



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

MARIANE BOCALON OLIVO

**Efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana
utilizando butil azul de toluidina e laser de baixa potência
na prevenção da osteonecrose dos maxilares associada à
terapia medicamentosa**

**Araçatuba- SP
2021**

MARIANE BOCALON OLIVO

**Efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana
utilizando butil azul de toluidina e laser de baixa potência
na prevenção da osteonecrose dos maxilares associada à
terapia medicamentosa**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia (Área de Periodontia).

Orientadora: Prof. Assoc. Edilson Ervolino
Coorientadora: Profa. Assoc. Letícia Helena Theodoro

**Araçatuba - SP
2021**

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

O49e Olivo, Mariane Bocalon.
Efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana
utilizando butil azul de toluidina e laser de baixa
potência na prevenção da osteonecrose dos maxilares
associada à terapia medicamentosa pós-exodontia /
Mariane Bocalon Olivo. - Araçatuba, 2021
56 f. : 4 il.; 2 tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Edilson Ervolino
Coorientadora: Profa. Letícia Helena Theodoro

1. Difosfonatos 2. Osteonecrose 3. Maxilares
4. Prevenção 5. Terapia fotodinâmica I.T.

Black D6
CDD 617.64

Dedicatória

À DEUS

Dedico este trabalho ao nosso criador em primeiro lugar, por toda proteção, por me dar força, por me guiar e abençoar. Deus não nos dá um fardo que não possamos carregar e ser felizes no caminho que queremos trilhar, tudo em nossa vida tem um propósito, e um destino, agradeço a ele a oportunidade de viver.

Aos meus Pais, ROSANGELA E LUDOVICO

Por toda dedicação, carinho, sustento, paciência, orientação, confiança, segurança e conforto dispensados a mim. Por acreditarem em todos os meus sonhos e não medirem esforços para me ajudar, por nunca desistirem de mim em todas as circunstâncias. Por cada palavra de apoio, força, pois o que sou hoje, todos os valores que aprendi devo muito a eles. Eu amo muito vocês, essa vitória é nossa. Tenho muito orgulho de ter vocês do meu lado Deus me enviou em uma família maravilhosa... Devo tudo a vocês, meus amores!

Ao meu Marido, Fernando e ao meu Filho Gustavo

Obrigada por ser meu companheiro de todas as horas, sempre me dar força para seguir em frente, me apoiar em todos meus sonhos e por toda paciência. Nada é por acaso você é um presente que Deus me enviou, principalmente toda nossa família, essa conexão. A cada dia que passamos longe nosso amor só se fortaleceu, você é muito especial na minha vida, obrigada por ser minha âncora e me fazer tão feliz .

Eu Te Amo...

Ao meu anjo, queria agradecer a DEUS por ter me enviado este menino, hoje vejo onde realmente está o sentido da vida, de seguir em frente e querer sempre buscar o melhor. Filhos nossa maior herança, Gustavo chegou e com ele me trouxe um grande susto, incertezas, medo... eu estava na reta final do mestrado, mas ele veio fazendo com que eu adiasse tudo para viver a maternidade e mostrar que tudo é no tempo de Deus, com tempo todo medo foi embora, e só veio coisas boas e muito aprendizado, posso dizer com toda certeza que não sei me ver sem ele e como eu vivi tanto tempo sem tê-lo, desde o dia que ele nasceu tudo teve um novo sentido. A cada sorriso,

abraço apertado vejo que ali está o amor, o verdadeiro, e vejo que ali está tudo o que preciso para seguir e ser sempre alguém melhor, e ser o espelho dele...

Eu te amo filho!

MEUS MENINOS...

Aos meus Avós

Vó Maria, Vó Dila, Vô Ataíde obrigada por sempre estarem ao meu lado, todo apoio, incentivo, orações, por toda ajuda e pela criação que tive ao lado de vocês. Amo vocês.

In memoriam ao meu Avô querido, que sempre esteve do meu lado em todos os momentos, me protegeu e protege ainda de onde ele estiver, por me dar força para seguir e não deixar desistir, por todos ensinamentos e valores, por guiar meu caminho como meu anjo de luz e não deixar que nada de ruim acontecer comigo. Dedico todo este trabalho a você, sei que de onde estiver está em festa com nossa conquista e super orgulhoso... Te AMO MEU ANJO.

Aos meus Familiares, Amigos e Pessoas Especiais presentes em minha vida...

Por todos estes motivos e por inúmeros outros que eu dedico a vocês esta conquista e deixo registrada minha imensa gratidão. Nada nessa vida é por acaso, Deus sempre tem propósitos, tudo é obra dele e do destino de cada um, pessoas certas, caminhos certos, ele nunca nos dá um fardo maior do que possamos carregar, nossa vida é passageira e rápida devemos aproveitar todos os momentos com toda intensidade.

Agradecimentos Especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus

Neste momento agradeço esta conquista à Deus, que me deu força e persistência para enfrentar todos os obstáculos encontrados, iluminando meu caminho em todos os momentos em que precisava, não permitindo que eu desistisse nesta longa caminhada. Obrigada meu Deus por colocar ao meu lado uma família amorosa, compreensiva que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. Obrigada Senhor por todas as graças concedidas e por cada momento que esteve comigo, protegendo-me e guiando-me nesse longo caminho de grandes realizações. Devo a ele todos os momentos de alegria e sucesso até aqui conquistado, minha eterna gratidão por mais esta benção em minha vida!

À Nossa Senhora de Aparecida

Gostaria de agradecer e dedicar essa vitória a minha Mãe Padroeira, Nossa Senhora de Aparecida, por toda proteção sob seu manto, por sempre estar ao meu lado, me sustentar até aqui, me iluminar e guiar o meu caminho e me livrar de todo mau...

"Mãe de Deus, Rainha dos Anjos, Advogada dos pecadores, refúgio e consolação dos aflitos e atribulados, Virgem Santíssima, cheia de poder e de bondade, lançai sobre nós um olhar favorável, para que sejamos socorridos por vós, em todas as necessidades em que nos achemos. Livrai-nos de tudo o que possa ofender-vos e ao vosso Santíssimo Filho, Jesus. Preservai-nos de todos os perigos da alma e do corpo..."

Amém...

Aos Meus Pais

Agradeço à minha mãe e ao meu pai, que desde o primeiro instante da minha vida acreditaram em mim e em todos meus sonhos, e fizeram o possível e impossível para minha felicidade, educação, e me amaram de uma forma incondicional. Obrigada pelo amor, exemplo, carinho, paciência, força entre outras mil coisas... Vocês são meu maior tesouro, meu maior orgulho e inspiração. Amo muito vocês!

Ao Meu Marido

Agradeço ao meu esposo Fernando Martins, por ser tão maravilhoso, que com todo amor me apoiou, me deu força e sempre esteve ao meu lado. Seu companheirismo, carinho, sua calma e palavra amiga para me fortalecer, foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. E também agradeço a paciência pela espera para a construção da nossa família e acreditarmos juntos em nossos sonhos... Eu te Amo muito!!

*"O amor é paciente, o amor é bondoso
Ele não inveja, não se vangloria
Ele não é orgulhoso
O amor não é rude, não é egoísta
Não se irrita facilmente, ele não guarda rancor algum
Vê o amor não se alegra com o mal, mas sim com a
verdade
Ele sempre protege, sempre confia, sempre espera,
sempre persevera
O amor nunca falha
O amor é eterno
Ele é eterno, ele não para jamais, vai além do tempo..."*
Bruno Mars - Love

Aos meus professores...

Ao meu querido orientador e **Prof. Dr. Edilson Ervolino**, difícil falar do senhor, um ser humano iluminado, um espelho, um exemplo. CHEFE, desde o início tive muito medo, pois estava entrando em um mundo completamente estranho diferente do que eu vivi na graduação, não sabia o que estava por vir, mais o senhor me acolheu de braços abertos e junto com toda a família ZOL, e se tornaram amigos e mais do que isto uma verdadeira família, onde todos se ajudam, ensinam e aprendem muito, vocês me incentivaram e me ensinaram muito muito, só tenho agradecer o senhor por ter aberto as portas do seu laboratório, da sua equipe, por ter me acolhido tão bem e por todos os ensinamentos. Você me mostrou os caminhos, me incentivou e incentiva até hoje a querer buscar conhecimento e passar tudo aquilo que sabe, em cada conversa, em cada puxão de orelha, e em cada apresentação para o senhor e isto só me fez crescer e realizar este sonho de chegar até aqui, sempre tive muito medo de apresentações, nervosismo e o senhor com seu jeito sereno sempre esteve do nosso lado, ajudando e incentivando, fazendo com que esta timidez fosse deixada de lado, nós fazendo brilhar. Obrigada Professor por tudo, o senhor é dono de um coração gigante, um espelho, por onde o senhor passa deixa fagulhas de aprendizado, e perfeccionismo, me sinto honrada por ter feito parte da sua equipe e ter te conhecido.

À minha querida coorientadora **Prof. Dra. Letícia Helena Theodoro**, a nossa mãezona da Periodontia, dona de uma classe, estilo, sabedoria, de um coração gigante, um espelho. Professora agradeço imensamente poder ter feito parte da sua equipe e por todos ensinamentos, a senhora e um exemplo de professora, ser humano e mulher, humilde, guerreira, e sempre busca o melhor para os seus alunos e sempre dá o melhor de si, em cada aula, cada clínica e me fez ficar mais apaixonada pela Periodontia, sua maestria, não tenho palavras para descrever. Obrigada por tanto, pela amizade, carinho e por passar sempre os valores que devemos buscar, a senhora é maravilhosa.

Ao querido **Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia** obrigada professor por tanto conhecimento, experiência, por todas resoluções de problemas, por nos fazer sempre pensar e buscar o melhor como seres humanos, o senhor e um ícone da Periodontia, poder ser sua aluna, ter tido senhor como banca me deixa lisonjeada e ainda o ganhar

como co-coorientador de presente junto com a Prof. Dra. Letícia é para poucos. Sou imensamente grata por tudo que o senhor fez por mim, por todos ensinamentos, e conhecimento, principalmente na disciplina de laser que eu era uma leiga e me apaixonei, irei levar para a minha vida/consultório. Meu muito obrigada por tudo, principalmente pelo acolhimento na sua equipe, na sua casa em cada confraternização, e por me tornar uma pessoa melhor, o senhor é dono de uma luz gigante, inspira amor no seu trabalho junto com a Prof. Letícia, sou imensamente grata.

