traumatizar os tecidos marginais ao implante, exacerbando a resposta inflamatória em um primeiro momento e, assim, levando à ocorrência de potenciais consequências danosas no que diz respeito ao desencadeamento da ONMM, torna-se coerente pressupor que após o adequado debridamento da região peri-implantar, com a eliminação de grande parte da contaminação bacteriana, bem como de suas toxinas, remanescentes teciduais e células do sistema imunológico, ocorreria uma considerável redução na intensidade e na extensão do processo inflamatório, conforme fora confirmado.

Diante desta premissa, a capacidade do debridamento não cirúrgico em reduzir os sinais clínicos da inflamação relacionados à evolução da PI foi demonstrado em uma série de relatos de casos (DIACHKOVA *et al.*, 2020), assim como o potencial desta técnica em reduzir as características histopatológicas da inflamação local associada à periodontite experimental foi devidamente comprovada *in vivo* (GARCIA *et al.*, 2015; ZHONG *et al.*, 2017). De forma contrária, porém, Araújo (2017) relatou a exacerbação do processo inflamatório local após a realização de RAR em sítios acometidos por periodontite experimental em ratos tratados com zoledronato. No entanto, apesar das semelhanças existentes entre ambas as abordagens terapêuticas, convém salientar que, devido às suas

peculiaridades anatômicas e de acessibilidade, a região de furca dentária dificulta sobremaneira a completa descontaminação local por meio da instrumentação manual, sendo que tal fator pode ter sido crucial para os resultados descritos naquele contexto.

O zoledronato, potente fármaco pertencente ao grupo dos BFs nitrogenados, atua na via do mevalonato, inativando a enzima farnesil-PP sintase e, consequentemente, impedindo a formação dos produtos farnesil-PP e geranilgeranil-PP, os quais se mostram essenciais para a prenilação de pequenas GTPases relacionadas aos mais diversos processos celulares dos osteoclastos, como é o caso das alterações morfológicas de membrana e do rearranjo de seu citoesqueleto, essenciais para que ocorra a reabsorção óssea, além do tráfego intracelular de vesículas e a inibição da apoptose prematura destas células (CREMERS *et al.*, 2019; EBETINO, 2011; ROGERS *et al.*, 2011). No presente estudo, mesmo diante de uma área de análise relativamente pequena quando comparada ao organismo em sua integralidade, foi possível constatar que o tratamento medicamentoso com zoledronato exerceu os efeitos farmacológicos esperados sobre os osteoclastos, tendo em vista a menor quantidade de células TRAP-positivas, os seus aspectos morfológicos e as características teciduais nitidamente observados nos espécimes pertencentes aos grupos tratados com o medicamento em questão. Assim, nos animais dos grupos ZOL, ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM, os osteoclastos existentes se apresentavam como células grandes, arredondadas, hipernucleadas e, na maioria das vezes, distantes da matriz óssea, ou seja, exibindo características típicas de inatividade (GROSS *et al.*, 2017). Além disso, como reflexo da inativação de tais células e segundo os dados confirmados pela análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo total na região peri-implantar, não se observou significativa perda óssea ao redor dos implantes nos grupos em que a PiE foi induzida, característica intrínseca à evolução da doença e que possivelmente se faria presente caso o tratamento medicamentoso com droga antirreabsortiva não houvesse sido empregado.

Embora Ruggiero *et al.* (2022) tenham caracterizado clinicamente a ONMM pela presença de osso exposto ou osso que pode ser sondado através de fístula intra ou extraoral na região maxilofacial, alguns estágios de evolução da doença foram também propostos pelos mesmos autores. Assim, o estágio 0 precede a manifestação clínica da ONMM, no qual são observados sinais radiográficos e/ou histopatológicos de necrose óssea, mesmo em pacientes assintomáticos. Guardadas as devidas proporções, tais informações podem ser transpostas ao presente estudo, ainda que este tenha sido realizado em um modelo experimental. Diante disso, a avaliação histopatológica, sustentada pelos dados obtidos com a análise histométrica, demonstrou inúmeras áreas de tecido ósseo não vital na região peri-implantar, sendo estas

constituídas por numerosas lacunas contíguas desprovidas de osteócitos e/ou contendo apenas remanescentes de tais células ósseas (MARTELLI *et al.*, 2017), principalmente nos espécimes pertencentes aos grupos tratados com zoledronato, sendo que tais características se mostraram mais evidentes no grupo ZOL-PiE, e ainda exacerbadas no grupo ZOL-PiE-DM. Estes achados histopatológicos, por fim, configuram a necrose óssea, aspecto determinante para o diagnóstico microscópico da ONMM (FRANCO-PRETTO *et al.*, 2014).

Ademais, segundo os diferentes padrões propostos por Kwon *et al.* (2014) para categorizar a destruição óssea peri-implantar acarretada pela ONMM-IO, as lesões osteonecróticas observadas no presente estudo se enquadram, predominantemente, no tipo congelado (tipo I), descrito pela presença de necrose óssea ao redor do implante e nas adjacências do osso alveolar, com discreta inflamação nos tecidos moles peri-implantares, graus variados de infiltrado inflamatório nos espaços medulares e extensas áreas de tecido ósseo haversiano desprovido de componentes celulares. Todavia, deve-se destacar que os critérios adotados para tal classificação levaram em consideração apenas o aspecto histopatológico dos tecidos peri-implantares ora analisados, haja vista que não houve constatação clínica de nenhuma lesão semelhante à ONMM-IO neste modelo experimental em ratas nos diferentes grupos experimentais.

