



unesp

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



AVALIAÇÃO DO EMPREGO DA CURCUMINA ASSOCIADA AO DIODO EMISSOR DE LUZ DURANTE O REPARO ALVEOLAR EM RATAS COM ALTO RISCO PARA A OSTEONECROSE DOS MAXILARES

ISABELLA ZACARIN GUIATI

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

Prof. Assoc. Edilson Ervolino

**BOTUCATU – SP
2022**



unesp

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DO EMPREGO DA CURCUMINA ASSOCIADA
AO DIODO EMISSOR DE LUZ DURANTE O REPARO
ALVEOLAR EM RATAS COM ALTO RISCO PARA A
OSTEONECROSE DOS MAXILARES**

ISABELLA ZACARIN GUIATI

PROF. ASSOC. EDILSON ERVOLINO

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

Prof. Assoc. Edilson Ervolino

BOTUCATU – SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Guiati, Isabella Zacarin.

Avaliação do emprego da curcumina associada ao diodo emissor de luz durante o reparo alveolar em ratas com alto risco para a osteonecrose dos maxilares / Isabella Zacarin Guiati. - Botucatu, 2022

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

Orientador: Edilson Ervolino

Capes: 20600003

1. Curcumina. 2. Fotoquimioterapia. 3. Osteonecrose.
4. Ácido zoledrônico.

Palavras-chave: Curcumina; Osteonecrose; Terapia fotodinâmica antimicrobiana; Zoledronato.

Dedicatória

Aos meus pais, Marcia e Ailton

À minha irmã Mariana

Essa vitória é nossa.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por tudo.

*Aos meus pais, Marcia e Ailton, por tantas vezes
abrirem mão dos seus senhos, em prol dos meus.*

*A minha irmã Mariana, por ser minha parceira de
vida e melhor amiga.*

*A minha madrinha Sueli, por estar presente em todos
os momentos, desde o meu processo seletivo e o meu
primo Diego, por sempre acreditar e estimular meu
potencial.*

*Ao meu namorado Leonardo, pelo zelo, carinho e
dedicação a mim.*

*Ao meu orientador, professor doutor Edilson Ervolino,
pela imensa paciência, dedicação, ensinamentos e
amizade, não só durante o doutorado, mas desde a
graduação.*

*Ao meu orientador do mestrado, professor doutor José
de Anchieta de Castro e Horta Júnior, por ter me
ensinado tanto e se dedicado tanto a minha formação.*

*Ao meu orientador de Iniciação Científica, professor
doutor Cláudio Aparecido Casatti, por ter me iniciado
na vida científica, e pela ajuda tantas vezes a mim
concedida.*

*A professora doutora Kelly Regina Torres da
Silva, por ter me ensinado todas as bases da vida em*

*laboratório, as quais foram tão importantes na minha
formação, e são até hoje.*

*Ao professor doutor Gestter Willian Lattari
Tessarini, pela amizade e parceria ao longo desses anos,
e por toda a paciência e ensinamentos transmitidos.*

*A todos os membros da Família Fob, em especial a
Jessica Freire, Vinícius, Luan, Luy e Eduardo, que
tantas vezes "colocaram a mão na massa" junto comigo
para a realização desse projeto.*

*Aos professores da banca do Exame Geral de
Qualificação, professora doutora Marixa Akemi
Matsumoto e professor doutor Juliano Milanexi, pelas
dicas e correções.*

*Aos professores da banca de defesa, por todas as
colocações feitas e disponibilidade.*

*A todos os professores e funcionários do departamento
de Ciências Básicas, pelo carinho, ensinamentos e
amizade ao longo desses mais de 10 anos.*

*As minhas amigas, Milena, Érica,
Mariana, Jéssica, Denise, Bia, Camila, Marcela e
Isabela pela amizade e carinho.*

*Aos meus alunos, por me ensinarem tanto todos os
dias.*

*Aos alunos do curso de Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba, por terem me recebido tão
bem durante os estágios na disciplina de Anatomia.*

A disciplina de Anatomia Humana, em especial ao professor doutor Paulo Roberto Botacin e professor doutor José Américo de Oliveira, pelos infinitos ensinamentos de uma ciência tão desafiadora.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada.

Aos professores, alunos e funcionários do Instituto de Biociências de Botucatu.

Ao CNPq, pelo apoio concedido em forma de bolsa.

Aos meus animais experimentais, meu infinito respeito.

E por último, mas não menos importante, a Faculdade de Odontologia de Araçatuba, minha segunda casa, a qual devo absolutamente tudo.

*"Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar."*

(Esopo)

Sumário

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	1
Lista de figuras.....	3
Resumo.....	6
Abstract.....	8
Introdução.....	11
Os bisfosfonatos.....	11
A osteonecrose dos maxilares.....	13
A aPDT como terapia para a osteonecrose dos maxilares.....	17
A Curcumina.....	18
A aPTD empregando a curcumina como fotossensibilizador.....	20
Objetivo.....	24
Material e métodos.....	26
Animais.....	26
Delineamento experimental.....	26
Grupos experimentais.....	30
Processamento histológico das amostras.....	32
Análise das amostras.....	35
Análise estatística dos dados.....	38
Resultados.....	40
Condições gerais de saúde e exame clínico intrabucal.....	40
Análise histopatológica: nível de inflamação tecidual.....	40
Análise histopatológica: padrão de estruturação tecidual da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental.....	42
Porcentagem de TONF no sítio de extração dental.....	43
Porcentagem de TONV nas adjacências do sítio de extração dental.....	44
VEGF no sítio de extração dental.....	47
TGF- β no sítio de extração dental.....	49
BMP 2/4 no sítio de extração dental.....	51
OCN no sítio de extração dental.....	53
Discussão.....	56
Conclusão.....	68
Referências bibliográficas.....	70

Anexo 1.....	79
Anexo 2.....	80

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS

µm.....	Micrômetro
aPDT.....	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
ATP.....	Adenosina trifosfato
BP.....	Bisfosfonato
C. Albicans.....	<i>Candida albicans</i>
C.....	Carbono
cm.....	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CoA.....	Coenzima A
COBEA.....	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Cox-2.....	Cicloxigenase 2
CTX.....	Telopectídeo C terminal do colágeno tipo I
CUR.....	Curcumina
DAMPs.....	Padrões moleculares associados ao dano
E. coli.....	<i>Escherichia coli</i>
FOA.....	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g.....	Grama
HE.....	Hematoxilina e eosina
Kg.....	Quilograma
LED.....	Diodo emissor de luz
Mg.....	Miligrama
ml.....	Mililitro
N-BPs.....	Bisfosfonatos nitrogenados
nm.....	Nanômetros
NTX.....	Telopectídeo N terminal do colágeno tipo I
°C.....	Graus Celsius
ONMM.....	Osteonecrose medicamentosa dos maxilares
P.....	Fosfato
Pg.....	Picograma