À minha querida amiga, Profa., madrinha da faculdade, **Prof. Dra. Vivian Noronha** obrigada por ter aberto os caminhos, me ajudar seguir em frente com meu sonho e conquista-lo, agradeço por todo carinho, dedicação e ensinamentos, crescimento, principalmente pelo amor que você transmite em tudo o que faz e por me passar este amor pela periodontia, eu não queria apenas te agradecer, mas também dedicar esta conquista a você, sem você nada disto teria acontecido.

Obrigada por tudo, e que possamos dividir este amor e conhecimento sempre.

Ao **Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida** obrigada por ter aberto as portas da sua clínica, do seu laboratório, da sua sala de aula para que eu pudesse aprender um pouquinho de tanto do que o senhor sabe, sou imensamente grata pelas clinicas da pós lá aprendi muito com o senhor. Agradeço também pela paciência, em nos ajudar nas instalações das ligaduras nas ratinhas, sem o senhor o trabalho não traria os resultados. Professor seu humanismo e profissionalismo para com os pacientes e alunos me fazem ter um imenso respeito e admiração pelo senhor.

Muito obrigada por tudo!

À querida **Prof. Dra. Maria José Hitomi Nagata** muito obrigada por seus ensinamentos, dedicação e contribuição em nossa formação científica e acadêmica. A senhora é um exemplo de docente e pesquisadora. Sempre manteve uma conduta íntegra, ética, disciplinada, de excelência e perfeccionismo. Obrigada por tudo!

Aos meus queridos **professores da Graduação** meu Muito Obrigada!

Aos meus Amigos...

À querida **FAMÍLIA ZOL**: Luan, Isabella, Eduardo, Tiago, Jessica freire, Jessica Santana, Vinicius, Luy, e aos que já se foram...e aos que estão chegando, meu muito obrigada, por todo acolhimento, todo carinho, paciência, por todo ensinamento, obrigada principalmente por me ensinarem tanto, com vocês eu tive uma família, amizade pessoas que quero levar para a minha vida.

Luan, Isa, Quintão queria agradecer em especial vocês por estarem todos os dias do meu lado, nos almoços, na rotina de laboratório, pelas datas especiais vocês estarem sempre comigo, se tornaram minha família de ATA, nos sempre dividimos tudo rsrs, palavras amigas, carinho, brincadeiras, paçoca, café, a água (chata da água kkkk que fez todos criarem uma rotina de beber água) companheirismo e muito conhecimento, agradeço vocês muito por tudo que fazem e fizeram por mim.

Obrigada Família Zol vocês são mega especiais para mim, obrigada a todos que passaram seus finais de semana me ajudando nos protocolos, sem vocês nada disso teria acontecido, obrigada por todo trabalho em equipe, muitas risada, pelas dancinhas, levarei momentos lindos ao lado de vocês.

Aos meus amigos das ciências básicas:

À querida **Professora Mariza Matsumoto, Professora Alaide Gonçalves, Ao querido Professor Roberto Botacin, À querida Professora Roberta Okamoto E Aos demais Docentes do Departamento de Ciências Básicas, Prof. José Américo de Oliveira, Prof. Claudio Casati**, agradeço a todos pelo convívio agradável, pelos ensinamentos e por me inspirarem na carreira acadêmica.

Prof. Mariza, Prof. Alaide, Prof. Paulo Botacin, gostaria de agradecê-los em especial, os senhores não se tornaram só meus professores, mais amigos, obrigada por todo carinho, por todos os almoços, passeios, cafés, docinhos pós almoço, pelas pipocas doces rsrs e principalmente pela amizade que construí com vocês, gosto muito de vocês só tenho a agradecer por tudo, vou morrer de saudade da rotina, do despacho...e de tudo o que fazíamos, vocês são mega especiais.

Aos meus amigos da Pós graduação:

Cada um com suas histórias, sonhos, objetivos, personalidade e maneira de ser, contribuíram muito para meu crescimento. Muito obrigada por terem feito parte da minha vida!

*Por fim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para o meu sucesso, crescimento pessoal e estiveram presente em alguma fase da minha vida. Meu muito Obrigada!
Gratidão...*

*O importante não é o que se dá, mas o amor com que se demonstra...
Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que realmente importa.
Madre Teresa de Calcutá*

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

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

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, na pessoa de seu coordenador **Prof. Adj André Luiz Fraga Briso**, por sua dedicação e excelência com que o conduz.

A todos meus **Mestres Professores**, que tanto se dedicam ao ensino com excelência e disposição para transmitir todo o conhecimento necessário, não se limitando às teorias, mas permitindo que eu realmente vivesse a Odontologia, e em especial a Periodontia, em sua forma mais profunda e linda. Com certeza encerro mais esse etapa da minha vida com muito mais conhecimento e segurança graças ao alicerce adquirido nesta instituição. Muito obrigado.

Meu agradecimento à **Disciplina de Histologia e Embriologia**, representada pelos professores **Prof. Cláudio Aparecido Casatti**, **Prof. Dr. Edilson Ervolino**, **Prof.^a Dra. Alaíde Gonçalves** e **Prof.^a Dra. Mariza Akemi Matsumoto**, pela oportunidade de acompanhar as aulas e laboratórios. Obrigada.

Agradeço também à **Disciplina de Periodontia** do curso de graduação, representada pelos professores **Prof.^a Dra. Maria José Hitomi Nagata**, **Prof.^a Dra. Leticia Helena Theodoro**, **Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida**, pela oportunidade de acompanhar todas as aulas, laboratórios e clínicas da disciplina, me dando a oportunidade de aprimorar os conhecimentos. Muito Obrigada.

Ao **Departamento de Ciências Básicas**, professores, aos servidores técnicos administrativos, pelo apoio e possibilidade de execução de toda a parte experimental e laboratorial do presente trabalho, e da agradável convivência.

Ao **Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada** na pessoa do **chefe de departamento Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida**.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Valéria**, **Cristiane**, **Diogo** e **Lilian** pela eficiência, pelo excelente trabalho, atenção dispensada, grande disposição em atender e ótimo relacionamento.

A todos os funcionários da **Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP**, **Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti**, **Cláudio Hideo Matsumoto**, **Denise Haruyo Nakamura Maeda**, **Luís Cláudio Sedlacek**, **Maria Cláudia de**

Castro Benez, Ana Paula Rímoli de Oliveira e Luzia Anderlini pelo carinho, atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários do **Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Camilo e João Batista** que ofereceram suporte para a obtenção dos animais utilizados nesta pesquisa.

A todos os funcionários que estiveram presentes nesta etapa da minha vida! Aos que me ajudaram de alguma maneira a construir a minha história dentro desta Universidade durante a Pós-graduação.

Aos **alunos do Curso de Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, que pude acompanhar durante todo ano letivo, obrigado pelo respeito, credibilidade e confiança depositados a nós alunos da Pós-graduação.

Aos meus **pacientes**, pelo voto de confiança, deram-nos a oportunidade de aprender e tratá-los no decorrer deste curso.

Aos meus **animais experimentais** meu profundo respeito e agradecimentos por servir à humanidade com suas VIDAS!

Muito obrigada!

Epígrafe

*Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no
que você não conhece como eu mergulhei. Não
se preocupe em entender, viver ultrapassa
qualquer entendimento.*

Clarice Lispector

OLIVO, M. B. **Efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizando butil azul de toluidina e laser de baixa potência na prevenção da osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa.** 2021. 56 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a efetividade e a segurança do emprego de múltiplas sessões de aPDT, utilizando o butil azul de toluidina (BuAT) e a irradiação com laser de baixa potência (LBP), no sítio de extração dental de ratas com os principais fatores de risco para a ocorrência da osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M). Vinte e oito ratas senescentes foram distribuídas em quatro grupos experimentais: VEI, VEI-aPDT, ZOL e ZOL-aPDT. O protocolo de tratamento teve duração de 7 semanas. Um dia antes do início deste protocolo foi instalada uma ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo para indução da periodontite experimental (PE). Nos grupos VEI e VEI-aPDT, as ratas receberam injeções intraperitoneais de 0,45ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (veículo) a cada três dias. Nos grupos ZOL e ZOL-aPDT, as ratas receberam 0,45ml do veículo acrescido de 100µg/Kg do zoledronato a cada três dias. Após três semanas do início do protocolo de tratamento a ligadura foi removida e foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Nos grupos VEI e ZOL não foi efetuado nenhum tratamento local no sítio de extração dental. Nos grupos VEI-aPDT e ZOL-aPDT foram realizadas sessões de aPDT aos 0, 2, e 4 dias pós exodontia. Para a aPDT depositou-se sobre o sítio de extração dental 300µl de BuAT (concentração: 0,5mg/ml; tempo de pré-irradiação, 60s) em seguida foi realizada a irradiação com laser de baixa potência (laser: InGaAlP; 660nm; 35mW; 74,2J/cm²; 60s) emissor: InGaAlP; comprimento de onda: 660 nm, laser visível - vermelho; potência: 35 mW; densidade energética por ponto: 74,2 J/cm²; tempo de aplicação: 60s). Decorridos 28 dias pós-operatórios foi realizada a eutanásia. As hemimandíbulas foram devidamente processadas para assegurar que no sítio de extração dental fossem efetuadas: 1) análise clínica; 2) análise histológica da reparação tecidual; 3) análise histométrica da Porcentagem de Tecido Ósseo Neoformado (PTOnf); 4) análise histométrica da Porcentagem de Tecido Ósseo Não Vital (PTOnv) e; análise imunoistoquímica de células TRAP-positivas. Os dados foram submetidos à análise estatística com nível de significância

de 5%. Os grupos ZOL e ZOL-aPDT apresentaram menor quantidade de células TRAP-positivas quando comparados com os grupos VEI e VEI-aPDT. O grupo ZOL apresentou grande comprometimento do processo de reparação tecidual, condizentes com um quadro de ONM-M. Os grupos VEI, VEI-aPDT e ZOL-aPDT apresentaram um processo de reparação tecidual favorável do sítio de extração dental. No grupo ZOL a PTONf no sítio de extração dental se mostrou menor que nos grupos VEI, VEI-aPDT e ZOL-aPDT. No grupo ZOL a PTONv se mostrou maior que nos grupos VEI, VEI-aPDT e ZOL-aPDT. No grupo ZOL-aPDT a PTONv se apresentou maior que nos grupos VEI e VEI-aPDT. O emprego de múltiplas sessões de aPDT, utilizando o BuAT e LBP, no sítio de extração dental de ratas senescentes tratadas com alta dose de zoledronato se mostrou uma estratégia terapêutica segura e efetiva para evitar a ocorrência da ONM-M pós exodontia.