A inflamação induzida pelos próprios BFs ao redor dos implantes osseointegrados, conforme já descrito, na presença de fatores potencializadores deste quadro inflamatório, como é o caso da PiE e do DM em um primeiro momento, parece estar diretamente relacionada à ocorrência e ao respectivo aumento das áreas de tecido ósseo não vital na região peri-implantar. Neste sentido, estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que o desencadeamento da ONMM está condicionado à coexistência de fatores de risco sistêmicos, como a utilização de potentes drogas antirreabsortivas e/ou antiangiogênicas, e fatores de risco locais, como exodontias e/ou doenças de caráter inflamatório, a exemplo da PI e da periodontite (AGUIRRE *et al.*, 2012; HASEGAWA *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2015; RUGGIERO *et al.*, 2022). Estes fatores de risco locais relacionados à presença de inflamação e/ou infecção, por sua vez, induzem a produção local de citocinas com atividades pró-inflamatórias, como TNF α e interleucinas, as quais exacerbam ainda mais o processo e são capazes de ativar vias moleculares de sinalização que culminam com a morte celular programada dos osteócitos (AGUIRRE; CASTILLO; KIMMEL, 2021a). Em condições de normalidade, após a reabsorção óssea da região, os corpos apoptóticos de tais osteócitos são rapidamente removidos por fagócitos adjacentes e degradados em seus fagolisossomos. Entretanto, em pacientes submetidos à terapia com BFs, devido à diminuição quantitativa e à forte supressão

da atividade reabsortiva dos osteoclastos, a remoção do tecido ósseo não vital é extremamente lenta ou até mesmo inibida e, desta forma, é possível que os osteócitos em apoptose ou em estágio avançado de autofagia permaneçam por um tempo prolongado na rede lacuno-canalicular da matriz óssea, aumentando sobremaneira a probabilidade de ocorrência de uma necrose secundária nesta região (AGUIRRE; CASTILLO; KIMMEL, 2021a).

Além da apoptose dos osteócitos induzida pelo quadro inflamatório, outro padrão peculiar de morte celular programada vem sendo descrita, a chamada necroptose. Este tipo de morte celular também ocorre às custas da ativação de vias intracelulares pré-programadas, porém, resulta fenotipicamente em uma morte com características acidentais, na qual sucede a ruptura da membrana plasmática e o extravasamento do conteúdo citoplasmático e de padrões moleculares associados a danos (DAMPs, *Damage-Associated Molecular Patterns*) na matriz extracelular circunjacente (AGUIRRE; CASTILLO; KIMMEL, 2021a; DHURIYA; SHARMA, 2018; PASPARAKIS; VANDENABEELE, 2015; ZHOU; YUAN, 2014). Diversas situações e substâncias químicas são capazes de desencadear a necroptose nos osteócitos, incluindo TNF α e outras citocinas da mesma classe molecular, DNA danificado, LPS, infecções virais, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), medicamentos antineoplásicos, entre outros (GROOTJANS; BERGHE; VANDENABEELE, 2017; PASPARAKIS; VANDENABEELE, 2015). Assim, a presença dos DAMPs liberados pela célula em necroptose ou pela ocorrência da necrose secundária em células apoptóticas, conforme mencionado, induz a exacerbação do estado inflamatório e a consequente elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, as quais, por conseguinte, são capazes de ativar vias moleculares de sinalização intracelular que culminam com a apoptose ou necroptose de mais osteócitos, reiniciando e sustentando tal ciclo. Deste modo, torna-se pertinente postular que a intensidade do processo inflamatório local e a extensão da área de tecido ósseo não vital sejam grandezas diretamente proporcionais e, sendo assim, tal propósito vai ao encontro dos achados do presente estudo, justificando a maior quantidade de tecido ósseo não vital observado nos grupos em que a condição de natureza inflamatório-infecciosa foi instalada e/ou o DM foi executado, ou seja, nos grupos ZOL-PiE e ZOL-PiE-DM.

Estudos *in vitro* (HUANG *et al.*, 2016; MANZANO-MORENO *et al.*, 2018; NAIDU *et al.*, 2008) têm demonstrado que o zoledronato em altas concentrações exerce ainda potentes efeitos citotóxicos sobre pré-osteoblastos e osteoblastos. Huang *et al.* (2016) demonstraram efeitos inibitórios dose-dependentes para a expressão de colágeno do tipo I, fosfatase alcalina e OCN em osteoblastos tratados com zoledronato, além de uma diminuição na diferenciação

de células precursoras pela expressiva redução de proteína óssea morfogenética 2. O zoledronato também foi capaz de reduzir significativamente a diferenciação de células-tronco derivadas do tecido adiposo em osteoblastos (QU *et al.*, 2020). De modo semelhante aos resultados reportados *in vitro*, a análise imunoistoquímica realizada no presente estudo experimental demonstrou menor imunomarcção para OCN nos grupos tratados com zoledronato em comparação ao grupo C. Este potencial efeito citotóxico acarretado por elevadas dosagens de BFs sobre as células da linhagem osteoblástica pode ser então estendido aos osteócitos, os quais encontram-se interligados entre si e conectados aos osteoblastos periféricos por meio de inúmeras projeções citoplasmáticas contidas nos canalículos da matriz óssea. Assim, além de uma possível citotoxicidade direta, alterações importantes nesta dinâmica celular são capazes de acarretar a severa atrofia dos osteócitos e até mesmo a sua morte (AGUIRRE *et al.*, 2012; TSUBOI *et al.*, 2016), culminando com o acúmulo de lacunas vazias que não serão efetivamente reabsorvidas devido aos efeitos farmacológicos dos BFs. Neste contexto, o grupo ZOL-PiE-DM, que exibiu a maior quantidade de tecido ósseo não vital na região peri-implantar, também apresentou menor densidade de imunomarcção para OCN em relação ao ZOL, ratificando a intrínseca correlação existente entre ambas as características analisadas.

Outro aspecto local potencialmente capaz de contribuir de forma negativa para a manutenção da vitalidade dos tecidos peri-implantares é a ação antiangiogênica exercida pelos BFs, comprovada no presente estudo pela menor densidade de imunomarcção para VEGF nos animais pertencentes aos grupos ZOL e ZOL-PiE-DM. Corroborando tais achados, animais submetidos à exodontia durante o tratamento sistêmico com dosagem oncológica de zoledronato também apresentaram menor imunomarcção para VEGF durante o processo de reparo ósseo alveolar (TORO *et al.*, 2019). O estudo clínico desenvolvido por Wehrhan *et al.* (2011) demonstrou evidente redução na angiogênese e na neoformação de vasos sanguíneos no tecido conjuntivo mucoperiosteal de pacientes submetidos à terapia com zoledronato ou pamidronato. Wang *et al.* (2022) também verificaram uma diminuição na densidade vascular, no perímetro médio e no diâmetro de vasos sanguíneos situados em tecidos moles adjacentes a áreas de necrose óssea em pacientes diagnosticados com ONMM. É válido destacar, no entanto, que a maior densidade de imunomarcção para VEGF constatada no grupo ZOL-PiE em relação ao grupo ZOL deve-se, possivelmente, à intensa resposta inflamatória presente neste grupo, a qual estimula sobremaneira a angiogênese e o aumento da vascularização local. Assim, torna-se cada vez mais evidente que as lesões osteonecróticas e a fisiopatologia da ONMM não ocorrem às custas de um único evento ou fator etiológico, mas que são

decorrentes da complexa interrelação entre os mais diversos mecanismos de agressão celular e tecidual que culminam neste trágico desfecho.