PRR.....Receptores de reconhecimento de padrões
 PTOT.....Porcentagem de tecido ósseo total
 s.....Segundo
 TNF- αFator de necrose tumoral
 TONF.....Porcentagem de tecido ósseo neoformado
 TONV.....Porcentagem de tecido ósseo não vital
 VEI-aPDT.....Veículo/Terapia Fotodinâmica antimicrobiana
 VEI-CUR.....Veículo/Curcumina
 VEI-LED.....Veículo/Diodo emissor de luz
 VEI.....Veículo
 ZOL-aPDT.....Zoledronato/Terapia Fotodinâmica antimicrobiana
 ZOL-CUR.....Zoledronato/Curcumina
 ZOL-LED.....Zoledronato/Diodo emissor de luz
 ZOL.....Zoledronato

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura molecular dos bisfosfonatos nitrogenados e esquema representativo da via do mevalonato no osteoclasto, com destaque para o local de atuação destes fármacos. (Extraído de Toro et al, 2019: Avaliação do processo de reparo peri-implantar em ratas tratadas com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato).....12
- Figura 2: Estrutura química da Curcumina (ARAÚJO e LEON, 2001).....19
- Figura 3: Extração e coloração característica da curcumina. (GOEL et al., 2008).....22
- Figura 4: Fotos dos procedimentos realizados ao longo do experimento. A e B, instalação da ligadura; C, sítio de exodontia; D, 0,5ml de curcumina a serem depositados na ferida cirúrgica; E e F, deposição da curcumina sobre a área de exodontia; G e H, aPDT utilizando a curcumina como fotossensibilizador e a luz de LED.....29
- Figura 5: Resumo do protocolo experimental ao qual foram submetidos os diferentes grupos. As representações de seringas ilustram os dias em que foram feitas as aplicações de zoledronato ou do veículo por via intraperitoneal, as representações de LED, demonstram os dias em que foram feitas as sessões de aPDT. Abreviações: aPDT, terapia fotodinâmica antimicrobiana; IP, injeção intraperitoneal; VEI, solução de cloreto de sódio 0,9%; ZOL, zoledronato.....31
- Figura 6: Resumo evidenciando a região de obtenção dos cortes histológicos (a) e a área de análise (b). Abreviações: AON, área de osso neoformado; D, face distal; L, face lingual; M, face mesial; SI, septo interradicular; TC, tecido conjuntivo; TE, tecido epitelial; V, face vestibular.....33
- Figura 7: Regiões capturadas para análise. a - Análise histopatológica da reparação tecidual; b - Análise histométrica da porcentagem de TONF; c - Análise histométrica da porcentagem de TONV.....37
- Figura 8: Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo adjacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), ZOL (b), VEI-CUR (c), ZOL-CUR (d), VEI-LED (e), ZOL-LED (d), VEI-aPDT (g) e ZOL-aPDT (h). Observar a grande quantidade de tecido ósseo não vital presente nos grupos ZOL e ZOL-LED. Nestes grupos observa-se grande quantidade de lacunas vazias (setas pretas) ou ocupadas por remanescentes de osteócitos (setas azuis), o que também é evidenciado, no entanto, em proporções muito menores, nos grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT. Abreviações e símbolos: setas pretas, lacunas vazias; setas azuis, lacuna contendo remanescente de osteócitos. Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm.....45
- Figura 9: Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo no interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), ZOL (b), VEI-CUR (c), ZOL-CUR (d), VEI-LED (e), ZOL-LED (d), VEI-aPDT (g) e ZOL-aPDT (h). Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm.....46
- Figura 10: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcagem para VEGF na interface entre o tecido ósseo do alveólo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental

aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), ZOL (b), VEI-CUR (c), ZOL-CUR (d), VEI-LED (e), ZOL-LED (d), VEI-aPDT (g) e ZOL-aPDT (h). Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo; setas: células VEGF-*imunorreativas*. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.....48

Figura 11: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para TGF-β1 na interface entre o tecido ósseo do alveólo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), ZOL (b), VEI-CUR (c), ZOL-CUR (d), VEI-LED (e), ZOL-LED (d), VEI-aPDT (g) e ZOL-aPDT (h). Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo; setas: células TGF-β1-*imunorreativas*. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.....50

Figura 12: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para BMP2/4 na interface entre o tecido ósseo do alveólo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), ZOL (b), VEI-CUR (c), ZOL-CUR (d), VEI-LED (e), ZOL-LED (d), VEI-aPDT (g) e ZOL-aPDT (h). Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo; setas: células BMP2/4-*imunorreativas*. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.....52

Figura 13: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para OCN na interface entre o tecido ósseo do alveólo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), ZOL (b), VEI-CUR (c), ZOL-CUR (d), VEI-LED (e), ZOL-LED (d), VEI-aPDT (g) e ZOL-aPDT (h). Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo; setas: células OCN-*imunorreativas*. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.....54

Resumo

RESUMO

A osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONMM) é um grave efeito adverso que pode ser ocasionado pelo uso de medicamentos com ação antirreabsortiva. Essa é uma condição patológica de difícil tratamento, em sendo assim, a prevenção seria a estratégia ideal. Estudos mostram que a curcumina (CUR) apresenta ação anti-inflamatória, efeito antimicrobiano e alta capacidade para estimular a reparação tecidual, além disso, pode ser usada como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), o que a coloca como uma potencial estratégia terapêutica preventiva para a ONMM. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da aPDT, empregando CUR e diodo emissor de luz (LED) azul, no sítio de extração dental de ratas que apresentavam alto risco para a ONMM. Cinquenta e seis ratas senescentes foram distribuídas em oito grupos experimentais: VEI; VEI-LED; VEI-CUR; VEI-aPDT; ZOL; ZOL-LED; ZOL-CUR; ZOL-aPDT. O plano de tratamento medicamentoso teve duração de 7 semanas. As ratas dos grupos VEI; VEI-LED; VEI-CUR; VEI-aPDT receberam 0,45 ml de veículo (cloreto de sódio 0,9%). As ratas dos grupos ZOL; ZOL-LED; ZOL-CUR; ZOL-aPDT receberam o veículo acrescido de 100 µg/Kg de zoledronato. O veículo e o zoledronato foram administrados a cada 72 horas pela via intraperitoneal. Decorridas 3 semanas de tratamento todas as ratas foram submetidas à exodontia do primeiro molar inferior. Nos grupos VEI-LED e ZOL-LED foram efetuadas 4 sessões de irradiação com LED. Nos grupos VEI-CUR e ZOL-CUR foram efetuadas 4 sessões de deposição de CUR. Nos grupos VEI-aPDT e ZOL-aPDT foram efetuadas 4 sessões de aPDT empregando a CUR e o LED. Os tratamentos locais foram efetuados aos 0, 2, 4 e 6 dias pós-operatórios. Decorridos 28 dias pós-operatórios foi realizada a eutanásia. As hemimandíbulas foram devidamente processadas para que se pudesse ser efetuado no sítio de extração dental: 1) análise clínica; 2) análise histológica da reparação tecidual; 3) análise histométrica da porcentagem de Tecido Ósseo Neoformado (TONF) e Tecido Ósseo Não Vital (TONV) e; 4) análise imunoistoquímica para os marcadores VEGF, TGFβ1, BMP2/4 e OCN. Os grupos ZOL e ZOL-LED apresentaram severo comprometimento do processo de reparo alveolar, menor porcentagem de TONF, maior porcentagem de TONV e baixo padrão de imunomarcção para VEGF, TGFβ1, BMP2/4 e OCN. Quando comparados com esses grupos, os grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT apresentaram um curso do processo de reparação tecidual favorável, maior porcentagem de TONF, menor porcentagem de TONV e padrão de imunomarcção de moderado a alto para VEGF, TGFβ1, BMP2/4 e OCN. Os grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT mostraram muita similaridade com o grupo VEI na maioria dos parâmetros avaliados neste