Palavras-chave: Difosfonatos. Osteonecrose. Maxilares. Prevenção. Terapia fotodinâmica.

OLIVO, M. B. **Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy using butyl toluidine blue and low-level laser in preventing the occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws.** 2021. 56 f. Dissertation (Master) - School of Dentistry, São Paulo State University (Unesp), Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effectiveness and safety of using multiple aPDT sessions, using butyl toluidine blue (BuTB) and low-level laser irradiation (LLL), at the dental extraction site of rats with the main risk factors for the occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). Twenty-eight senescent rats were distributed in four experimental groups: VEH, VEH-aPDT, ZOL and ZOL-aPDT. The treatment protocol lasted 7 weeks. One day before the beginning of this protocol, a cotton ligature was installed around the mandibular first molar left to induce experimental periodontitis (EP). In the VEH and VEH-aPDT groups, the rats received intraperitoneal injections of 0.45 ml of 0.9% sodium chloride solution (vehicle) every three days. In the ZOL and ZOL-aPDT groups, the rats received 0.45 ml of the vehicle plus 100 µg / Kg of zoledronate every three days. Three weeks after the beginning of the treatment protocol, the ligature was removed and extraction of the mandibular first molar left was performed. In the VEH and ZOL groups, no local treatment was performed at the tooth extraction site. In the VEH-aPDT and ZOL-aPDT groups, aPDT sessions were performed at 0, 2, and 4 days after extraction. For aPDT, 300µl of BuTB was deposited on the dental extraction site (0.5mg / ml; pre-irradiation time, 60s), followed by irradiation with low-level laser (laser: InGaAlP; 660nm; 35mW; 74.2J / cm²; 60s). After 28 postoperative days, euthanasia was performed. The hemimandibles were properly processed to ensure that at the tooth extraction site: 1) clinical analysis; 2) histological analysis of tissue repair; 3) histometric analysis of the Percentage of Neoformed Bone Tissue (PNFBT); 4) histometric analysis of the Percentage of Non-Vital Bone Tissue (PNVBT) and; immunohistochemical analysis of TRAP-positive cells. The data were submitted to statistical analysis with a 5% significance level. The ZOL and ZOL-aPDT groups showed less TRAP-positive cells when compared with the VEH and VEH-aPDT groups. The ZOL group showed great compromise in the tissue repair process, consistent with MRONJ. The groups VEH, VEH-aPDT and ZOL-aPDT presented a favorable tissue repair process at the dental extraction site. In the ZOL group, the PNFBT at the tooth extraction site was lower than in the VEH, VEH-aPDT

and ZOL-aPDT groups. In the ZOL group, PNVBT was higher than in the VEH, VEH-aPDT and ZOL-aPDT groups. In the ZOL-aPDT group, PNVBT was higher than in the VEH and VEH-aPDT groups. The use of multiple aPDT sessions, using BuTB and LLL, at the dental extraction site of senescent rats treated with a high dose of zoledronate proved to be a safe and effective therapeutic strategy to prevent the occurrence of MRONJ after tooth extraction.

Keywords: Bisphosphonates. Osteonecrosis. Jaws. Prevention. Photodynamic therapy

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Desenho experimental e principais procedimentos operatórios. **(a)** Linha do tempo mostrando os diferentes procedimentos executados em seus respectivos intervalos de tempo nos diferentes grupos experimentais. **(b)** Insolação da ligadura no primeiro molar inferior. **(c)** Ligadura em posição no primeiro molar inferior. **(d)** Aspecto clínico do primeiro molar inferior três semanas após a manutenção da ligadura. **(e)** Aspecto clínico do sítio de extração dental imediatamente após a exodontia. **(f)** Deposição do fotossensibilizador butil azul de toluidina sobre o sítio de extração dental. **(g)** Execução da aPDT no sítio de extração dental com sua a irradiação com laser de baixa potência após a tempo de permanência do fotossensibilizador sobre a área.

50

FIGURA 2 - Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. **(a)** Gráfico apresentando a porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTOnf) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais. Teste estatístico: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-aPDT; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL. **(b – e)** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo neoformado no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI **(b)**, VEI-aPDT **(c)**, ZOL **(d)**, ZOL-aPDT **(e)**. Abreviações e símbolos: ii, infiltrado inflamatório; to, tecido ósseo, tonv, tecido ósseo não vital; setas pretas, osteoclastos. Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm.

51

FIGURA 3 - Aspecto histológico das adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. **(a)** Gráfico apresentando a porcentagem de tecido ósseo não vital (PTOnv) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais. Teste estatístico: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao

grupo VEI-aPDT; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL. **(a – e)** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo situado nas adjacências e no interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI **(b)**, VEI-aPDT **(c)**, ZOL **(d)**, ZOL-aPDT **(e)**. Abreviações: ii, infiltrado inflamatório; to, tecido ósseo; tonv, tecido ósseo não vital; setas pretas, osteócitos; setas brancas, lacunas vazias ou com remanescentes celulares. Coloração: HE. Aumento original: 400x. Barras de escala: 50 µm.

52

FIGURA 4 - Imunomarcacão para TRAP no sítio de extração dental e adjacências aos 28 dias pós-operatórios. **(a)** Gráfico apresentando a quantidade de células TRAP-positivas por milímetro quadrado de tecido ósseo nos diferentes grupos experimentais. Teste estatístico: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-aPDT. **(b – e)** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico das células TRAP-positivas (osteoclastos) no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI **(b)**, VEI-aPDT **(c)**, ZOL **(d)**, ZOL-aPDT **(e)**. Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo; setas pretas: osteoclastos (células TRAP-positivas). Contra-coloração: hematoxilina. Aumento original: 100x. Barras de escala: 20 µm.

53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do nível de inflamação dos tecidos durante o processo de reparação pós-extração dental em VEI, VEI-aPDT, ZOL e ZOL-aPDT aos 28 dias pós-operatórios. 54

TABELA 2: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do padrão de estruturação tecidual durante o processo de reparação pós-extração dental em em VEI, VEI-aPDT, ZOL e ZOL-aPDT aos 28 dias pós-operatórios. 55

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

± - mais ou menos

°C - graus Celsius

< - menor

† - diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI

‡ - diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-aPDT

§ - diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL

µg/Kg - microgramas por quilograma

µg/ml - microgramas por mililitro

µl - microlitros

µm - micrômetros

¹O₂ - oxigênio singlete

AAOMS - Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial

aPDT - terapia fotodinâmica antimicrobiana

BFs - bisfosfonatos

BP – bisphosphonate

BuTB - butyl toluidine blue

BuAT - butil azul de toluidina

MRONJ – medication-related osteonecrosis of the jaws

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cm² - centímetros quadrados

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EP - experimental periodontitis

EUA - Estados Unidos da América

FOA - Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g - gramas

HE - hematoxilina-eosina

InGaAlP - Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo

J/cm² - Joules por centímetro quadrado

J/ponto - Joules por ponto

LBP - laser em baixa potência

LLL - low-level laser

mg/Kg - miligramas por quilograma

ml - mililitros

mm - milímetros

mW - miliWatts

PNFBT – percentage of newly formed bone tissue

nm - nanômetros

NVBT - non-vital bone tissue

ONM-M - osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa

PBS - tampão fosfato salino

PE - periodontite experimental

pH - potencial hidrogeniônico

PTOnf - porcentagem de tecido ósseo neoformado

PTOnv - porcentagem de tecido ósseo não vital

RANK-L – ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-β

TBO - fenotiazina azul de toluidina

TRAP – fosfatase ácida resistente ao tartarato

tc - tecido conjuntivo

to - tecido ósseo

ton - tecido ósseo não vital.

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

vs - vasos sanguíneos

x - vezes

W/cm² - Watts por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 OBJETIVO.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Delineamento experimental.....	31
3.1.1 Animais.....	31
3.1.2 Anestesia.....	31
3.1.3 PE induzida por ligadura	31
3.1.4 Protocolo medicamentoso	31
3.1.5 Grupos experimentais	32
3.1.6 Exodontia	32
3.1.7 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)	33
3.1.8 Obtenção das amostras	33
3.1.9 Processamento histológico das amostras	33
3.2 Análise dos resultados	34
3.2.1 Análise das condições gerais de saúde e exame clínico intrabucal	34
3.2.2 Análises microscópicas	35
3.2.2.1 Análise histológica do sítio de extração dental e adjacências	35
3.2.2.2 Análise histométrica da PTONF e da PTONV	35
3.2.2.3 Análise imunoistoquímica de TRAP no sítio de extração dental	35
3.2.3 Análise estatística	36
4.1 Condições gerais de saúde e exame clínico intrabucal.....	37
4.2 Reparo tecidual no sítio de extração dental e adjacências.....	37
4.3 PTOnf no sítio de extração dental	37
4.4 PTOnv no sítio de extração dental	38
4.5 Células TRAP-positivas no sítio de extração dental	38
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
FIGURAS	50
TABELAS	54
ANEXOS	56

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BFs) são medicamentos utilizados no tratamento de algumas osteopatias que desencadeiam osteopenia/osteoporose e lesões osteolíticas, assim como, na regulação de hipercalcemia, no controle da dor óssea e na contenção da progressão da metástase óssea em neoplasias malignas osteotrópicas¹⁻². Estes medicamentos exercem potente ação inibitória sobre o processo de reabsorção óssea³⁻⁵. Tais drogas, são análogas ao pirofosfato endógeno, e que possuem dois grupos de fosfatos ligados covalentemente a um carbono, onde estão ligadas a duas cadeias laterais, R1 que medeia a afinidade pelos cristais de hidroxiapatita, e R2 que é responsável pela sua potência e outras propriedades farmacológicas³⁻⁵. Dentre os BFs, o zoledronato é o que apresenta a maior potência relativa²⁻⁵.

Uma das reações adversas ocasionadas pela utilização dos BFs é a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M)⁶⁻⁸. Esta condição patológica é caracterizada pela presença de osso exposto na região maxilofacial, por um período de tempo maior do que oito semanas, em pacientes submetidos a tratamento prévio ou atual com droga antirreabsortiva ou anti-angiogênica e que não possuem história prévia de radioterapia nos maxilares⁶⁻⁸. Sua incidência é de cerca de 0.01% para pacientes que fazem uso de BFs orais, e cerca de 12%, para pacientes que fazem uso de BFs endovenosos⁹⁻¹⁰. Além disso, os BFs têm efeito cumulativo, e esta incidência pode atingir 21% dos pacientes após o terceiro ano de uso deste tipo de medicamento⁹⁻¹⁰. Estudos epidemiológicos mostraram que a ONM-M acomete com maior frequência mulheres com idade avançada. O zoledronato está associado com a maioria dos casos. Há uma predileção pela ocorrência na mandíbula, especificamente na região dos pré-molares e molares, e a extração dental é tida como um dos principais fatores desencadeadores da doença⁹⁻¹⁰.