No presente estudo, os animais pertencentes ao grupo ZOL-PiE-DM apresentaram a maior quantidade de tecido ósseo não vital na região peri-implantar quando comparado aos demais grupos experimentais. Este fato, embora não esteja coerentemente relacionado à diminuição dos parâmetros inflamatórios observados neste grupo, pode ser justificado devido às características traumáticas inerentes ao procedimento mecânico empregado e às diferentes fases da reparação tecidual nos sistemas biológicos, as quais transitam pela inflamação, proliferação celular e maturação da matriz extracelular, respectivamente (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). O DM, realizado com curetas e instrumentais odontológicos manuais, conforme já exposto, acarreta um trauma mecânico aos tecidos moles e duros no local em que é aplicado e, além disso, ao remover os grandes depósitos bacterianos e fatores retentivos de placa que sustentam a progressão da doença, estimula biologicamente a reparação dos tecidos acometidos. Esta associação entre agressão mecânica e estímulo biológico para reparação desencadeia uma resposta inflamatória de caráter agudo imediatamente após a execução do procedimento, e esta potente exacerbação inicial do processo inflamatório pode levar à morte dos osteócitos pelos diferentes mecanismos supracitados e à iminente necrose óssea, haja vista que não ocorre a reabsorção do tecido não vital devido à supressão da atividade osteoclástica ocasionada pelo uso dos BFs. Por fim, com o natural avanço nas etapas do processo de reparo tecidual, a intensa inflamação inicialmente observada nos tecidos moles tende a regredir e dar lugar à fase de maturação (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006), porém, as graves consequências acarretadas ao nível ósseo permanecem e até se exacerbam, o que torna possível caracterizar a monoterapia com o DM, quando realizada de forma convencional, também como um importante fator de risco agravante e/ou desencadeador da ONMM-IO.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PROPOSIÇÕES FUTURAS

Dentro dos limites pertinentes ao presente estudo e com base na extrapolação racional dos resultados observados em um modelo experimental em animais para os seres humanos, pode-se inferir que a presença dos IO, mesmo quando já osseointegrados na cavidade bucal, durante o tratamento medicamentoso com zoledronato, constitui-se em um importante fator predisponente para a ONMM. Logo, a associação deste fator com outras condições locais agravantes, como é o caso dos processos patológicos de natureza inflamatório-infecciosa, tais

como a PI, e os procedimentos odontológicos traumáticos, como é o caso do DM, configura uma situação clínica na qual o desencadeamento da ONMM-IO é uma consequência praticamente inevitável.

A PI é uma condição patológica de difícil tratamento e com evolução desfavorável. Os resultados obtidos com o presente estudo revelaram que a progressão da PiE, na ausência de qualquer tratamento local, se mostrou capaz de ocasionar a intensa inflamação dos tecidos peri-implantares e o surgimento, por consequência, de inúmeras áreas de tecido ósseo não vital em suas adjacências, além de outras importantes alterações ao nível celular nesta região. Tais aspectos denotam que a evolução da PI pode culminar com o desencadeamento da ONMM-IO, com a perda do implante osseointegrado e em consequências ainda mais severas e comprometedoras. Por outro lado, porém, também foi possível constatar que o tratamento local da PiE de forma manual, por meio do DM convencionalmente proposto, foi capaz de levar à exacerbação na quantidade de tecido ósseo não vital ao redor dos implantes, não se mostrando uma terapia efetiva e segura para ser empregada nestas condições locais e sistêmicas. Deste modo, surge uma grande indagação por parte do cirurgião-dentista no manejo da PI em pacientes tratados com drogas antirreabsortivas, pois, ao passo em que a evolução da doença fatalmente pode culminar com o desencadeamento da ONMM-IO, o tratamento local mais comumente empregado também é capaz de fazê-lo.

Assim, os resultados ora observados evidenciam que a alternativa mais eficiente e segura para se evitar a ONMM-IO e a perda dos IO em pacientes submetidos ao tratamento medicamentoso com BFs é a prevenção primária da ocorrência da PI. Para tanto, o paciente deve ser adequadamente esclarecido sobre os potenciais riscos de tal condição e encorajado à realização de consultas clínicas odontológicas frequentes, com periodicidade pré-estabelecida pelo profissional, e com início, preferivelmente, anterior à instituição do protocolo medicamentoso. Desta forma, ao menor sinal de inflamação nos tecidos marginais, o cirurgião-dentista deve lançar mão de condutas terapêuticas minimamente invasivas e que possibilitem o controle eficaz e, preferencialmente, a regressão de tal condição, impedindo a sua progressão para os tecidos mais profundamente situados ao redor do implante, culminando com a PI.