estudo. Quando ZOL-CUR e ZOL-aPDT são comparados entre si, este último se mostrou superior em alguns dos parâmetros. Conclui-se que a curcumina exerce efeitos positivos sobre o processo de reparo alveolar em ratas senescentes tratadas com altas doses de zoledronato. Os efeitos benéficos sobre a reparação tecidual são potencializados quando a curcumina é associada à irradiação com LED azul, ou seja, na aPDT. O uso da curcumina, irradiada ou não com LED azul, evitou a ocorrência ONMM.

Palavras-chave: zoledronato, osteonecrose, terapia fotodinâmica antimicrobiana e curcumina

ABSTRACT

Osteonecrosis of the jaws associated with drug therapy (ONMM) is a serious adverse effect that can be caused by the use of drugs with antiresorptive action. This is a pathological condition that is difficult to treat, so prevention would be the ideal strategy. Studies show that curcumin (CUR) has anti-inflammatory action, antimicrobial effect and high capacity to stimulate tissue repair, in addition, it can be used as a photosensitizer in antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), which makes it a potential therapeutic strategy. preventive action for the ONMM. The aim of the present study was to evaluate the effect of aPDT, using CUR and blue light-emitting diode (LED), at the dental extraction site of rats at high risk for NMM. Fifty-six senescent rats were divided into eight experimental groups: VEI; VEI-LED; VEI-CUR; VEI-aPDT; ZOL; ZOL-LED; ZOL-CUR; ZOL-aPDT. The drug treatment plan lasted 7 weeks. The rats of the VEI groups; VEI-LED; VEI-CUR; VEI-aPDT received 0.45 ml of vehicle (0.9% sodium chloride). The rats of the ZOL groups; ZOL-LED; ZOL-CUR; ZOL-aPDT received the vehicle plus 100 µg/Kg of zoledronate. The vehicle and zoledronate were administered intraperitoneally every 72 hours. After 3 weeks of treatment, all rats underwent extraction of the lower first molar. In the VEI-LED and ZOL-LED groups, 4 sessions of LED irradiation were performed. In the VEI-CUR and ZOL-CUR groups, 4 CUR deposition sessions were performed. In the VEI-aPDT and ZOL-aPDT groups, 4 aPDT sessions were performed using CUR and LED. Local treatments were performed at 0, 2, 4 and 6 postoperative days. After 28 postoperative days, euthanasia was performed. The hemimandibles were properly processed so that the following could be performed at the tooth extraction site: 1) clinical analysis; 2) histological analysis of tissue repair; 3) histometric analysis of the percentage of Neoformed Bone Tissue (TONF) and Non-Vital Bone Tissue (TONV) and; 4) immunohistochemical analysis for VEGF, TGFβ1, BMP2/4 and OCN markers. The ZOL and ZOL-LED groups showed severe impairment of the alveolar repair process, lower percentage of TONF, higher percentage of TONV and low immunostaining pattern for VEGF, TGFβ1, BMP2/4 and OCN. When compared with these groups, the ZOL-CUR and ZOL-aPDT groups showed a favorable course of tissue repair, higher percentage of TONF, lower percentage of TONV and moderate to high immunostaining pattern for VEGF, TGFβ1, BMP2/4 and OCN. The ZOL-CUR and ZOL-aPDT groups showed a lot of similarity with the VEI group in most of the parameters evaluated in this study. When ZOL-CUR and ZOL-aPDT are compared, the latter proved to be superior in some of the parameters. It is concluded that curcumin exerts positive effects on the alveolar repair process in senescent rats treated with high doses of

zoledronate. The beneficial effects on tissue repair are potentiated when curcumin is associated with blue LED irradiation, that is, in aPDT. The use of curcumin, whether or not irradiated with blue LED, prevented the occurrence of ONMM.

Keywords: zoledronate, osteonecrosis, antimicrobial photodynamic therapy and curcumin

Introdução

INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos

Os bisfosfonatos (BPs) consistem atualmente em uma das linhas de fármacos utilizados para o tratamento de osteopatias como osteoporose, doença de Paget, osteogênese imperfeita, mieloma múltiplo ou para controle da progressão de metástase óssea, hipercalcemia e dor óssea em neoplasias malignas osteotrópicas, tais como tumores de mama, próstata, pulmão e rim (DRAKE et al., 2008; ZHANG et al., 2021).

Os BPs administrados por via oral foram aprovados para o tratamento de osteoporose e osteopenia, assim como para condições menos recorrentes como doença de Paget e osteogênese imperfeita na infância. Sua eficácia clínica nesses casos é bem estabelecida e reflete o fato de 190 milhões de BPs terem sido prescritos ao redor do mundo (RUGGIERO et al., 2009; RUGGIERO et al., 2014).

Quando administrados por via intravenosa geralmente são utilizados no tratamento e gestão de condições relacionadas ao câncer, incluindo hipercalcemia maligna e metástases ósseas relacionadas a tumores de mama, próstata, pulmão, além das lesões líticas que configuram o mieloma múltiplo. Eles têm mostrado efeito positivo na qualidade de vida para pacientes com câncer avançado que envolve os ossos, e, em 2002, o ácido zoledrônico foi aprovado para essa indicação pela US Food and Drug Administration (RUGGIERO et al., 2009; RUGGIERO et al., 2014).

Essa classe de fármacos é caracterizada por possuir uma estrutura química análoga ao pirofosfato, representada por dois grupamentos fosfato ligados covalentemente a um carbono central (P-C-P). A este carbono central estão ligadas duas cadeias laterais, sendo R1 a mediadora pela afinidade aos cristais de hidroxiapatita e R2 a responsável pela potência e propriedades farmacológicas de cada BP (ROGERS et al., 2011). Pequenas alterações na estrutura da cadeia R2 podem mudar drasticamente o efeito e potência antirreabsortiva desses fármacos (DUNFORD et al., 2001).

Os BPs podem ser divididos em duas classes, as quais se diferenciam pela presença ou não de nitrogênio em sua cadeia lateral R2 (ROGERS et al., 2011), essa presença ou ausência de nitrogênio tem como consequência alteração do mecanismo de ação dos fármacos (EBETINO et al., 2011).

Os BPs não nitrogenados são endocitados pelos osteoclastos e convertem-se em uma molécula não funcional que compete com a adenosina trifosfato (ATP) no metabolismo

energético da célula. Essas substâncias têm ação citotóxica e o seu acúmulo no interior da célula resulta na apoptose dos osteoclastos (EBETINO et al., 2011; ROGERS et al., 2011).