A etiopatogenia da ONM-M é parcialmente compreendida, supostamente seja de natureza multifatorial. Dentre os supostos fatores etiopatogênicos estão: a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos, o que resultaria no acúmulo de microfraturas no tecido ósseo e, conseqüentemente, em áreas de tecido ósseo não vital, favorecendo o estabelecimento de infecção com subsequente aumento da necrose óssea; o potente efeito antiangiogênico, o que resultaria em

necrose avascular do tecido ósseo; o favorecimento à infecção induzido pelos BFs, os quais aumentariam a capacidade de adesão e colonização de bactérias ao tecido ósseo exposto; o efeito citotóxico destas drogas sobre várias linhagens de células, o que resultaria na diminuição da capacidade de reparo, tanto dos tecidos moles, quanto dos tecidos duros da região bucomaxilofacial e; a falta de resiliência na resposta imunológica local, o que comprometeria a resposta protetiva e a reparação tecidual, concomitantemente.¹¹⁻¹⁴

A presença da ONM-M compromete significativamente a qualidade de vida, além disso, pode haver a rápida progressão da doença com consequências devastadoras para o paciente.¹⁵⁻¹⁶ Seu tratamento pode ser extremamente longo, se mostrar falho e deixar graves sequelas.^{6, 18-20} A conduta clínica adotada para o tratamento tem se baseado no estadiamento da ONMM. Não há um protocolo padrão universalmente aceito, mas na maioria dos casos a terapia pode ser medicamentosa e/ou cirúrgica. A terapia medicamentosa consiste predominantemente no uso prolongado de agentes antimicrobianos.^{6, 18-20} A terapia cirúrgica vai da conservadora à agressiva e consiste desde curetagem e/ou sequestrotomia até ressecção parcial dos maxilares.^{6, 18-20} Todavia, a conduta clínica ideal seria aquela capaz de evitar o desencadeamento da ONMM, ou seja, os tratamentos preventivos. Atualmente, a conduta preventiva sugerida é a antibioticoterapia profilática, no entanto, estudos demonstram que ela pode ser falha.²¹⁻²³

A laserterapia tem sido amplamente empregada na área da saúde, em especial nas diversas especialidades odontológicas.²⁴ A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) não apresenta efeitos adversos e exerce efeitos positivos ao nível celular e tecidual, o que a coloca como uma potencial terapia para ONM-M.²⁵⁻³⁰ A aPDT consiste no emprego de luz com um comprimento de onda ressonante à banda de absorção de um fotoantimicrobiano (FA), o qual é pré-absorvido seletivamente por células microbianas, e que na presença do oxigênio é ativado e promove ação fototóxica. Sob irradiação apropriada, o FA muda de um nível de baixa energia (estado singleto fundamental, ^1FA) para um estado singleto de excitação com tempo de vida curta ($^1\text{FA}^*$), que pode ser convertido em um estado tripleto de excitação com tempo de vida longa ($^3\text{FA}^*$). Na presença de oxigênio o $^3\text{FA}^*$ pode gerar altos níveis de espécies reativas de oxigênio por dois mecanismos: via transferência de elétrons para formar predominantemente radicais superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (mecanismo tipo I) ou via transferência de energia para produzir oxigênio singleto

altamente reativo ($^1\text{O}_2$) (mecanismo tipo II). Estes altos níveis de espécies reativas de oxigênio gerados são altamente citotóxicos, sendo letais para as células microbianas que absorveram o FA.²⁵⁻³⁰ Além da ação antimicrobiana, estudos mostram que a aPDT, quando emprega como fonte de luz o laser de baixa potência (LBP), também apresenta efeitos fotobiomodulatórios, tais como, modulação da resposta inflamatória, da angiogênese, da proliferação, da migração, da diferenciação e da atividade celular, eventos essenciais para promover o processo de reparação tecidual.³¹⁻³³

Um dos fatores importantes que determinam a eficácia da aPDT é o fotoantimicrobiano, assim como sua dosagem e o tempo de sua permanência em contato com a região alvo.³⁴⁻³⁶ De maneira geral, um fotoantimicrobiano deve: proporcionar um alto rendimento quântico de $^1\text{O}_2$; ser fotoestável; ter um amplo espectro de ação antimicrobiana; expressar uma elevada afinidade de ligação para microrganismos e baixa afinidade de ligação e toxicidade para as células eucariontes normais; não apresentar ação mutagênica; ter baixa toxicidade; apresentar estreita janela terapêutica, ou seja, ter parâmetros de inativação fotodinâmica necessárias para que as bactérias sejam mortas de forma eficiente sem danos às células eucarióticas normais.³⁴⁻³⁶

Dentre os diversos fotoantimicrobiano, o azul de metileno e azul de toluidina, são os mais comumente usados. Ambos pertencem à família das fenotiazinas. Os dois fotoantimicrobiano apresentam estruturas químicas e propriedades físico-químicas similares. O aprimoramento de fotoantimicrobiano, via modificações físico-químicas em sua estrutura molecular, tem sido realizado com a finalidade de aumentar a sua eficiência. O butil azul de toluidina (BuAT) é um fotoantimicrobiano fenotiazínico gerado a partir de modificações físico-químicas do azul de toluidina.³⁶ Tais modificações foram capazes de melhorar os seus efeitos fotodinâmicos, dentre os quais estão, o aumento da capacidade lipofílica e a redução do comportamento de coagregação molecular, o que proporciona uma maior capacidade de interação celular e maior eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio.³⁶

Nuernberg *et al.* (2020)⁴³ realizaram o primeiro estudo *in vivo* utilizando aPDT empregando o BuAT associado ao LBP. Tais autores constataram que esta terapia se mostrou extremamente efetiva como tratamento adjuvante à raspagem e alisamento radicular da periodontite experimental. Nosso grupo de pesquisa foi o primeiro que propôs o uso da aDPT como estratégia preventiva para evitar a ONM-M pós

exodontia.³⁷ Foi constatado que a aPDT, empregando um fotoantimicrobiano tradicional, o azul de metileno, associado ao LBP, melhorou o processo de reparação tecidual e evitou a ocorrência de ONM-M. Uma vez que as modificações físico-químicas dos agentes antimicrobianos podem potencializar os seus efeitos fotodinâmicos, a aPDT, empregando o BuAT e LBP, pode aumentar ainda mais a efetividade desta terapia como uma estratégia preventiva para evitar a ocorrência da ONM-M.

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a efetividade e a segurança do emprego de múltiplas sessões de aPDT, utilizando um novo agente fotoantimicrobiano, o butil azul de toluidina (BuAT), associado à irradiação com laser de baixa potência (LBP), no sítio de extração dental de ratas com os principais fatores de risco para a ocorrência da ONM-M.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

3.1.1 Animais

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

3.1.2 Anestesia

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

3.1.3 PE induzida por ligadura

Um dia antes do início do tratamento medicamentoso, foi instalada uma ligadura de algodão (fio de algodão #24; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo (**FIGURA 1**) de todos os animais, a qual foi mantida por três semanas, com intuito de promover o acúmulo de biofilme e, consequentemente, a indução da PE.^{37, 40-41}

3.1.4 Protocolo de tratamento

O protocolo de tratamento teve duração de sete semanas (**FIGURA 1**). A administração de veículo ou zoledronato (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) foi realizada a cada três dias pela via intraperitoneal. O veículo consistiu de 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%. A dose de zoledronato foi de 100µg/Kg, a qual foi

diluída em 0,45 ml de veículo. A dose de zoledronato e plano de tratamento consistiram em uma adaptação, para o rato, do protocolo empregado para complementação da terapia oncológica em humanos.^{37, 40-42}

3.1.5 Grupos experimentais

Após a instalação da ligadura, os animais iniciaram o tratamento com veículo ou zoledronato e foram divididos em quatro grupos experimentais, cada um composto por 7 animais:

Grupo VEI: receberam injeção intraperitoneal de 0,45 ml de veículo a cada três dias, durante sete semanas. Na terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e, decorridos 28 dias pós-operatórios, foram submetidos à eutanásia (**FIGURA 1**).

Grupo VEI-aPDT: receberam injeção intraperitoneal de 0,45 ml de veículo a cada três dias, durante sete semanas. Na terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Aos 0, 2, 4 dias pós-operatórios foi realizada a aPDT no sítio de extração dental. A eutanásia foi realizada 28 dias após a exodontia (**FIGURA 1**).

Grupo ZOL: receberam injeção intraperitoneal de 0,45 ml de zoledronato a cada três dias, durante sete semanas. Na terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e, decorridos 28 dias pós-operatórios, foram submetidos à eutanásia (**FIGURA 1**).

Grupo ZOL/aPDT: receberam injeção intraperitoneal de 0,45 ml de zoledronato a cada três dias, durante sete semanas. Na terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Aos 0, 2, 4 dias pós-operatórios foi realizada a aPDT no sítio de extração dental. A eutanásia foi realizada 28 dias após a exodontia (**FIGURA 1**).

3.1.6 Exodontia

Para exodontia do primeiro molar inferior os animais foram posicionados adequadamente em mesa cirúrgica. Foi executada a antisepsia da cavidade bucal,

sindesmotomia, luxação e extração do primeiro molar inferior esquerdo com a utilização de instrumentais odontológicos adaptados (**FIGURA 1**).^{37, 40-41}

3.1.7 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

Foi utilizado como agente fotoantimicrobiano o butil azul de toluidina na concentração 0,5 mg/ml. Depositou-se 500 µL do fotoantimicrobiano sobre o sítio de extração do primeiro molar inferior esquerdo (**FIGURA 1**) por sessenta segundos, e na sequência, a ponteira laser foi posicionada no centro do sítio de extração, paralelamente ao longo eixo do alvéolo dental (**FIGURA 1**). O laser de baixa potência empregado no presente estudo foi o Thera Lase® (D.M.C. Equipamentos Ltda®, SP, Brasil) com os seguintes parâmetros: emissor: InGaAlP; comprimento de onda: 660 nm (laser visível - vermelho); potência: 35 mW; modo de operação: laser contínuo; diâmetro do spot: 0,0283 cm²; modo de aplicação: laser contato, pontual; energia: 2,1 J/ponto; tempo de aplicação: 60 segundos; quantidade de pontos de aplicação: 1; densidade energética por ponto: 74,2 J/cm²; irradiância: 1,23 W/cm².^{37, 40-41}

3.1.8 Obtenção das amostras

Aos 28 dias pós cirúrgicos, os animais foram profundamente anestesiados e foi realizada a eutanásia através da perfusão transcardíaca com 100 ml de solução salina fisiológica acrescida de 0,1% de heparina e, em seguida, 800 ml de formaldeído 4% (Sigma Chemical®, Saint Louis, MO, EUA) em tampão fosfato salino (PBS - Sigma Chemical®), 0,1M, 4°C, pH 7,4. As hemimandíbulas esquerdas foram dissecadas e submetidas à pós-fixação por 72 horas.^{37, 40-41}

3.1.9 Processamento histológico das amostras

As amostras foram desmineralizadas em 10% de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Sigma Chemical®) em PBS, por um período de 60 dias, e submetidas ao processamento histológico convencional, com inclusão em parafina. A microtomia foi executada de lingual para vestibular, e foram coletadas as secções histológicas da porção do alvéolo dental anteriormente ocupada pelas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior esquerdo e adjacências.