Nas situações, porém, em que a PI já se encontra instalada, conforme fora mimetizado durante os procedimentos experimentais do presente trabalho, a escolha de um tratamento adequado e seguro mostra-se necessária. Diante dos resultados insatisfatórios verificados neste estudo com o emprego do DM enquanto monoterapia, é imprescindível que outras estratégias terapêuticas peri-implantares sejam propostas e cientificamente avaliadas. O

emprego de associações farmacológicas e/ou a utilização de terapias adjuvantes ao DM, em especial aquelas com ação bioestimulatória e/ou antimicrobiana, poderiam se constituir em uma maneira de tornar efetivo e seguro o tratamento não cirúrgico da PI durante o protocolo medicamentoso com drogas antirreabsortivas. A fotobiomodulação com *laser* de baixa potência (LLLT, *Low-Level Laser Therapy*) e a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, *Antimicrobial Photodynamic Therapy*) são propostas terapêuticas que têm se mostrado capazes de prevenir a ocorrência da ONMM em ratas tratadas com dosagem oncológica de zoledronato e submetidas à extração dentária (ERVOLINO *et al.*, 2019; STATKIEVICZ *et al.*, 2018). Particularmente, a aPDT, quando empregada como monoterapia ou como terapia coadjuvante à RAR, se destacou como uma modalidade efetiva e segura para o tratamento da periodontite experimental induzida em ratos tratados com zoledronato (SÁ, 2018). Diante disso, estes promissores achados nas áreas de cirurgia oral e periodontia merecem ser ainda mais explorados e validados também dentro da implantodontia, e o seu emprego como terapias adjuvantes ao DM convencional poderá se constituir em uma importante manobra clínica para a prevenção da ONMM-IO em um futuro próximo.

C onclusão

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos para o modelo experimental utilizado no presente estudo, pode-se concluir que:

- o debridamento mecânico, empregado de forma convencional e como monoterapia, não se mostrou uma proposta terapêutica efetiva e, tampouco, segura para o tratamento da peri-implantite experimental induzida por biofilme com o uso de ligadura em implantes já osseointegrados na maxila de ratas senescentes e submetidas à terapia posterior com dosagem oncológica de zoledronato, pois, apesar da relativa redução na intensidade do processo inflamatório local aos 21 dias pós tratamento, ocasionou o considerável aumento na quantidade de tecido ósseo não vital e levou a alterações celulares e na histofisiologia da região peri-implantar, podendo se constituir em um fator de risco agravante e/ou desencadeador da ONMM-IO;
- o tratamento medicamentoso com dosagem oncológica de zoledronato na presença do implante osseointegrado na cavidade bucal se mostrou capaz de provocar uma resposta inflamatória local e levou à ocorrência de áreas de tecido ósseo não vital e outras alterações ao nível celular na região peri-implantar, colocando a presença do implante, por si só, como um fator predisponente para a ONMM durante o tratamento medicamentoso com drogas antirreabsortivas;
- a exacerbada resposta inflamatória e as extensas áreas de tecido ósseo não vital, juntamente com as demais alterações celulares e histofisiológicas observadas nos tecidos peri-implantares durante o tratamento medicamentoso com zoledronato na presença da peri-implantite experimental, permitem categorizar tal condição patológica como um fator de risco precipitante para a ocorrência da ONMM-IO durante o tratamento medicamentoso com drogas antirreabsortivas.

eferências

REFERÊNCIAS

- AGHALOO, T. *et al.* The effects of systemic diseases and medications on implant osseointegration: a systematic review. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 34, p. s35-s49, 2019.
- AGHALOO, T.; HAZBOUN, R.; TETRADIS, S. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaws. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, v. 27, n. 4, p. 489-496, 2015.
- AGUIRRE, J. I. *et al.* Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. **J. Bone Miner. Res.**, v. 27, n. 10, p. 2130-2143, 2012.
- AGUIRRE, J. I.; CASTILLO, E. J.; KIMMEL, D. B. Biologic and pathologic aspects of osteocytes in the setting of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). **Bone**, v. 153, p. 116168, 2021a.
- AGUIRRE, J. I.; CASTILLO, E. J.; KIMMEL, D. B. Preclinical models of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). **Bone**, v. 153, p. 116184, 2021b.
- ALBREKTSSON, T. *et al.* Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign bone reaction? **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 16, n. 2, p. 155-165, 2014.
- ALDHALAAN, N. A.; BAQAIS, A.; AL-OMAR, A. Medication-related osteonecrosis of the jaw: a review. **Cureus**, v. 12, n. 2, p. e6944, 2020.
- AMID, R.; KADKHODAZADEH, M.; MOSCOWCHI, A. Immediate implant placement in compromised sockets: a systematic review and meta-analysis. **J. Prosthet. Dent.**, 2021. [Epub ahead of print]
- ANSARI, N.; SIMS, N. A. The cells of bone and their interactions. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 262, p. 1-25, 2020.
- ARAÚJO, N. J. **Periodontite experimental em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato: análise da progressão da doença e avaliação da resposta periodontal ao tratamento mecânico convencional.** 2017. 100f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.
- BADEL, T. *et al.* Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate. **Coll. Antropol.**, v. 37, n. 2, p. 645-651, 2013.
- BARBA-RECREO, P. *et al.* Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 42, n. 6, p. 744-750, 2014.

- BENNARDO, F. *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaw with spontaneous hemimaxilla exfoliation: report of a case un metastatic renal cancer patient under multidrug therapy. **Case Rep. Med.**, v. 2020, p. 8093293, 2020.
- BLOCK, M. S. Dental implants: the last 100 years. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 76, n. 1, p. 11-26, 2018.
- BORMANN, K. H. *et al.* IL-1 polymorphism and periimplantitis. A literature review. **Schweiz. Monatsschr. Zahnmed.**, v. 120, n. 6, p. 510-520, 2010.
- BOSSHARDT, D. D.; CHAPPUIS, V.; BUSER, D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. **Periodontol.** 2000, v. 73, n. 1, p. 22-40, 2017.
- BRÅNEMARK, P. I. *et al.* Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, v. 16, p. 1-32, 1977.
- BRAUN, E.; IACONO, V. J. Bisphosphonates: case report of nonsurgical periodontal therapy and osteochemonecrosis. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, v. 26, n. 4, p. 315-319, 2006.
- BROUGHTON, G. 2ND; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 117, p. 1e-S-32e-S, 2006.
- BUCKWALTER, J. A. *et al.* Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix and mineralization. **Inst. Course Lect.**, v. 45, p. 371-386, 1996.
- BUSER, D.; SENERBY, L.; BRUYN, H. D. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. **Periodontol.** 2000, v. 73, n. 1, p. 7-21, 2017.
- CAMINHA, R. D. *et al.* The impact of medication-related osteonecrosis of the jaws on the quality of life in cancer patients. **J. Clin. Exp. Dent.**, v. 12, n. 8, p. e725-e729, 2020.
- CAMPISI, G. *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) prevention and diagnosis: Italian Consensus Update 2020. **Int. J. Environ. Res. Public Health.**, v. 17, n. 16, p. 5998, 2020.
- CAVAILLON, J. M. Exotoxins and endotoxins: inducers of inflammatory cytokines. **Toxicon.**, v. 149, p. 45-53, 2018.
- CHADHA, G. K. *et al.* Osseointegration of dental implants and osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate therapy: a systematic review. **J. Oral Implantol.**, v. 39, n. 4, p. 510-520, 2013.
- CHANG, J.; HAKAM, A. E.; MCCAULEY, L. K. Current understanding of the pathophysiology of osteonecrosis of the jaw. **Curr. Osteopor. Rep.**, v. 16, n. 5, p. 584-595, 2018.