Os BPs nitrogenados são capazes de alterar o metabolismo ósseo pela inibição da via do mevalonato, através da inativação da enzima farnesil difosfato sintase (DUNFORD et al., 2001) (figura 1). A inativação dessa enzima inibe a formação de farnesil difosfato e geranylgeranyl difosfato, os quais são essenciais para prenilação de proteínas, dentre as quais estão Ras, Rho e Rac (LUCKMAN et al., 1998) (figura 1), que são tidas como os alvos do efeito dessa classe de BPs. Essas proteínas se relacionam com a indução de apoptose prematura de osteoclastos ativos, inibição da osteoclastogênese (ABE et al., 2012) e especialmente com significativas alterações na dinâmica do citoesqueleto destas células, impossibilitando a formação da zona clara e da zona pregueada nos osteoclastos, as quais são essenciais para a interação da célula com a matriz óssea e para a formação do microambiente propício para o início da atividade reabsorptiva, respectivamente (COXON e ROGERS, 2003; ORY et al., 2008; EBETINO et al., 2011; ROGERS et al., 2011) (figura 1).

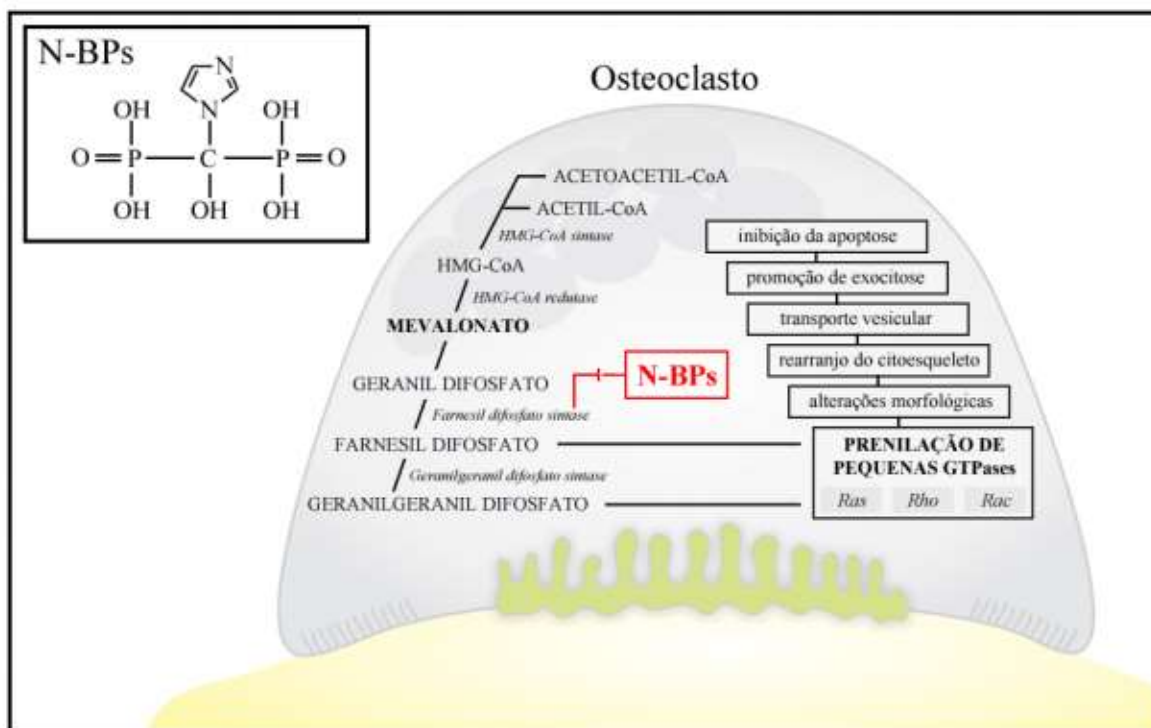


Figura 1: Estrutura molecular dos bisfosfonatos nitrogenados e esquema representativo da via do mevalonato no osteoclasto, com destaque para o local de atuação destes fármacos. (Extraído de TORO, L. F. **Avaliação do processo de reparo peri-implantar em ratas tratadas com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato.** 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019).

A osteonecrose dos maxilares

O uso dos BPs pode causar reações adversas, dentre as quais podemos destacar na área de atuação da odontologia, a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONMM), que foi definida de acordo com a American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) em 2014, como: “(1) osso exposto na região maxilofacial que não cicatriza dentro de 8 semanas após identificação; (2) após exposição a um agente anti-reabsortivo; e (3) sem histórico de radioterapia na região craniofacial” .

No entanto, com base nas recomendações mais recentes (2020) a ONMM é definida como uma “reação adversa ao medicamento, descrita como a progressiva destruição e morte do osso que acomete a mandíbula e maxila de pacientes expostos ao tratamento com medicamentos conhecidos por aumentar o risco da doença, na ausência de um tratamento de radiação anterior” (CAMPISI et al., 2020).

Ruggiero et al (2014) preconizam os seguintes estadiamentos para a ONMM:

Paciente de risco: Não há osso necrótico exposto. O paciente é assintomático, entretanto está sendo tratado com fármaco antirreabsortivo ou antiangiogênico, por via intravenosa ou oral.

Estágio 0: Não há evidência clínica de osso necrótico exposto, mas estão presentes sintomas clínicos não específicos (odontalgia que não pode ser explicada por causa odontológica; dor na maxila ou na mandíbula que pode se irradiar para a articulação temporomandibular; dor sinusal; alteração de função neurosensorial), achados clínicos (perda dentária não causada por doença periodontal crônica; fístula periapical ou periodontal não associada com necrose pulpar, trauma ou restaurações), ou achados radiográficos (perda ou reabsorção óssea alveolar não relacionada a doença crônica periodontal; mudanças no padrão do trabeculado ósseo; regiões de esclerose óssea envolvendo o osso alveolar ou o osso ao seu redor; alterações do ligamento periodontal).

Estágio I: Osso exposto/necrótico ou fístula que quando sondada chega até o osso em paciente assintomático e sem evidência de infecção. Esses pacientes podem apresentar os achados radiográficos descritos no estágio 0.

Estágio II: Osso exposto/necrótico ou fístula que quando sondada chega até o osso com evidência de infecção. Esses pacientes são tipicamente sintomáticos. Também podem apresentar os achados radiográficos descritos no estágio 0.

Estágio III: Osso exposto/necrótico ou fístula que quando sondada chega até o osso com evidência de infecção e ao menos uma das características seguintes: Osso necrótico exposto se estendendo além da região do osso alveolar, fratura patológica, fístula extraoral, comunicação com seios ou com a cavidade nasal, osteólise se estendendo a borda inferior da mandíbula ou para o assoalho do seio.

Em pacientes que fazem uso de BPs administrados por via oral a ONMM é uma condição de baixa ocorrência. Em um estudo com mais de 13.000 pacientes, foi verificado que a ONMM foi relatada em apenas 0,1% dos pacientes que receberam terapia oral de longo prazo com BPs (10 casos a cada 10.000), aumentando para 0,21% em pacientes com terapia decorrida por mais de quatro anos (21 casos a cada 10.000) (LO et al., 2010; RUGGIERO et al., 2014).