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

Para a análise imunoistoquímica para detecção de TRAP os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram incubadas com o anticorpo primário anti-TRAP do rato gerado em cabra (SC-30833, Santa Cruz Biotechnology®). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foram realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). Foi realizada a contracoloração com *Hematoxilina de Harris*, e em seguida a desidratação em etanol, diafanização em xilol e, recobrimento com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, USA) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

3.2 Análise dos resultados

3.2.1 Análise das condições gerais de saúde e exame clínico intrabucal

Foi verificada a condição geral de saúde dos animais durante todo o período experimental e o peso corporal foi monitorado semanalmente. Foi realizado o

exame clínico intrabucal, que consistiu na inspeção visual minuciosa da cavidade bucal, em especial, do sítio de extração dental.^{37, 40-41}

3.2.2 Análises microscópicas

Para as análises histopatológica e histométrica foram utilizadas três secções histológicas situadas na porção vestibular, média e lingual do alvéolo dental. A região de interesse consistiu-se de uma área de 4 mm x 4 mm que englobava a porção do alvéolo anteriormente ocupado pela raiz mesial e pela raiz distal do primeiro molar inferior esquerdo e suas adjacências. O seu limite distal consistiu de uma linha situada paralelamente a superfície da dentina coronária e radicular do segundo molar inferior esquerdo, a partir da qual se estendia para a mesial por 4 mm. O seu limite coronário consistiu de uma linha situada paralelamente ao limite amelo-cementário do segundo molar inferior esquerdo, a partir da qual se estendia para apical por 4 mm.^{37, 40-41} As análises microscópicas foram efetuadas por um histologista certificado, previamente calibrado e cego aos tratamentos.

3.2.2.1 Análise histológica do sítio de extração dental e adjacências

Os parâmetros avaliados, através de microscopia óptica, na região de interesse, foram os seguintes: 1) intensidade da resposta inflamatória local; 2) extensão do processo inflamatório; 3) padrão de celularidade e de estruturação do tecido epitelial; 4) padrão de celularidade e de estruturação do tecido conjuntivo; 5) padrão de celularidade e de estruturação do tecido ósseo.^{37, 40-41}

3.2.2.2 Análise histométrica da PTOnf e da PTOnv

Na região de interesse foram capturadas as imagens utilizando-se câmera digital (AxioCam®, Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (AxioLab®) e conectada a um microcomputador. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Axiovision 4.8.2®, Carl Zeiss), foi mensurada a quantidade total de tecido ósseo, e, em seguida, foi calculada a PTOnf e a PTOnv.^{37, 40-41} A PTOnv consistiu das regiões onde mais de dez lacunas adjacentes se apresentavam vazias ou contendo restos necróticos de osteócitos.

3.2.2.3 Análise imunoistoquímica de TRAP no sítio de extração dental

Foram capturadas as imagens das amostras submetidas à detecção imunoistoquímica de TRAP com descrito anteriormente. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Axiovision 4.8.2®, Carl Zeiss), foram quantificadas as células TRAP-positivas por mm² de tecido ósseo.^{37, 40-41}

3.2.3 Análise estatística

Empregou-se o programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brasil). Para a análise histopatológica foram empregados os testes de Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. Para a análise histométrica da PTONf e PTONv e para a análise imunoistoquímica de TRAP foram empregados os testes de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey.

4 RESULTADOS

4.1 Condições gerais de saúde e exame clínico intrabucal

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

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

4.2 Reparo tecidual no sítio de extração dental e adjacências

O grupo ZOL apresentou um grande comprometimento do processo de reparação tecidual, apresentando características histológicas condizentes com um quadro de ONM-M. Os grupos VEI, VEI-aPDT e ZOL-aPDT apresentaram um processo de reparação tecidual mais favorável do sítio de extração dental e mucosa sobrejacente. Os parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do nível de inflamação dos tecidos e do padrão de estruturação dos tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo estão apresentados na **TABELA 1** e na **TABELA 2**, respectivamente. O aspecto histológico do sítio de extração dental e suas adjacências em VEI, VEI-aPDT, ZOL e ZOL-aPDT aos 28 dias pós-operatórios, estão evidenciados nas **FIGURA 2** e **FIGURA 3**.

4.3 PTONf no sítio de extração dental

Em ZOL a PTONf se mostrou significativamente menor que em VEI ($p<0,01$), VEI-aPDT ($p<0,01$) e ZOL-aPDT ($p<0,01$). Não houve diferença

estatisticamente significante na PTONf entre VEI e VEI-aPDT. A PTONf foi significativamente maior em VEI-aPDT quando comparado com VEI ($p<0,05$) e ZOL-aPDT ($p<0,01$) (**FIGURA 2**).

4.4 PTONv no sítio de extração dental

Em ZOL a PTONv se mostrou significativamente maior que em VEI ($p<0,01$), VEI-aPDT ($p<0,01$) e ZOL-aPDT ($p<0,01$). Não houve diferença estatisticamente significante na PTONv entre VEI e VEI-aPDT. A PTONv foi significativamente maior em ZOL-aPDT quando comparado com VEI ($p<0,01$) e VEI-aPDT ($p<0,01$) (**FIGURA 3**).

4.5 Células TRAP-positivas no sítio de extração dental

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de TRAP mostrou alta especificidade em sua detecção, o que foi comprovado pela ausência total de marcação no controle negativo da reação imunoistoquímica. As células imunorreativas apresentaram uma coloração acastanhada confinada exclusivamente ao compartimento citossólico de osteoclastos (**FIGURA 4**).

A quantidade de células TRAP-positivas nos grupos tratados com zoledronato, ZOL e ZOL-aPDT, foi significativamente menor que nos grupos tratados com o veículo VEI ($p<0,01$ em comparação com ZOL e ZOL-aPDT) e VEI-aPDT ($p<0,01$ em comparação com ZOL e ZOL-aPDT) (**FIGURA 4**).

5 DISCUSSÃO

A ONM-M é uma condição patológica que se constitui em um efeito adverso ocasionado pelo uso de alguns medicamentos com ação antirreabsortiva e/ou antiangiogênica.⁶⁻⁸ Trata-se de uma condição patológica cujo tratamento, tanto preventivo quanto curativo, é um enorme desafio para a odontologia.^{6,18-20} Dentre as estratégias de prevenção da ONM-M destaca-se, por se constituir na conduta clínica padrão, a antibioticoterapia prolongada, todavia, esta pode se mostrar falha.²¹⁻²³ O presente estudo teve como objetivo avaliar a efetividade e a segurança do emprego de múltiplas sessões de aPDT, utilizando um novo agente fotoantimicrobiano, o BuAT, associado à irradiação com LBP, no sítio de extração dental de ratas com os principais fatores de risco para a ONM-M. A aPDT utilizando o BuAT associado à irradiação com LBP no sítio de extração dental de ratas senescentes tratadas com alta dose de zoledronato se mostrou uma estratégia terapêutica segura e efetiva para prevenir o desencadeamento da ONM-M pós-exodontia.

Os modelos experimentais em animais de ONM-M têm contribuído significativamente para auxiliar na compreensão de sua etiopatogenia e na proposição e avaliação de estratégias de tratamento preventivo e/ou curativo. Os estudos em humanos acerca da etiopatogenia da ONM-M apresentam limitações, o que faz com que os modelos experimentais animais adequados sejam de grande importância. Nestes modelos animais se consegue propor e avaliar a efetividade e a segurança de estratégias de tratamento, o que é fundamental para o direcionamento dos estudos clínicos. Neste estudo foi empregado um modelo experimental animal de ONM-M estabelecido e minuciosamente caracterizado por nosso grupo de pesquisa.^{37,40-41} O principal diferencial deste modelo experimental é que ele foi delineado baseando-se nos estudos epidemiológicos que apontaram os principais fatores de risco para a ocorrência da ONM-M humanos.⁹⁻¹⁰ O emprego de ratas senescentes (20 meses de idade) se baseia na alta frequência com que a ONM-M acomete mulheres com idade avançada.⁹⁻¹⁰ O uso de alta dose de um potente bisfosfonato, o zoledronato, levou em consideração que a maioria dos casos de ONM-M ocorre quando este medicamento é empregado para complementação da terapia antineoplásica de tumores osteotrópicos, ou seja, para evitar, principalmente a progressão de metástase óssea de cânceres de mama, pulmão e rim.⁹⁻¹⁰ Além disso, o presente estudo mimetizou

uma condição clínica local desfavorável capaz de elevar consideravelmente as chances do desencadeamento da ONM-M. Estudos clínicos apontam a exodontia como um dos principais fatores de risco local, especialmente quando associada ao dente há uma condição de natureza infecciosa/inflamatória, tais como um comprometimento periodontal e/ou periapical.⁹⁻¹⁰ Em sendo assim, inicialmente foi instalada uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior, para a indução da periodontite experimental, em seguida, foi efetuada a exodontia deste dente. Com o modelo experimental empregado no presente estudo constatamos um quadro histológico condizente com a ONM-M no grupo ZOL, ou seja, comprometimento severo da reparação tecidual, intensa inflamação tecidual, presença de biofilme associado aos tecidos, reduzida PTONf e elevada PTONv, corroborando estudos anteriores.^{37,40-41}