- CHRCANOVIC, B. R.; ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Smoking and dental implants: a systematic review and meta-analysis. **J. Dent.**, v. 43, n. 5, p. 487-498, 2015.
- CLÉZARDIN, P.; MASSAIA, M. Nitrogen-containing bisphosphonates and cancer immunotherapy. **Curr. Pharm. Des.**, v. 16, n. 27, p. 3007-2014, 2010.
- CLOKIE, C. M.; WARSHAWSKY, H. Morphologic and radioautographic studies of bone formation in relation to Titanium implants using the rat tibia as a model. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 10, n. 2, p. 155-165, 1995.
- CREMERS, S. *et al.* Pharmacology of bisphosphonates. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 85, n. 6, p. 1052-1062, 2019.
- CRESPI, R. *et al.* Nonsurgical treatment of peri-implantitis without eliminating granulation tissue: a 3-year study. **Implant. Dent.**, v. 28, n. 1, p. 4-10, 2019.
- DATTA, H. K. *et al.* The cell biology of bone metabolism. **J. Clin. Pathol.**, v. 61, n. 5, p. 577-587, 2008.
- DE BARROS SILVA, P. G. *et al.* Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Dis.**, v. 22, n. 7, p. 649-657, 2016.
- DE MOLON, R. S. *et al.* Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. **Microsc. Res. Tech.**, v. 81, n. 12, p. 1412-1421, 2018.
- DHURIYA, Y. K.; SHARMA, D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. **J. Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 199, 2018.
- DIACHKOVA, E. *et al.* Nonsurgical treatment of peri-implantitis: case series. **Dent. J. (Basel)**, v. 8, n. 3, p. 78, 2020.
- DINIZ-FREITAS, M. *et al.* Denosumab-related osteonecrosis of the jaw following non-surgical periodontal therapy: a case report. **J. Clin. Periodontol.**, v. 45, n. 5, p. 570-577, 2018.
- 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. 1032-1045, 2008.
- 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.
- ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU, E.; BAMIAS, A. Antiresorptive treatment-associated ONJ. **Eur. J. Cancer Care**, n. 26, n. 6, p. e12787, 2017.
- EL-RABBANY, M. *et al.* Effectiveness of treatments for medication-related osteonecrosis of the jaw: a systematic review and meta-analysis. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 148, n. 8, p. 584-594.e2, 2017.
- EPHROS, H.; KIM, S.; DEFACO, R. Peri-implantitis: evaluation and management. **Dent. Clin. North Am.**, v. 64, n. 2, p. 305-3013.

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.

ESCOBEDO, M. F. *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaw. Implant presence-triggered osteonecrosis: case series and literature review. **J. Stomatol. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 121, n. 1, p. 40-48, 2020.

FIGUERO, E. *et al.* Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis. **Periodontol.** **2000**, v. 66, n. 1, p. 255-273, 2014.

FLORENCIO-SILVA, R. *et al.* Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015, p. 421746, 2015.

FRANCO-PRETTO, E. *et al.* Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: clinical, imaging, and histopathology findings. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 118, n. 4, p. 408-417, 2014.

FREIRE, M. O. *et al.* Development of an animal model for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study. **J. Periodontol.**, v. 82, n. 5, p. 778-789, 2011.

FUNAYAMA, H. *et al.* Effects of zoledronate on local and systemic production of IL-1 β , IL-18, and TNF- α in mice and augmentation by lipopolysaccharide. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 42, n. 6, p. 929-936, 2019.

GARCIA, V. G. *et al.* Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. **Support. Care Cancer**, v. 23, n. 7, p. 2007-2017, 2015.

GIOVANNACCI, I. *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaws around dental implants: implant surgery-triggered or implant presence-triggered osteonecrosis? **J. Craniofac. Surg.**, v. 27, n. 3, p. 697-701, 2016.

GLOSSEL, B. *et al.* Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 25, n. 3, p. 516-524, 2010.

GOSS, A. *et al.* The nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in dental implant patients: a South Australian case series. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 68, n. 2, p. 337-343, 2010.

GRANT, B. T. *et al.* Outcomes of placing dental implants in patients taking oral bisphosphonates: a review of 115 cases. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 66, n. 2, p. 223-230, 2008.

GROOTJANS, S.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. **Cell Death Differ.**, v. 24, n. 7, p. 1184-1195, 2017.

GROSS, C. *et al.* Osteoclast profile of medication-related osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy: a comparison with osteoradionecrosis and osteomyelitis. **J. Transl. Med.**, v. 15, p. 128, 2017.

HALLMER, F. *et al.* 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.**, v. 126, n. 6, p. 477-485, 2018.

HAMADEH, I. S.; NGWA, B. A.; GONG, Y. Drug induced osteonecrosis of the jaw. **Cancer Treat. Rev.**, v. 41, n. 5, p. 455-464, 2015.

HASEGAWA, T. *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in cancer patients: a multicenter retrospective study. **Osteoporos. Int.**, v. 30, n. 1, p. 231-239, 2019.

HAYASHIDA, S. *et al.* 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.**, v. 32, n. 10, p. 2022-2029, 2017.

HE, Q. *et al.* Development of a rat model for type 2 diabetes mellitus peri-implantitis: a preliminary study. **Oral Dis.**, v. 28, n. 7, p. 1936-1946, 2022.