Em pacientes que fizeram o uso intravenoso de BPs como terapia para a osteoporose, a ocorrência de ONMM também é de baixa frequência. Em um estudo que acompanhou pacientes expostos a terapia intravenosa com zoledronato para o tratamento de osteoporose durante três anos, evidenciou-se uma taxa de 0,017% de ONMM (1,7 casos a cada 10.000) (GRBIC et al., 2010; RUGGIERO et al., 2014). Uma extensão desse estudo por seis anos, não verificou alterações nessa porcentagem (BLACK et al., 2012; RUGGIERO et al., 2014).

Entretanto, no caso de pacientes que fazem uso dos BPs por via intravenosa, como o zoledronato, utilizado para complementação de terapia oncológica, a incidência da ONMM atinge de 0,7 a 6,7% dos pacientes (COLEMAN et al., 2011; RUGGIERO et al., 2014).

A duração do tratamento com a medicação antirreabsortiva é um fator de risco para o desenvolvimento da ONMM, para pacientes tratados durante um ano com zoledronato, a incidência é de 0,6%, aumentando para 0,9% aos dois anos e 1,3% aos três anos (HENRY et al., 2011; ALJOHANI et al., 2017).

Idade e sexo também são considerados fatores de risco para a ocorrência da ONMM. A maior prevalência em mulheres, reflete o fato de os bisfosfonatos serem mais prescritos a essa parte da população (osteoporose, câncer de mama) (RUGGIERO et al., 2014). A ONMM acomete com maior frequência pacientes do sexo feminino (73%), com idade avançada (em média 66 anos e uma variação entre 42-90 anos de idade) (OTTO et al., 2011).

Existem poucas informações acerca de riscos relacionados a anatomia na literatura (RUGGIERO et al., 2014), a maior ocorrência se dá na mandíbula (73%) em relação a maxila (22,5%), mas a ONMM também pode estar presente em ambas concomitantemente (4,5%) (SAAD et al., 2012; RUGGIERO et al., 2014).

Doenças dentais inflamatórias pré-existentes também são consideradas fatores de risco, como por exemplo doença periodontal ou periapical (RUGGIERO et al., 2014). Em pacientes em tratamento de câncer, os quais desenvolveram ONMM, condições inflamatórias dentais pré-existentes estão presentes em 50% dos casos (SAAD et al., 2012; RUGGIERO et al., 2014).

Cirurgias dentoalveolares são consideradas o maior fator de risco para o desenvolvimento das ONMMs, sendo a extração dentária um evento predisponente comum (52-61%). Pacientes que utilizam BPs intravenosos e foram submetidos a cirurgias dentoalveolares são no mínimo sete vezes mais susceptíveis a desenvolver ONMM do que pacientes que não foram submetidos a cirurgias dessa natureza (RUGGIERO et al., 2009).

Os corticosteróides estão associados a um aumento da ocorrência da ONMM (SAAD et al., 2012), assim como agentes antiangiogênicos, quando administrados concomitantemente com fármacos antirreabsortivos, são relacionados a um aumento da incidência de ONMM (RUGGIERO et al., 2014).

A American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) recomenda que os pacientes que iniciarão o tratamento com BPs se submetam a avaliações dentárias e recebam o tratamento necessário antes de começarem a terapia com BPs, entretanto assume que intervenções dentais preventivas podem efetivamente reduzir, mas não eliminar, o risco de ONMM. Uma vez sendo necessário o tratamento dentário já tendo sido iniciada a terapia com BPs, o ideal seria a paralização do uso da medicação por três meses antes e três meses depois do procedimento, se as condições sistêmicas permitirem e, quando possível, procedimentos que envolvam injúria óssea direta devem ser evitados (RUGGIERO et al., 2009). Entretanto sabe-se que em muitas situações não existe a possibilidade da interrupção do tratamento medicamentoso e não é possível que o procedimento odontológico seja postergado ou evitado.

A etiopatogenia das ONMM ainda não está totalmente elucidada. Modelos experimentais em animais têm direcionado as pesquisas científicas, no entanto, em função de os modelos experimentais e os protocolos medicamentosos serem muito diversificados, os resultados se mostram escassos, incongruentes e muitas vezes contraditórios (SONIS et al., 2009; SENEL et al., 2010; MAAHS et al., 2011; MARINO et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2012; BARBARCREO et al., 2013; CONTE NETO et al., 2013; TSURUSHIMA et al., 2013; ZHANG et al., 2021).

Dentre os fatores etiológicos envolvidos com a ocorrência da ONMM estão: a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos, o que resulta no acúmulo de microfraturas no tecido ósseo e conseqüentemente áreas de tecido ósseo não vital, o que seria capaz de

favorecer o estabelecimento de necrose; o efeito citotóxico dos BPs sobre as células dos tecidos que compõem a mucosa bucal, o que resultaria na diminuição da capacidade de reparo dos tecidos moles; o potente efeito antiangiogênico dos BPs, o que resultaria em necrose avascular do tecido ósseo; o favorecimento à infecção induzida pelos BPs, os quais aumentam sobremaneira a capacidade de adesão e colonização de bactérias ao tecido ósseo exposto (ALLEN e BURR, 2009; SIDDIQI et al., 2009; MIGLIORATI et al., 2011; SHANNON et al., 2011; BADEL et al., 2013; RUGGIERO et al., 2014; LEE et al., 2017).

Após o estadiamento clínico da doença, os tratamentos podem ser direcionados, e atualmente estão caracterizados por diferentes abordagens clínicas que variam de acordo com o estágio da doença, compreendendo desde bochechos com gluconato de clorexidina 0,12%, antibioticoterapia, até debridamento cirúrgico da lesão, que em alguns casos pode consistir em mandibulectomia ou maxilectomia parcial (WEITZMAN et al., 2007; RUGGIERO et al., 2009; HANASONO et al., 2013; RUGGIERO et al., 2014).

Com o intuito de prever quais pacientes são os mais susceptíveis ao desenvolvimento da ONMM, Marx et al (MARX et al., 2007) propuseram como exame complementar a dosagem sérica do telopeptídeo C terminal do colágeno tipo I (CTX). Um nível sérico de CTX acima de 150 pg/ml representa o mínimo risco para o desenvolvimento da ONMM, baseado nisso, intervenções cirúrgicas odontológicas estariam indicadas em tais pacientes (MARX et al., 2007). No entanto, em um estudo detalhado, Kim et al. (2013) avaliaram o nível sérico de diversos biomarcadores e sua correlação com o desenvolvimento de ONMM após intervenções cirúrgicas odontológicas. Tais autores investigaram os níveis séricos de osteocalcina, desoxipiridinolina, fosfatase alcalina específica do osso, hormônio paratireoideano, telopeptídeo N terminal do colágeno I (NTX) e CTX e concluíram que não há evidência suficiente para se correlacionar o nível sérico de qualquer um destes biomarcadores, incluindo o CTX, com o risco de desenvolver ONMM (KIM et al., 2013). Por mais que tais exames complementares pudessem nos dar alguma previsibilidade sobre o risco de desenvolvimento de ONMM, não configuram uma medida profilática. Além disso, por mais que uma intervenção cirúrgica odontológica possa ser contraindicada levando-se em consideração o nível sérico de um determinado biomarcador, em alguns casos ela não pode ser muito protelada, o que reforça a necessidade de protocolos terapêuticos preventivos para evitar a ONMM.