O zoledronato é um potente medicamento antirreabsortivo capaz de inibir o processo de reabsorção óssea atuando nos osteoclastos através da inibição da via do mevalonato, especificamente da enzima farnesil difosfato sintase.³⁻⁵ Nos osteoclastos a inibição desta via compromete sua migração através dos tecidos, impossibilita seu acoplamento adequado com a matriz óssea, impede a correta formação da zona clara e da zona pregueada no polo voltado para a lacuna de reabsorção, bloqueia o adequado tráfego e a exocitose de vesículas osteoclásticas essenciais para o processo reabsortivo, além disso, é capaz de promover a ativação de vias de sinalização que resultam na apoptose prematura destas células.³⁻⁵ No presente estudo os grupos tratados com zoledronato, ZOL e ZOL-aPDT, apresentaram uma quantidade significativamente menor de células TRAP-positivas, ou seja, de osteoclastos, o que comprova a efetividade do tratamento com o medicamento antirreabsortivo. Além disso, tanto a análise histológica quanto a análise imunoistoquímica evidenciaram que as células TRAP-positivas presentes nestes grupos no sítio de extração dental e em suas adjacências se apresentavam como grande células arredondadas, hipernucleadas, com ausência de polarização e distantes da matriz óssea, ou seja, apresentando características morfológicas de osteoclastos que não estão em atividade. Tais achados estão de acordo com estudos que mostram uma significativa redução de osteoclastos no sítio de extração dental.^{37,40-41}

No presente estudo foi utilizado na aPDT um novo agente fotoantimicrobiano fenotiazínico, o BuAT, seguido da irradiação com LBP. Dentre os

mais populares membros da classe de fotoantimicrobianos estão o azul de metileno e o azul de toluidina.³⁴⁻³⁶ A natureza catiônica destes fotoantimicrobianos permitem que eles sejam capazes de interagir tanto com bactérias Gram-positivas quanto com bactérias Gram-negativas, e até mesmo com outros tipos microrganismos, tais como fungos e vírus, ou seja, apresentam um amplo espectro de ação, o que permite que sejam efetivos no controle de infecções em diversos locais.³⁴⁻³⁶ O BuAT foi desenvolvido através de modificações físico-químicas na estrutura do azul de toluidina.³⁶ Tais modificações foram efetuadas com o propósito de melhorar ainda mais os seus efeitos fotodinâmicos, dentre os quais estão, o aumento da capacidade lipofílica e a redução do comportamento de coagregação molecular, o que resulta em maior capacidade de interação celular e maior eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio.³⁶

Nuernberg *et al.*⁴³ realizaram o primeiro estudo *in vivo* em animais onde a periodontite experimental foi tratada com raspagem e alisamento radicular em associação com a aPDT, empregando diferentes concentrações de BuAT, seguida da irradiação com LBP. Este estudo evidenciou que a aPDT, empregando o BuAT e LBP, se mostrou um tratamento coadjuvante da periodontite experimental extremamente efetivo, especialmente quando o BuAT foi utilizado na concentração de 0,5mg/ml.⁵⁰ Utilizando esta concentração de BuAT seguida da irradiação com o LBP tais autores constataram redução da perda óssea alveolar, modulação da inflamação local e favorecimento do processo de reparo tecidual.⁴³ Foi baseado em tal estudo que empregamos o BuAT na concentração de 0,5mg/ml na aPDT, e os efeitos positivos do presente estudo foram similares aqueles obtidos por Nuernberg *et al.*,⁴³ especialmente no que se refere a modulação da inflamação local e favorecimento do processo de reparação tecidual, como observado nos grupos VEI-aPDT e ZOL-aPDT.

No presente estudo foi constatado que o emprego da aPDT, empregando como agente fotoantimicrobiano, o BuAT seguido da irradiação com LBP se mostrou uma terapia preventiva efetiva e segura para evitar a ocorrência de ONM-M pós-exodontia, como observado no grupo ZOL-aPDT. Este tratamento preventivo foi capaz de promover a regeneração epitelial, modular a resposta inflamatória local, melhorar a reparação do tecido conjuntivo e estimular a neoformação óssea alveolar. Além disso, provocou uma redução significativa na PTONv no sítio de extração dental e em suas adjacências, uma característica histológica comumente observada no tecido ósseo ao se empregar medicamentos com potente ação antirreabsortiva.^{37,40-41}

Os achados do presente estudo corroboram um estudo prévio utilizando as mesmas condições e modelo experimentais, no entanto, empregando um outro agente fotoantimicrobiano fenotiazínico na aPDT. Ervolino *et al.*³⁷ avaliaram a ação preventiva da aPDT no sítio de extração dental. O estudo empregou como agente fotoantimicrobiano o azul de metileno, na concentração de 100 µg/ml e tempo de pré-irradiação de 60 segundos, seguido da irradiação com LBP (emissor: InGaAlP; comprimento de onda: 660 nm, laser visível - vermelho; potência: 35 mW; densidade energética por ponto: 74,2 J/cm²) aplicado por 60 segundo no centro da ferida cirúrgica com uma ponteira de 0,0283 cm² aos 0, 2 e 4 dias pós exodontia. O referido estudo mostrou que a aPDT melhorou significativamente o processo de reparo alveolar e evitou a ocorrência da ONM-M. A utilização de estratégias que visam o aprimoramento dos agentes fotoantimicrobianos é de suma importância, tendo em vista que com isso se pode potencializar os efeitos benéficos da aPDT, o que foi constatado no presente estudo, onde alguns dos parâmetros avaliados resultaram em efeitos ainda mais positivos que aqueles reportados por Ervolino *et al.*³⁷

O presente estudo é de grande importância pois pode direcionar estudos clínicos e, como mencionado anteriormente, potencializar os efeitos da aPDT quando empregada como estratégia terapêutica preventiva para a ONM-M. Recentemente o emprego da aPDT tem começado a se tornar uma realizada na clínica odontológica para prevenir a ONM-M.^{39,44-45} Nosso grupo de pesquisa obteve resultados positivos com o uso da aPDT, tanto como terapia preventiva para evitar a ocorrência de ONM-M, quanto como terapia adjuvante aos tratamentos convencionais.³⁹ Nos casos clínicos onde a aPDT foi utilizado para evitar a ocorrência da ONM-M empregou-se como agente fotoantimicrobiano o azul de metileno, na concentração de 10 mg/ml e tempo de pré-irradiação de 60 segundos, seguido da irradiação com LBP (emissor: InGaAlP; comprimento de onda: 660 nm, laser visível - vermelho; potência: 40 mW; energia: 3,92 J) aplicado por 60 segundo no centro da ferida cirúrgica com uma ponteira de 0,0283 cm² imediatamente após a exodontia. Concluiu-se que a aPDT favoreceu o processo de reparo alveolar e evitou a ocorrência da ONM-M.³⁹

Outros estudos em humanos reportaram uma série de casos clínicos onde a aPDT foi empregada preventivamente após a extração dental, ou a remoção de implantes, em pacientes que faziam uso de bisfosfonato de uso oral na dose osteoporótica. Os estudos empregaram como agente fotoantimicrobiano o cloreto de metilenotionina (10 mg/ml) e tempo de pré-irradiação de 180 segundos, seguida da

irradiação local com LBP (660 nm, 100 mW) empregando uma sonda que, com movimentos circulares, permanecia irradiando uma área de cerca de 3cm² durante 60s com uma fluência de 3,6 J/cm², e cuja densidade energética total variou de acordo com a dimensão da ferida cirúrgica. Após a aPDT os pacientes foram submetidos semanalmente a sessões de fotobiomodulação empregando o LBP durante seis semanas. Ao longo de todo o período avaliado não foi observada nenhuma alteração nas feridas cirúrgicas. Nestes estudos concluiu-se que a aPDT é uma promissora estratégia de prevenção para evitar a ocorrência de ONM-M em pacientes sob tratamento de osteoporose com bisfosfonatos e submetidos à extração dental ou remoção de implantes.⁴⁴⁻⁴⁵

Além da importância dos agentes fotoantimicrobianos na aPDT, um outro componente de grande importância neste tipo de tratamento é a luz utilizada para promover os efeitos fotodinâmicos. No presente estudo, em VEI-aPDT e ZOL-aPDT, o BuAT foi ativado por um laser visível – vermelho com emissor de InGaAlP, com um comprimento de onda na faixa de 660 nm, uma potência de 35 mW, uma densidade energética por ponto de 74,2 J/cm², o qual foi aplicado por 60 segundo no centro da ferida cirúrgica com uma ponteira de 0,0283 cm² aos 0, 2 e 4 dias pós exodontia. Tais parâmetros, além de assegurarem a ativação do agente fotoantimicrobiano, ainda mantem os efeitos bioestimulatórios do LBP. Dentre tais efeitos estão a capacidade de estimular a reparação de tecidos moles e tecidos duros via modulação da resposta inflamatória local, incremento da proliferação celular, estimulação da síntese de elementos da matriz extracelular e aumento da neovascularização.³¹⁻³³

Statikievicz *et al.*⁴¹ em um estudo utilizando as mesmas condições e modelo experimentais, todavia, utilizaram exclusivamente o LBP, ou seja, sem o uso de agente fotoantimicrobiano, e exatamente com os mesmos parâmetros empregados no presente estudo, reportaram efeitos positivos importantes no processo de reparo alveolar de ratas senescentes tratadas com alta dose de zoledronato.⁴¹ Ao se estabelecer uma comparação entre os dois protocolos pode-se constatar que os efeitos positivos obtidos no presente estudo são muito mais significativos. Diante disso, conclui-se que o controle da atividade microbiana local associado aos efeitos bioestimulatórios se constituem em um tratamento preventivo ainda mais efetivo.

Tais achados demostram que cada um dos componentes da aPDT, agente fotoantimicrobino (englobando várias variáveis, tais como, classe do

fotoantimicrobiano, concentração, propriedades físico-químicas, tempo de pré-irradiação) e a luz (englobando várias variáveis, como o tipo e luz e todos os parâmetros empregados), assim como o estabelecimento do protocolo da aPDT (englobando uma adequada indicação do tratamento, o momento de sua execução, o número de sessões, o treinamento do operador, dentre outros) são de grande importância para o sucesso desta técnica, inclusive podem definir até mesmo o seu insucesso. Sendo assim, o constante aprimoramento de cada um dos elementos e que compõem esta técnica e de seus protocolos, que tendem a serem cada vez mais individualizados, são capazes de potencializar significativamente seus efeitos benéficos, o que foi comprovado no presente estudo.