HORI, Y. *et al.* Xerostomia aggravates ligation-induced peri-implantitis: a preclinical in vivo study. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 32, n. 5, p. 581-589, 2021.

HUANG, X. *et al.* Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. **Mol. Med. Rep.**, v. 13, n. 1, p. 6313-622, 2016.

INSUA, A. *et al.* Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 105, n. 7, p. 2075-2089, 2017.

JACOBSEN, C. *et al.* Osteopathology induced by bisphosphonates and dental implants: clinical observations. **Clin. Oral Invest.**, v. 17, n. 1, p. 167-175, 2013.

JANG, H. W.; KIM, J. W.; CHA, I. H. Development of animal model for bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). **Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.**, v. 37, n. 1, p. 18, 2015.

KHAN, A. A. *et al.* Case-based review of osteonecrosis of the jaw (ONJ) and application of the international recommendations for management from the international task force on ONJ. **J. Clin. Densitom.**, v. 20, n. 1, p. 8-24, 2017.

KHAN, A. A. *et al.* Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. **J. Bone Miner. Res.**, v. 30, n. 1, p. 3-23, 2015.

KIM, J. W. *et al.* Biomarkers for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Clin. Implant. Dent. Relat. Res.**, v. 18, n. 2, p. 281-291, 2016.

- KOLPAKOVA, M. E. *et al.* Experimental model of osteonecrosis of the jaw in rats treated with zoledronic acid. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 55, n. 2, p. 156-159, 2017.
- KOUTOUZIS, T. *et al.* A novel rat model of polymicrobial peri-implantitis: a preliminary study. **J. Periodontol.**, v. 88, n. 2, p. e32-e41, 2017.
- KUIPER, J. W. P. *et al.* Zoledronate and pamidronate depress neutrophil functions and survival in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 165, n. 2, p. 532-539, 2012.
- KUROSHIMA, S.; SASAKI, M.; SAWASE, T. Medication-related osteonecrosis of the jaw: a literature review. **J. Oral Biosc.**, v. 61, n. 2, p. 99-104, 2019.
- KWON, T. G. *et al.* Osteonecrosis associated with dental implants in patients undergoing bisphosphonate treatment. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 25, n. 5, p. 632-640, 2014.
- LANG, N. P.; SALVI, G. E.; SCULEAN, A. Nonsurgical therapy for teeth and implants - when and why? **Periodontol. 2000**, v. 79, n. 1, p. 15-21, 2019.
- LAZAROVICI, T. S. *et al.* Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw associated with dental implants. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 68, n. 4, p. 790-796, 2010.
- LESCLOUS, P. *et al.* Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a key role of inflammation? **Bone**, v. 45, n. 5, p. 843-852, 2009.
- LIN, P. *et al.* Application of ligature-induced periodontitis in mice to explore the molecular mechanism of periodontal disease. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 16, p. 8900, 2021.
- LOPES, D. *et al.* Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. **Biomaterials**, v. 185, p. 240-275, 2018.
- LÓPEZ-CEDRÚN, J. L. *et al.* Oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in dental implant patients: a case series. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 51, n. 8, p. 874-879, 2013.
- LOSCO, P. E. Dental dysplasia in rats and mice. **Toxicol. Pathol.**, v. 23, n. 6, p. 677-688, 1995.
- LUNGU, A. E. *et al.* Observational study of the bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. **Clujul Med.**, v. 91, n. 2, p. 209-2015, 2018.
- MADEIRA, M. *et al.* Prevention and treatment of oral adverse effects of antiresorptive medications for osteoporosis - a position paper of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM), Brazilian Society of Stomatology and Oral Pathology (SOBEP), and Brazilian Association for Bone Evaluation and Osteometabolism (ABRASSO). **Arch. Endocrinol. Metab.**, v. 2359, p. 3997000000301, 2020.
- MANZANO-MORENO, F. J. *et al.* Bisphosphonate modulation of the gene expression of different markers involved in osteoblast physiology: possible implications in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Int. J. Med. Sci.**, v. 15, n. 4, p. 359-367, 2018.

- MARTELLI, S. J. R. *et al.* Comparison of effects of zoledronic acid and clodronate on the bone structure: imaginological and histomorphometrical study in vivo. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 46, n. 8, p. 632-636, 2017.
- MARTINS, R. *et al.* Osseointegration of zirconia and titanium implants in a rabbit tibiae model evaluated by microtomography, histomorphometry and fluorochrome labeling analyses. **Periodontal Res.**, v. 53, n. 2, p. 210-221, 2018.
- MARX, R. E. *et al.* Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaw: risk factors, recognition, prevention and treatment. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 63, n. 11, p. 1567-1575, 2005.
- MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 61, n. 9, p. 1115-1117, 2003.
- MASSAAD, J.; MAGREMANNE, M. Is medication related osteonecrosis of the jaw around implants a rare entity? A case series with a focus on etiopathophysiology. **J. Stomatol. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 123, n. 6, p. e743-e748, 2022.
- MATHEUS, H. R. *et al.* Cisplatin chemotherapy impairs the peri-implant bone repair around titanium implants: an in vivo study in rats. **J. Clin. Periodontol.**, v. 45, n. 2, p. 241-252, 2018.
- MATSUO, K.; IRIE, N. Osteoclast-osteoblast communication. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 473, n. 2, p. 201-209, 2008.
- MCGOWAN, K.; MCGOWAN, T.; IVANOVSKI, S. Risk factors for medical-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. **Oral Dis.**, v. 24, n. 4, p. 527-536, 2018.
- MERGONI, G. *et al.* The effect of laser therapy on the expression of osteocalcina and osteopontin after tooth extraction in rats treated with zoledronate and dexamethasone. **Support. Care Cancer**, v. 24, n. 2, p. 807-813, 2016.
- MIGLIORATI, C. A. Bisphosphanates and oral cavity avascular bone necrosis. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, n. 22, p. 4253-4254, 2003.
- MONJE, A. *et al.* Microbial and host-derived biomarker changes during ligature-induced and spontaneous peri-implantitis in the Beagle dog. **J. Periodontal Res.**, v. 56, n. 1, p. 93-100, 2021.
- MORITA, M. *et al.* Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following anti-resorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 46322, 2017.
- NAIDU, A. *et al.* The effects of of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 106, n. 1, p. 5-13, 2008.
- ORYAN, A.; SHAVIEH, S. Effects of bisphosphonates on osteoporosis: focus on zoledronate. **Life Sci.**, v. 264, p. 118681, 2021.