Um protocolo preventivo ideal seria aquele que apresentasse grande eficácia e nenhum ou desprezíveis efeitos adversos. Atualmente tem sido sugerida a prescrição de antibioticoterapia profilática em pacientes que fazem uso crônico de BPs e necessitam de

intervenções odontológicas invasivas, especialmente exodontia (LITTLE et al., 2008; HOEFERT e EUFINGER, 2011; LOPEZ-JORNET et al., 2011; RUGGIERO et al., 2014). No entanto, alguns estudos em animais e em humanos demonstraram que a antibioticoprofilaxia pode falhar na prevenção da ocorrência de ONMM (HOEFERT e EUFINGER, 2011; LOPEZ-JORNET et al., 2011; WILLIAMS et al., 2020).

Isso ocorre justamente porque tal conduta está baseada no empirismo, pois não há comprovação científica de que a ONMM seja um evento desencadeado ou sustentado por um processo infeccioso, o que explicaria o insucesso da antibioticoterapia profilática em algumas situações. Soma-se a isso o fato de o uso inadequado de um antimicrobiano na antibioticoprofilaxia poder ser capaz de gerar cepas de bactérias antibiótico-resistentes, predispor ao desenvolvimento de superinfecções, ocasionar reações alérgicas e interagir com outras drogas, especialmente em pacientes oncológicos cujo tratamento envolve a utilização concomitante de diversos medicamentos para o tratamento da doença de base (KUNIN et al., 1990; PAGE et al., 1993; LITTLE et al., 2008; RUGGIERO et al., 2014; WILLIAMS et al., 2020).

A aPDT como terapia para a osteonecrose dos maxilares

Uma proposta de terapia preventiva para ONMM que merece ser avaliada é a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). A aPDT consiste em uma reação fotoquímica oxigênio-dependente, que ocorre sob ação da luz, na qual a ativação de um agente fotossensibilizador gera espécies de oxigênio altamente reativo e citotóxico, predominantemente o oxigênio singlete. Deste modo, tem-se uma cascata de eventos oxidativos que levam à morte bacteriana (ATHAR et al., 1988; GARCIA-DIAZ et al., 2016; MYLONA et al., 2020).

Diante de sua capacidade antimicrobiana, do seu efeito bioestimulatório e da ausência de efeito adverso, a aPDT poderia se mostrar efetiva como proposta terapêutica preventiva para quem faz uso crônico de BPs e necessita de intervenções odontológicas invasivas.

ERVOLINO et al. (2019) foi o primeiro estudo que empregou a aPDT como estratégia terapêutica preventiva para a ONMM. Tais autores empregaram ratas senescentes tratadas com dose oncológica de zoledronato, submetidas à exodontia do molar inferior e tratadas localmente com aPDT. Foi verificado que a aPDT melhorou o processo de reparo alveolar e evitou a ocorrência da ONMM. A aPDT foi capaz de promover a regeneração epitelial, modular a resposta inflamatória local, melhorar a reparação do tecido conjuntivo e estimular a neoformação óssea alveolar (ERVOLINO et al., 2019).

O azul de metileno e o azul de toluidina vêm sendo extensivamente utilizados como fotossensibilizadores na pesquisa odontológica, e têm mostrado eficácia quando utilizados nos protocolos de aPDT (STATKIEVICZ et al., 2018; ERVOLINO et al., 2019; SOUZA et al., 2021b), todavia, o uso desses fotossensibilizadores, que são estimulados por luz vermelha, podendo ser esta emitida por LED ou laser (aproximadamente 660nm) (MAINWRIGHT et al., 2017), implica necessariamente na aquisição de um aparelho específico.

A Curcumina

O uso de plantas medicinais está relacionado a medicina popular de diferentes partes do mundo. Produtos naturais provenientes de plantas, fungos, bactérias e outros organismos continuam a ser usados em preparações farmacêuticas até os dias atuais, quer como compostos puros ou extratos. Existe uma grande variedade de compostos que podem ser extraídos e caracterizados a partir das plantas, assim como a *Curcuma longa L.* (ARAÚJO e LEON, 2001).

A utilização de produtos naturais e fitoterápicos tornou-se uma prática integrativa e complementar a saúde, a qual vem sendo amplamente conhecida e reconhecida pela prática do profissional cirurgião-dentista, desde 2008, com a introdução da Resolução nº. 082/2008, regulamentada pelo Conselho Federal de Odontologia (CFO) e inserida pela Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), do Ministério da Saúde (MONTEIRO e FRAGA, 2015).

Os produtos à base de plantas possuem atividade biológica complexa, associada a um bom perfil de segurança, biocompatibilidade, baixo impacto ao meio ambiente e custos mais baixos. Além disso, os compostos sintéticos tradicionais são mais associados a efeitos colaterais do que os compostos fitoterápicos (GÓSCINIAK et al., 2021). Muitos produtos fitoterápicos também se mostram extremamente interessantes, por possuírem métodos de utilização não invasivos, o que gera pouco ou nenhum efeito colateral. (SOUZA et al., 2021a)

A *Curcuma longa L.* pertence a família *Zingiberaceae*, é uma erva perene distribuída ao longo das regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo extensamente cultivada nos países asiáticos, principalmente Índia e China. Como um pó, chamado açafrão, tem sido usada como aromatizante e tempero. A medicina tradicional indiana utiliza o açafrão contra desordens biliares, anorexia, coriza, tosse, feridas diabéticas, desordens hepáticas, reumatismos e sinusite (ARAÚJO e LEON, 2001).

O princípio da coloração do açafrão foi isolado no século XIX e nomeado de Curcumina, possui cor amarelada (figura 3) e é o maior componente da *Curcuma longa L.*, sendo

responsável pela sua atividade anti-inflamatória. Sua estrutura química (figura 2) foi determinada por Roughley e Whiting em 1973, possui seu ponto de fusão entre 176-177°C e não é solúvel em água, podendo ser solubilizada em etanol, álcalis, acetona, ácido acético e clorofórmio. (ARAÚJO e LEON, 2001). Tem sido utilizada por séculos na gastronomia e como medicação com uma grande variedade de indicações, incluindo tratamento de lesões, doenças do fígado e controle microbiano (HAUKVIK et al., 2009).