A ocorrência da ONM-M tem um impacto negativo considerável na qualidade de vida dos pacientes, especialmente quando ocorre concomitantemente com o tratamento de doenças graves, como o câncer.¹⁵⁻¹⁶ O tratamento da ONM-M, embora necessário e improtelável, também afetam negativamente tais pacientes durante um determinado período^{6, 18-20}, em especial aqueles sob terapia oncológica, tendo em vista que é invasivo, prolongado, de prognóstico duvidoso e pode resultar em graves sequelas. As estratégias terapêuticas preventivas são as ideais em se tratando da ONM-M, especialmente tratamentos como a aPDT, que não possuem efeito adverso. Os achados do presente estudo, guardando as limitações que são inerentes de um estudo em animais, reforçam ainda mais que a aPDT se constitui em uma estratégia efetiva de prevenção da ONM-M, inclusive comprova que ainda podemos potencializar seus efeitos positivos. Além disso, é mais um estudo que visa nortear futuras pesquisas clínicas envolvendo a prevenção da ONM-M via emprego da aPDT. Estudos clínicos controlados e randomizados visando o estabelecimento de protocolos preventivos para serem empregados em pacientes que fizeram ou fazem uso de drogas com ação antirreabsortiva e que necessitam de intervenções odontológicas invasivas ainda não foram realizados e são extremamente necessários. A ação antimicrobiana, o potente efeito bioestimulatório, a ausência de efeitos adversos, a não promoção de resistência bacteriana, o baixo custo e a fácil execução²⁵⁻³⁰, colocam a aPDT como uma das estratégias preventivas muito promissora para se evitar a ONM-M pós-exodontia.

6 CONCLUSÃO

Dentro dos limites e das condições empregadas no presente estudo, conclui-se que o emprego de múltiplas sessões de aPDT, utilizando um novo agente antimicrobiano, o BuAT, seguido da irradiação com LBP, no sítio de extração dental de ratas senescentes tratadas com alta dose de zoledronato se mostrou uma estratégia terapêutica segura e efetiva para evitar a ocorrência da ONM-M pós-exodontia.

O emprego da aPDT, utilizando como agente fotoantimicrobiano, o BuAT, em associação com a irradiação do LBP se mostrou uma terapia preventiva capaz de: promover a regeneração epitelial, melhorar a reparação do tecido conjuntivo, estimular a neoformação do osso alveolar e modular a resposta inflamatória local, evitando desta forma a ocorrência da ONM-M pós-exodontia.

REFERÊNCIAS

1. VANNALA, V.; PALAIAN, S.; SHANKAR, P. R. Therapeutic Dimensions of Bisphosphonates: A Clinical Update. **Int J Prev Med.**, v. 11, p. 166, 2020.
2. ORYAN, A.; SAHVIEH, S. Effects of bisphosphonates on osteoporosis: Focus on zoledronate. **Life Sci.**, v. 264, p. 118681, 2021.
3. 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.
4. ROGERS, M. J. *et al.* Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 34-41, 2011.
5. 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.
6. RUGGIERO, S. L. *et al.* American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 72, n. 10, p. 1938-1956, 2014.
7. 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.
8. 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.
9. MCGOWAN, K. *et al.* Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. **Oral Dis.**, v. 24, n. 4, p. 527-536, 2018.
10. 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.
11. KUROSHIMA, S. *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaw: a literature review. **J. Oral Biosci.**, v. 61, n. 2, p. 99-104, 2019.
12. 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.
13. 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.
14. ALLEN, M. R.; BURR, D. B. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 67, n. 5 Suppl, p. 61-70, 2009.

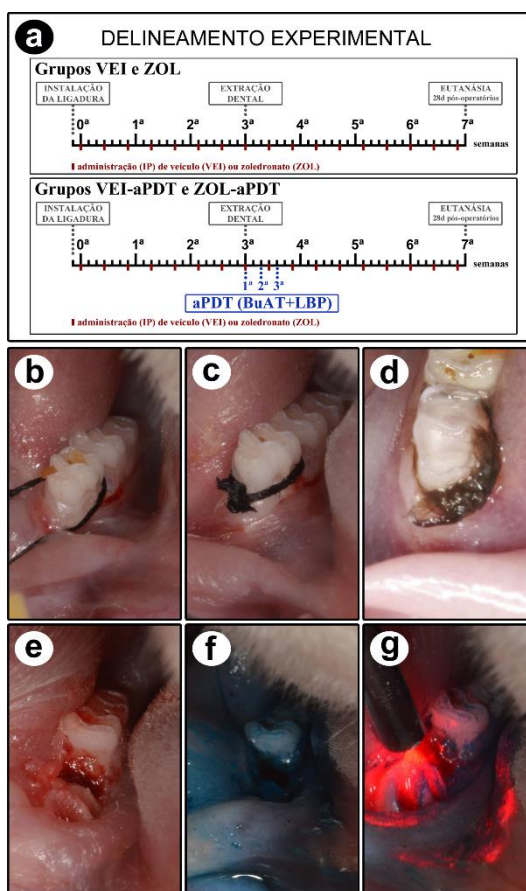
-
15. CAMINHA, R. D. *et al.* The impact of medication-related osteonecrosis of the jaws on the quality of life in cancer patients. **J Clin Exp Dent.**, v. 12, n. 8, p. e725-e729, 2020.
16. TENORE, G. *et al.* Does Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw Influence the Quality of Life of Cancer Patients? **Biomedicines**, v. 8, n. 4, p. 95, 2020.
17. OTERI, G. *et al.* Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw and its Impact on a Patient's Quality of Life: A Single-Center, 10-Year Experience from Southern Italy. **Drug Saf.**, v. 41, n. 1, p. 111-123, 2018.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. HOEFERT, S.; EUFINGER, H. Relevance of a prolonged preoperative antibiotic regime in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 69, n. 2, p. 362-380, 2011.
22. LÓPEZ-JORNET, P. *et al.* Perioperative antibiotic regimen in rats treated with pamidronate plus dexamethasone and subjected to dental extraction: a study of the changes in the jaws. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 69, n. 10, p. 2488-2493, 2011.
23. LITTLE, J. W. *et al.* Antibiotic prophylaxis in dentistry: an update. **Gen. Dent.**, v. 56, n. 1, p. 20-28, 2008.
54. CARRERA, E. T. *et al.* The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. **Laser Phys.**, v. 26, n. 12, p. 123001, 2016.
25. WAINWRIGHT, M. Princípios básicos da Terapia Fotodinâmica na infecção. In: Garcia, V. G.; Theodoro, L. H. **Lasers na Odontologia: uma visão clínica baseada em evidências científicas**. 1ed. São Paulo: Santos Publicações, v. 1, p. 221-30, 2021.
26. WAINWRIGHT, M. Photoantimicrobials and PACT: what's in an abbreviation? **Photochem Photobiol Sci.**, v. 18, n. 1, p. 12-14, 2019.
27. MAHMOUDI, H. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Bacterial Infections. **J Lasers Med Sci.**, v. 9, n. 3, p. 154-160, 2018.

28. CIEPLIK, F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. **Crit Rev Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018.
29. HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 33, p. 67-73, 2016.
30. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.
31. HAMBLIN, M. R. Princípios da fotobiomodulação e seus mecanismos envolvidos. In: Garcia, V. G.; Theodoro, L. H. **Lasers na Odontologia: uma visão clínica baseada em evidências científicas**. 1ed. São Paulo: Santos Publicações, v. 1, p. 27-66, 2021.
32. GARCIA, V. G. *et al.* Lasers de Baixa Potência na Reparação da Pele, Mucosa e Osso. In: Garcia, V. G.; Theodoro, L. H. **Lasers na Odontologia: uma visão clínica baseada em evidências científicas**. 1ed. São Paulo: Santos Publicações, v. 1, p. 97-113, 2021.
33. DOMPE, C. *et al.* Photobiomodulation-Underlying Mechanism and Clinical Applications. **J Clin Med.**, v. 9, n. 6, p. 1724, 2020.
34. KLAUSEN, M.; UCUNCU, M.; BRADLEY, M. Design of Photosensitizing Agents for Targeted Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Molecules.**, v. 25, n. 22, p. 5239, 2020.
35. GHORBANI, J. *et al.* Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. **Laser Ther.**, v. 27, n. 4, p. 293-302, 2018.
36. WAINWRIGHT, M.; O'KANE, C.; RAWTHORE, S. Phenothiazinium photosensitisers XI. Improved toluidine blue photoantimicrobials. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 160, p. 68-71, 2016.
37. 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.
38. SARKARAT, F. *et al.* Efficacy of Photodynamic Therapy in Minimizing Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws After Dental Extraction: A Preliminary Animal Study. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 77, n. 2, p. 307-314. 2019.
39. ERVOLINO, E. *et al.* Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana Aplicada às Condições Patológicas Ósseas com Envolvimento de Infecção. In: Garcia, V. G.; Theodoro, L. H. **Lasers na Odontologia: uma visão clínica baseada em evidências científicas**. 1ed. São Paulo: Santos Publicações, v. 1, p. 273-286, 2021.
40. 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.

-
41. 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.
42. 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.
43. NUERNBERG, M. A. A. *et al.* Effects of butyl toluidine blue photosensitizer on antimicrobial photodynamic therapy for experimental periodontitis treatment in rats. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 31, p. 101868, 2020.
44. POLI, P. P.; SOUZA, F.; MAIORANA, C. Adjunctive use of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaws: a case report. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 23, p. 99-101, 2018.
45. POLI, P. P. *et al.* Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in the prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw following dentoalveolar surgery: a case series. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 27, p. 117-123, 2019.