- 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. 303-309, 2012.
- OTTO, S. *et al.* Osteonecrosis of the jaw as a possible rare side effect of annual bisphosphonates administration for osteoporosis. A case report. **J. Med. Case Rep.**, v. 5, p. 477, 2011.
- PALIN, L. P. *et al.* Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. **J. App. Oral Sci.**, v. 26, p. e20170470, 2018.
- PAPAPETROU, P. D. Bisphosphonate-associated adverse events. **Hormones (Athens)**, v. 8, n. 2, p. 96-110, 2009.
- PASPARAKIS, M.; VANDENABEELE, P. Necroptosis and its role in inflammation. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 311-320, 2015.
- PICHARDO, S. E. C. *et al.* Dental implants at risk factors for patients with medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 58, n. 7, p. 771-776, 2020.
- PIRC, M.; DRAGAN, I. F. The key points of maintenance therapy for dental implants: a literature review. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v. 38, n. 4, p. e5-e8, 2017.
- PIRIH, F. Q. *et al.* Ligature-induced peri-implantitis in mice. **J. Periodontal Res.**, v. 50, n. 4, p. 519-524, 2015.
- POGREL, M. A.; RUGGIERO, S. L. Previously successful dental implants can fail when patients commence anti-resorptive therapy - a case series. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 47, n. 2, p. 220-222, 2018.
- POLYMERI, A. *et al.* Risk factors, diagnosis, and treatment of peri-implantitis: a cross-cultural comparison of U.S. and European periodontists' considerations. **J. Periodontol.**, v. 93, n. 4, p. 481-492, 2022.
- QU, X. *et al.* Zoledronate inhibits the differentiation potential of adipose-derived stem cells into osteoblasts in repairing jaw necrosis. **Mol. Cell. Probles**, v. 51, p. 101525, 2020.
- REINEDAHL, D. *et al.* Ligature-induced experimental peri-implantitis - a systematic review. **J. Clin. Med.**, v. 7, n. 12, p. 492, 2018.
- RENVERT, S.; POLYZOIS, I. Treatment of pathologic peri-implant pockets. **Periodontol. 2000**, v. 76, n. 1, p. 180-190, 2018.
- ROGERS, M. J. *et al.* Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 34-41, 2011.
- ROGERS, M. J.; MÖNKKÖNEN, J.; MUNOZ, M. A. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates and new insights into their effects outside the skeleton. **Bone**, v. 139, p. 115493, 2020.

RUGGIERO, S. L. *et al.* American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' position paper on medication-related osteonecrosis of the jaws-2014 update. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 72, n. 10, p. 1938-1956, 2014.

RUGGIERO, S. L. *et al.* American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' position paper on medication-related osteonecrosis of the jaws-2022 update. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 80, n. 5, p. 920-943, 2022.

RUSSEL, R. G. G. Bisphosphonates: the first 40 years. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 2-19, 2011.

SÁ, D. P. **Terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da periodontite em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato.** 2018. 117f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

SAMPAIO, F. C.; VELOSO, H. H. P.; BARBOSA, D. N. Bisphosphonates mechanisms of action and its influence in the endodontic treatment prognosis. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, v. 51, n. 1, p. 31-38, 2010.

SANTOS-MARTINS, B. G. *et al.* Surgical and nonsurgical treatment protocols for peri-implantitis: an overview of systematic reviews. **J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 37, n. 4, p. 660-676, 2022.

SCHIMMEL, M. *et al.* Effect of advanced age and/or systemic medical conditions on dental implant survival: a systematic review and meta-analysis. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 29, p. 311-330, 2018.

SCHWARZ, F. *et al.* Peri-implantitis. **J. Periodontol.**, v. 89, p. s267-s290, 2018.

SEGUNDO, A. S. *et al.* Methodological model of chronic stress associated with ligature-induced periodontitis in rats: a radiographic study. **Braz. Oral Res.**, v. 24, n. 4, p. 455-459, 2010.

SEKI, *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaw subsequent to peri-implantitis: a case report and literature review. **J. Oral Implantol.**, v. 47, n. 6, p. 502-510, 2021.

SHER, J. *et al.* Dental implant placement in patients with a history of medications related to osteonecrosis of the jaws: a systematic review. **J. Oral Implantol.**, v. 47, n. 3, p. 249-268, 2021.

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. 1237-1245, 2015.

SIMS, N. A.; GOOI, J. H. Bone remodeling: multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 19, n. 5, p. 444-451, 2008.

SMEETS, R. *et al.* Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis - a review. **Head Face Med.**, v. 10, p. 34, 2014.

SOARES, A. P. *et al.* Bisphosphonates: pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of actions, clinical applications in children, and effects on tooth development. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 42, p. 212-2147, 2016.

SOMA, T. *et al.* Tooth extraction in mice administered zoledronate increases inflammatory cytokine levels and promotes osteonecrosis of the jaw. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 39, n. 3, p. 372-384, 2021.

SOUZA, E. Q. M. **Avaliação da existência de correlação entre implantes osseointegrados com e sem peri-implantite induzida e a ocorrência da osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa.** 2022. 66f. Tese (Doutorado em Odontologia, Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

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.

STAVROPOULOS, A. *et al.* The effect of antiresorptive drugs on implant therapy: systematic review and meta-analysis. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 18, p. 54-92, 2018.

SUN, J. *et al.* Development of a peri-implantitis model in the rat. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 31, n. 3, p. 203-214, 2020.

TAKAMORI, Y. *et al.* Histopathological comparison of the onset of peri-implantitis and periodontitis in rats. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 28, n. 2, p. 163-170, 2017.

TALEBIAN, R. *et al.* Bone healing around titanium implants in a preclinical model of bile duct ligation-induced liver injury. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 32, n. 8, p. 980-988, 2021.