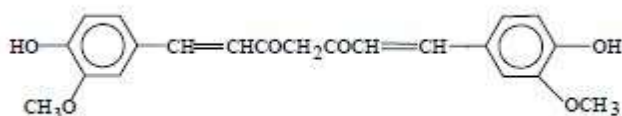


Figura 2: Estrutura química da Curcumina (ARAÚJO e LEON, 2001)

A curcumina não exibe efeitos tóxicos *in vitro* ou *in vivo* e se mostra segura mesmo quando utilizada em altas doses (ARAÚJO et al., 2014; MOGHADMTOUSI et al., 2014) possuindo pico de absorção amplo, contido entre 300-500nm (BRUZELL et al., 2005; ARAÚJO et al., 2014). Há estudos que sugerem que a curcumina possui efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos, antifúngicos (MARTINS et al., 2009; AGGARAWAL et al., 2015), anti-carcinogênicos (BRUZELL et al., 2005; JOSHI et al., 2021), antioxidantes (UNNIKRISHNAN e RAO, 1995), anti-protozoários (RASMUSSEN et al., 2000) e antivirais (EIGNER e SCHOLZ, 1999).

Também vem sendo reportado o seu potencial indutor de apoptose de várias linhagens celulares e sua habilidade de interagir com biomarcadores como citocinas e proteínas apoptóticas (NF-kB, COX-2, LOX, STAT3, Prostaglandina E2, etc) (JOSHI et al., 2021).

Um dos seus efeitos mais explorados e estudados, é o anti-inflamatório, o qual vem sendo abordado em estudos experimentais e clínicos. Associado a isso, a curcumina vem demonstrando capacidade de inibir muitas moléculas mediadoras do processo inflamatório como a cicloxigenase-2 (Cox-2), leucotrienos, interleucinas, hialuronidase, óxido nítrico, lipoxigenase, fator de necrose tumoral alfa (TNF α), prostaglandinas e outros mediadores envolvidos na inflamação (CHAINANI-WU, 2003; JURENKA, 2009; ZHOU et al., 2013; FADUS et al., 2017; JOSHI et al., 2021).

Existe uma gama de artigos na literatura relatando a capacidade anti-inflamatória de componentes da curcumina (THEODORO et al., 2017; DAVE et al., 2018; MAULINA et al., 2018; FOROUNZAFAR et al., 2020; ROCHA et al., 2020; SOUZA et al., 2021b; TERBY et al., 2021), tendo sido estudados dois tipos de situação: modelos de inflamação crônica, demonstrando a fase proliferativa da inflamação; e modelos de inflamação aguda, caracterizando a capacidade da curcumina de inibir o desenvolvimento do processo inflamatório (ARAÚJO e LEON, 2001).

Tendo em vista que muitos procedimentos odontológicos estão intimamente relacionados a processos inflamatórios, e sendo a cavidade oral um ambiente rico em microrganismos, o uso da curcumina na odontologia visando suas propriedades anti-inflamatória e antimicrobiana vem sendo objeto de estudo de muitos pesquisadores (ZHOU et al., 2013; NEELAKANTAN et al., 2015; DEVARAJ et al., 2016; THEODORO et al., 2017; MAULINA et al., 2018; FOROUNZAFAR et al., 2020; ROCHA et al., 2020; SHI et al., 2021; SOUZA et al., 2021a; SOUZA et al., 2021b; TERBY et al., 2021).

A curcumina vem sendo utilizada em pesquisas odontológicas como irrigante subgingival associada a raspagem e alisamento radicular (SIDDHARTH et al., 2020; TERBY et al., 2021), na forma de enxaguante (ROCHA et al., 2020), pasta de dente (DAVE et al., 2018) ou carregada com membranas reabsorvíveis (ANITHA et al., 2015; TERBY et al., 2021).

A aPTD empregando a curcumina como fotossensibilizador

Existe a sugestão de que a interação com a luz possa potencializar os efeitos da curcumina (DOVIGO et al., 2011) e que a mesma apresenta efeitos fototóxicos potentes ainda que em quantidades micromolares (ARAÚJO et al., 2014), o que sugere interação favorável entre a luz e a curcumina, a qual poderia ser utilizada como fotossensibilizador.

Devido a cor amarela/alaranjada da curcumina (figura 3), seu espectro de estímulo está por volta de 400-500 nm, o que corresponde a luz azul (SOUZA et al., 2021b). Esse fato é extremamente interessante para o cirurgião dentista, tendo em vista que o aparelho de LED azul é um equipamento presente no consultório odontológico para promover a polimerização de alguns materiais odontológicos rotineiramente utilizados na prática clínica, o que não implicaria na aquisição de um outro equipamento (ARAÚJO et al., 2014; SOUZA et al., 2021b)

Rocha et al., (2020) demonstraram que a associação entre um enxaguante bucal de curcumina associada a aPDT com luz de LED, foi efetiva na redução microbiana in vitro, com uma diminuição significativa na contagem de *E. coli* e *C. albicans*. (ROCHA et al., 2020). Além

da redução de microorganismos, foi comprovada a interação entre a curcumina e o aumento da diferenciação osteogênica em células provenientes do ligamento periodontal (SHI et al., 2021).

A curcumina também foi utilizada como irrigante para descontaminação da câmara pulpar e canal radicular durante o tratamento endodôntico, demonstrando resultados promissores na desinfecção, provavelmente associados a capacidade de causar danos as membranas bacterianas (NEELAKANTAN et al., 2015; DEVARAJ et al., 2016). Quando o uso intracanal foi associado à luz de LED, os resultados são ainda mais promissores (DA FROTA et al., 2015).

Foi verificado que aPDT utilizando curcumina como fotossensibilizador e o LED azul como fonte de luz se mostrou efetiva no tratamento de periodontite experimental em ratos, uma vez que houve redução da severidade do processo inflamatório e controle da perda óssea por diminuição do recrutamento e atividade dos osteoclastos (THEODORO et al., 2017)

Maulina et al., (2018) demonstraram que após a exodontia de terceiros molares impactados, os pacientes tratados com curcumina, apresentaram um bom controle do quadro doloroso e do processo inflamatório (MAULINA et al., 2018).

As principais vantagens na utilização da curcumina consistem no fato de que a mesma é economicamente vantajosa, de fácil obtenção, uso e aplicação, além de possuir alta eficiência (ARAÚJO et al., 2012).

Alguns estudos avaliam o efeito da aPDT usando a curcumina como fotossensibilizador associada ao diodo emissor de luz azul (LED) como fonte de luz (DOVIGO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012; ARAÚJO et al., 2014; LEITE et al., 2014; DA FROTA et al., 2015; PASCOAL et al., 2015; SHEEDHAR et al., 2015; THEODORO et al., 2017; ROCHA et al., 2020), nesses estudos, as propriedades da curcumina se mostraram bem estabelecidas e tem tido sucesso quando associadas ao LED.

Entretanto pouco se sabe sobre o efeito da aPDT com curcumina associada à luz de LED, sobre área de extração dental no processo de reparo alveolar em ratas com alto risco para a osteonecrose dos maxilares. Além das vantagens já atribuídas à curcumina, vale ressaltar que, em relação as fontes de luz, o LED se apresenta como ferramenta flexível, leve e está presente na rotina do consultório odontológico, podendo ser utilizado na aPDT sem requerer a aquisição de um novo equipamento (ARAÚJO et al., 2014).