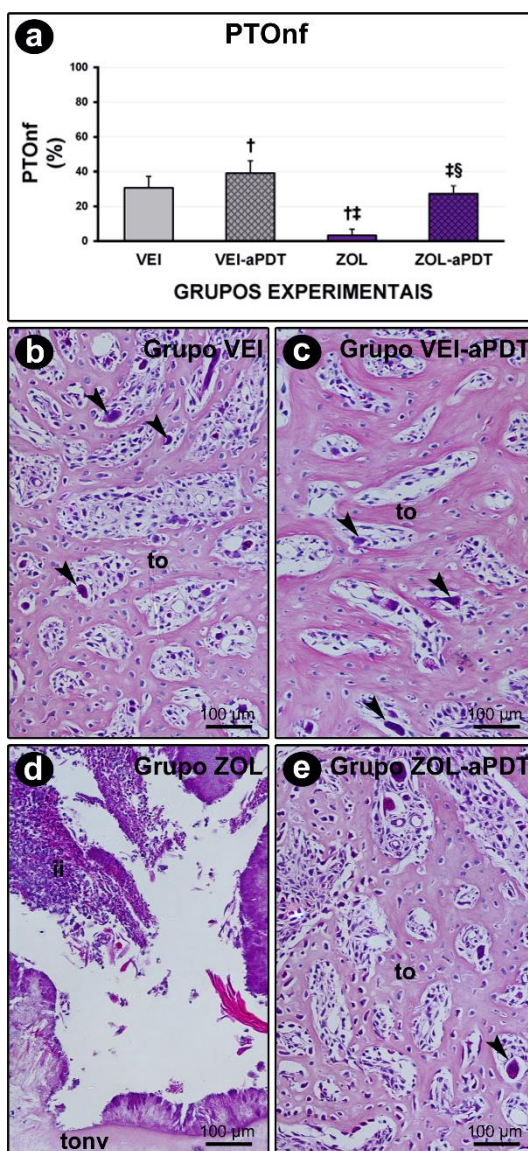
FIGURAS

FIGURA 1 - Desenho experimental e principais procedimentos operatórios. **(a)** Linha do tempo mostrando os diferentes procedimentos executados em seus respectivos intervalos de tempo nos diferentes grupos experimentais. **(b)** Instalação da ligadura no primeiro molar inferior. **(c)** Ligadura em posição no primeiro molar inferior. **(d)** Aspecto clínico do primeiro molar inferior três semanas após a manutenção da ligadura. **(e)** Aspecto clínico do sítio de extração dental imediatamente após a exodontia. **(f)** Deposição do fotossensibilizador butil azul de toluidina sobre o sítio de extração dental. **(g)** Execução da aPDT no sítio de extração dental com sua a irradiação com laser de baixa potência após a tempo de permanência do fotossensibilizador sobre a área.



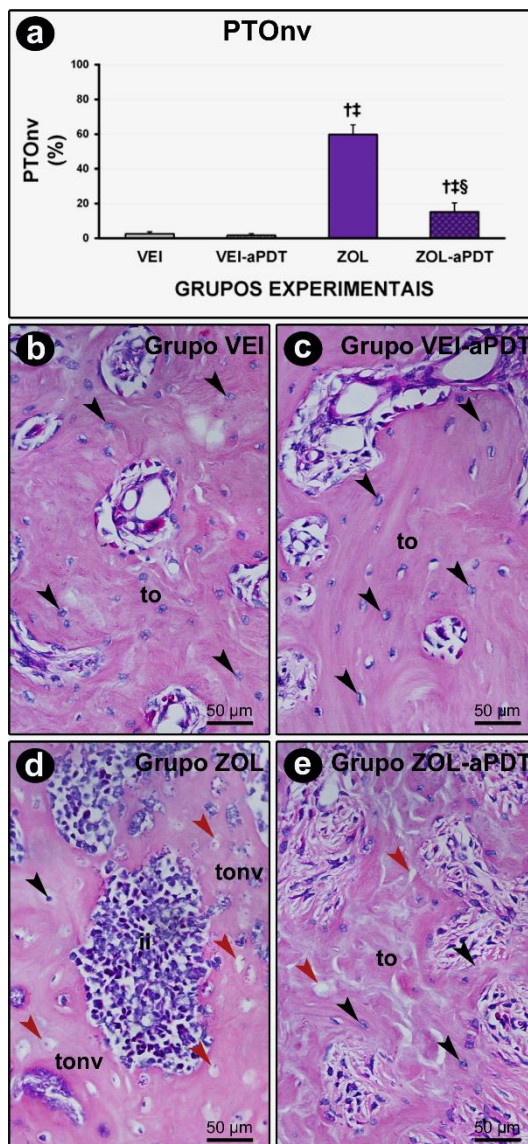
Fonte: elaborada pelo autor, 2021.

FIGURA 2 - Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. **(a)** Gráfico apresentando a porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTOnf) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais. Teste estatístico: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-aPDT; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL. **(b – e)** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo neoformado no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI **(b)**, VEI-aPDT **(c)**, ZOL **(d)**, ZOL-aPDT **(e)**. Abreviações e símbolos: ii, infiltrado inflamatório; to, tecido ósseo, tonv, tecido ósseo não vital; setas pretas, osteoclastos. Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm.



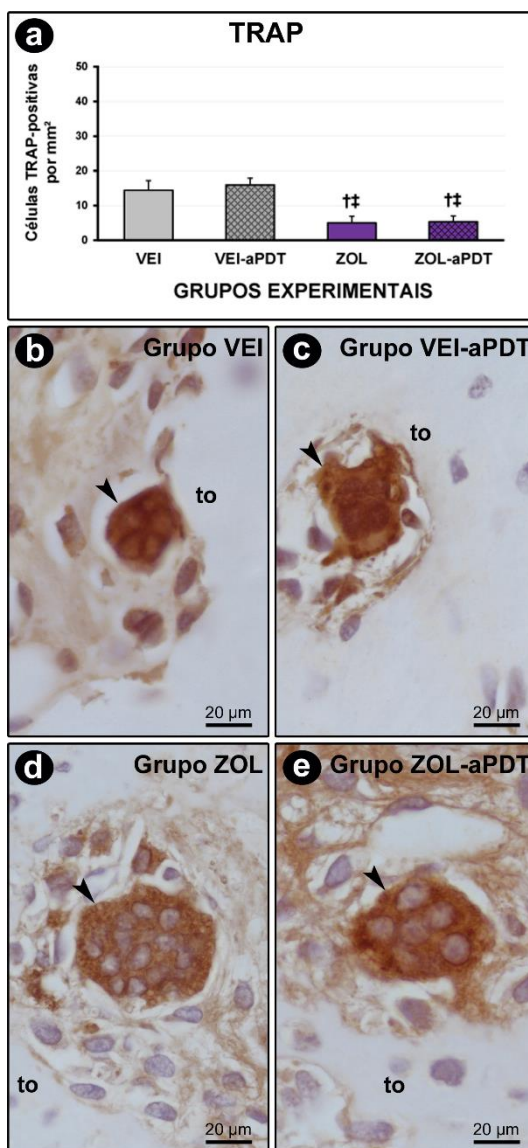
Fonte: elaborada pelo autor, 2021.

FIGURA 3 - Aspecto histológico das adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. **(a)** Gráfico apresentando a porcentagem de tecido ósseo não vital (PTOnv) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais. Teste estatístico: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-aPDT; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL. **(a – e)** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo situado nas adjacências e no interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI **(b)**, VEI-aPDT **(c)**, ZOL **(d)**, ZOL-aPDT **(e)**. Abreviações: ii, infiltrado inflamatório; to, tecido ósseo; tonv, tecido ósseo não vital; setas pretas, osteócitos; setas brancas, lacunas vazias ou com remanescentes celulares. Coloração: HE. Aumento original: 400x. Barras de escala: 50 µm.



Fonte: elaborada pelo autor, 2021

FIGURA 4 - Imunomarcação para TRAP no sítio de extração dental e adjacências aos 28 dias pós-operatórios. **(a)** Gráfico apresentando a quantidade de células TRAP-positivas por milímetro quadrado de tecido ósseo nos diferentes grupos experimentais. Teste estatístico: Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-aPDT. **(b – e)** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico das células TRAP-positivas (osteoclastos) no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios em VEI **(b)**, VEI-aPDT **(c)**, ZOL **(d)**, ZOL-aPDT **(e)**. Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo; setas pretas: osteoclastos (células TRAP-positivas). Contra-coloração: hematoxilina. Aumento original: 100x. Barras de escala: 20 µm.



Fonte: elaborada pelo autor, 2021.

TABELAS

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

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA: NÍVEL DE INFLAMAÇÃO				
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES			
	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	VEI	VEI-aPDT	ZOL	ZOL-aPDT
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL				
(1) ausência de inflamação	100	100	-	71,4
(2) pequena quantidade de células inflamatórias (menos de 1/3 das células presentes são células inflamatórias)	-	-	-	28,6
(3) moderada quantidade de células inflamatórias (entre 1/3 e 2/3 das células presentes são células inflamatórias)	-	-	42,9	-
(4) grande quantidade de células inflamatórias (mais de 2/3 das células presentes são células inflamatórias)	-	-	57,1	-
MEDIANA	1	1	4^{†‡}	1[§]
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO				
(1) ausência de inflamação	100	100	-	71,4
(2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo	-	-	-	28,6
(3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo, sem atingir o tecido ósseo	-	-	28,6	-
(4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo	-	-	71,4	-
MEDIANA	1	1	4^{†‡}	1[§]

Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-aPDT; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL.

Fonte: elaborada pelo autor, 2021.

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

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA: PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO TECIDUAL				
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	VEI	VEI-aPDT	ZOL	ZOL-aPDT
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO EPITELIAL				
(1) tecido epitelial de moderada espessura recobrindo completamente o sítio de extração	57,1	85,7	-	57,1
(2) tecido epitelial de delgada espessura recobrindo completamente o sítio de extração	42,9	14,3	-	42,9
(3) delgada camada de tecido epitelial apenas nas margens da ferida cirúrgica aberta	-	-	42,9	-
(4) ausência de tecido epitelial sobre a ferida cirúrgica aberta	-	-	57,1	-
MEDIANA	1	1	4^{†‡}	1[§]
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO				
(1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas	57,1	85,7	-	28,6
(2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	42,9	14,3	-	71,4
(3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	28,6	-
(4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose tecidual	-	-	71,4	-
MEDIANA	1	1	4^{†‡}	2[§]
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO				
(1) ausência de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo mais da metade do alvéolo dental	85,7	100	-	57,1
(2) ausência ou presença de poucas áreas de osso de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo menos da metade do alvéolo dental	14,3	-	-	42,9
(3) presença de poucas áreas de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo menos de um terço do alvéolo dental	-	-	28,6	-
(4) presença de muitas áreas de osso não vital nas adjacências do alvéolo com ausência de neoformação óssea ou trabéculas ósseas preenchendo menos de um terço do alvéolo dental	-	-	71,4	-
MEDIANA	1	1	4^{†‡}	1[§]

Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI-aPDT; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL.

Fonte: elaborada pelo autor, 2021.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



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 do efeito de múltiplas sessões de aPDT no sítio de extração dental de ratas senis sob terapia com inibidor de RANKL**", Processo FOA nº 00562-2018, sob responsabilidade de Edilson Ervolino apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 10 de Abril de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 02 de Outubro de 2020.

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

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of the effect of multiple aPDT sessions on the dental extraction site in female senile rats under therapy with of RANKL inhibitor**", Protocol FOA nº 00562-2018, under the supervision of Edilson Ervolino presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 10, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 02, 2020.

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


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

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