TEMPESTA, A. *et al.* Peri-implantitis-like medication-related osteonecrosis of the jaw: clinical considerations and histological evaluation with confocal laser scanning microscope. **Oral Dis.**, v. 28, n. 6, p. 1603-1609, 2022.

TENORE, G. *et al.* Does medication-related osteonecrosis of the jaw influence the quality of life of cancer patients? **Biomedicines**, v. 8, n. 4, p. 95, 2020.

TING, M. *et al.* Peri-implantitis: a comprehensive overview of systematic reviews. **J. Oral Implantol.**, v. 44, n. 3, p. 225-247, 2018.

TORO, L. F. **Avaliação do processo de reparo peri-implantar em ratas tratadas com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato.** 2019. 100f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada, Biologia Celular Estrutural e Funcional) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

TORO, L. F. *et al.* Application of autologous platelet-rich plasma on tooth extraction site prevents occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws in rats. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 1, p. 22, 2019.

- TROELTZCH, M. *et al.* Clinical features of peri-implant medication-related osteonecrosis of the jaw: is there an association to peri-implantitis? **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 44, n. 12, p. 1945-1951, 2016.
- TSUBOI, K. *et al.* Effects of drug discontinuation after short-term daily alendronate administration on osteoblasts and osteocytes in mice. **Histochem. Cell Biol.**, v. 146, n. 3, p. 337-350, 2016.
- VANNALA, V.; PALAIAN, S.; SHANKAR, P. R. Therapeutic dimensions of bisphosphonates: a clinical update. **Int. J. Prev. Med.**, v. 11, p. 166, 2020.
- VIOLA, A. *et al.* The metabolic signature of macrophage responses. **Front. Immunol.**, v. 10, p. 1462, 2019.
- VO, T. N. N. *et al.* Ligature-induced peri-implantitis: tissue destruction and inflammatory progression in murine model. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 28, n. 2, p. 129-136, 2017.
- WAGNER, T. P. *et al.* Surgical and non-surgical debridement for the treatment of peri-implantitis: a two-center 12-month randomized trial. **Clin. Oral Invest.**, v. 25, n. 10, p. 5723-5733, 2021.
- WANG, J.; GOODGER, N. M.; POGREL, M. A. Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 61, n. 9, p. 1104-1107, 2003.
- WANG, Z. *et al.* Vascular analysis of soft tissues around the bone lesions in osteoradionecrosis, medication-related osteonecrosis, and infectious osteomyelitis of the jaw. **J. Craniofac. Surg.**, v. 33, n. 7, p. e750-e754, 2022.
- WEHRHAN, F. *et al.* Differentiation impairment of vascularization and angiogenesis in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw-related mucoperiosteal tissue. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 112, n. 2, p. 216-221, 2011.
- WEHRHAN, F. *et al.* Macrophage nad osteoclast polarization in bisphosphonates associated necrosis and osteoradionecrosis. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 45, n. 6, p. 944-953, 2017.
- WICK, A. *et al.* Risk factors associated with onset of medication-related osteonecrosis of the jaw in patients treated with denosumab. **Clin. Oral Investig.**, v. 26, n. 3, p. 2839-2852, 2022.
- WONG, R. L. *et al.* Comparing the healing potential of late-stage peridontitis and peri-implantitis. **J. Oral Implantol.**, v. 43, n. 6, p. 437-445, 2017.
- YAGIHARA, A. *et al.* Impact of dynamic and static load on bone around implants: an experimental study in a rat model. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 31, n. 3, p. e49-56, 2016.
- YAO, D. *et al.* Bone metabolism regulation: implications for the treatment of bone diseases. **Biomed. Pharmacother.**, v. 129, p. 110494, 2020.

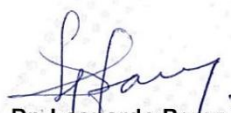
- YU, X. *et al.* Role of toll-like receptor 2 in inflammation and alveolar bone loss in experimental peri-implantitis versus periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 53, n. 1, p. 98-106, 2018.
- YUAN, K. *et al.* Dental implant failure associated with bacterial infection and long-term bisphosphonate usage: a case report. **Implant. Dent.**, v. 21, n. 1, p. 3-7, 2012.
- YUE, G. *et al.* Is maxillary diastema an appropriate site for implantation in rats? **Int. J. Implant. Dent.**, v. 6, n. 1, p. 8, 2020.
- ZHANG, Q. *et al.* IL-17-mediated M1/M2 macrophage alteration contributes to pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Clin. Cancer Res.**, v. 19, n. 12, p. 3176-3188, 2013.
- ZHANG, W. *et al.* The role of the immune response in the development of medication-related osteonecrosis of the jaw. **Front. Immunol.**, v. 12, p. 606043, 2021.
- ZHONG, S. L. *et al.* Effects of non-surgical periodontal therapy on serum inflammatory markers and metabolic level in obese rats. **J. South Med. Univ.**, v. 37, n. 6, p. 807-811, 2017.
- ZHOU, W.; YUAN, J. Necroptosis in health and diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v. 35, p. 14-23, 2014.
- ZHU, W. *et al.* Zoledronic acid promotes TLR-4-mediated M1 macrophage polarization in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **FASEB J.**, v. 33, n. 4, p. 5208-5219, 2019.
- ZOHRABIAN, V. M. *et al.* Dental implants. **Semin. Ultrasound CT. MR.**, v. 36, n. 5, p. 415-426, 2015.



pêndices

APÊNDICES

APÊNDICE A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA-UNESP.

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"	
CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA		
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals		
CERTIFICADO		
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da periimplantite experimental em ratas tratadas com dose oncológica de zoledronato", Processo FOA nº 00330-2019, 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 10 de Maio de 2019.		
VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Março de 2022.		
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Abril de 2022.		
CERTIFICATE		
We certify that the study entitled "Evaluation of the antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of the experimental peri-implantitis in rats treated with oncologic dose of zoledronate", Protocol FOA nº 00330-2019, 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 May 10, 2019.		
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 01, 2022.		
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 01, 2022.		
 Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani Coordenador da CEUA CEUA Coordinator		
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Odontologia de Araçatuba Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br		