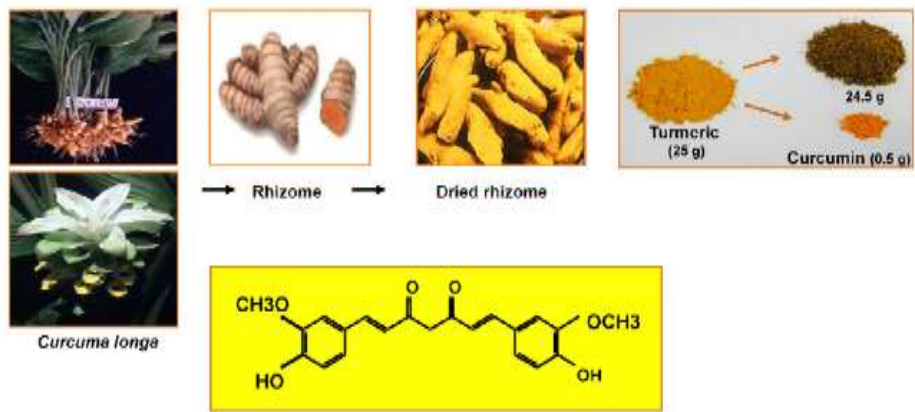


Figura 3: Extração e coloração característica da curcumina. (GOEL et al., 2008)

Objetivo

OBJETIVO

Avaliar o efeito da aPDT, empregando curcumina e LED azul, no sítio de extração dental de ratas senescentes que apresentam alto risco para a ONMM.

Material e métodos

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Todos os experimentos propostos neste projeto utilizaram animais de experimentação tendo em vista a inexistência de método alternativo. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Protocolo FOA nº 00565-2018) (anexo 1). Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Guide to the care and use of experimental animals” e “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA).

No presente estudo foram utilizadas 56 ratas senescentes (14 – 16 meses de idade) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso corporal compreendido entre 350 – 450g. Os animais foram obtidos no Biotério Central do Instituto de Biociências de Botucatu e foram mantidos no Biotério de Experimentação da Disciplina de Histologia e Embriologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP) sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, acondicionamento em gaiolas plásticas (33x40x17cm) (3 animais por gaiola), onde tiveram livre acesso ao alimento e à água.

Delineamento experimental

- Protocolo de habituação dos animais

Ao serem trazidos do Biotério Central do Instituto de Biociências de Botucatu para o Biotério de Experimentação todos os animais passaram por um período de habituação. A principal finalidade foi promover a sua familiarização com o ambiente e com o operador e minimizar o estresse provocado por algumas manobras pré-operatórias. Tal protocolo compreendeu os 21 dias que antecederam o início do delineamento dos grupos, sendo que neste período, cada animal foi suavemente manuseado entre as mãos do operador durante um intervalo de 30s, no qual regularmente foram aplicadas manobras de restrição que simularam aquelas empregadas no protocolo medicamentoso e na coleta do lavado vaginal.

- Monitoramento do ciclo estral

Os animais foram submetidos ao monitoramento do ciclo estral durante 15 dias. Para isso foi feita a coleta do lavado vaginal em lâmina de vidro e avaliação histológica. Para a coleta do lavado vaginal empregou-se uma pipeta confeccionada em tubo de látex acoplada em ponteira de polietileno com capacidade de cerca de 0,3 ml (VILELA et al., 2007). A amostra coletada foi depositada em lâmina de vidro e submetida à coloração com hematoxilina, eosina, e orange G. Tais amostras foram submetidas à avaliação histológica em microscópio óptico.

Dentre os critérios de inclusão dos animais no estudo estavam, além da idade cronológica avançada, ter atingido a senescência reprodutiva. Em sendo assim foram empregadas apenas ratas acíclicas.

- Anestesia

Para a instalação da ligadura, execução da exodontia, tratamento com curcumina ou aPDT e eutanásia, os animais foram anestesiados via injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil).

- Periodontite induzida por ligadura

Um dia antes do início do plano de tratamento medicamentoso foi instalada uma ligadura de algodão (fio de algodão #24; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. A ligadura foi mantida durante três semanas com o intuito de induzir periodontite experimental (STATKIEVICZ et al., 2018; ERVOLINO et al., 2019; TORO et al., 2019) (figura 4 -A e B).

- Protocolo medicamentoso

O plano de tratamento medicamentoso teve uma duração total de 7 semanas (figura 5). A administração de veículo ou zoledronato (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) ocorreu pela via intraperitoneal a cada três dias. A dose de zoledronato foi de 100µg/Kg, o qual foi diluído em 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%. A dose de zoledronato e o plano de tratamento medicamentoso consistiram em uma adaptação para o rato do protocolo empregado atualmente para terapia oncológica de humanos (STATKIEVICZ et al., 2018; ERVOLINO et al., 2019; TORO et al., 2019).

- Exodontia

Os animais foram posicionados adequadamente em mesa cirúrgica, foi executada a anti-sepsia da cavidade bucal, sindesmotomia, luxação e extração do primeiro molar inferior esquerdo com a utilização de instrumentais odontológicos adaptados (STATKIEVICZ et al., 2018; ERVOLINO et al., 2019; TORO et al., 2019) (figura 4-C).

- Preparação da curcumina

A curcumina (*Curcuma longa*, 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl 1,6-heptadiene-3,5dione, Diferuloylmethane, Diferulylmethane - C1386 - Sigma Aldrich) que foi empregada no presente estudo, seja a que foi aplicada topicamente de modo isolado no sítio de extração dental, ou a que foi utilizada na terapia fotodinâmica antimicrobiana, como um fotossensibilizador associado ao LED azul, foi solubilizada em 99,9% de etanol absoluto e 0,1% de dimetil sulfóxido (DMSO) com a finalidade de se obter uma solução contendo 100 mg/ml de curcumina. Em seguida, a partir de tal solução foi feita uma diluição em água destilada para a obtenção de uma solução para uso contendo 100 µg/l de curcumina (Anexo 2) (THEODORO et al., 2017; RICCI DONATO et al., 2017; IVANAGA et al., 2019).

- Tratamento local com curcumina e/ou LED azul

Nos grupos tratados com curcumina foi empregada em cada sessão 500 µl desta solução, a qual foi cuidadosamente depositada no sítio de extração dental e adjacências durante 60 segundos (figura 4 - E e F). Nos grupos VEI-CUR e ZOL-CUR, após este intervalo de tempo, apenas o excesso de curcumina foi removido com auxílio de algodão. Nos grupos VEI-aPDT e ZOL-aPDT, após este intervalo de tempo, conhecido como tempo de pré-irradiação, foi realizada a irradiação (figura 4 - G e H). A luz que foi utilizada no presente estudo para a realização da aPDT foi o LED azul (Kon-lux Kondortech Dental Equipment Ltda, São Carlos, São Paulo, Brasil), com os seguintes parâmetros: comprimento de onda: 468-485 nm; potência: 200 mW; modo de operação: luz contínua; área: 0,78 cm²; dose: 15 J/cm²; quantidade de pontos de aplicação: 1; tempo de exposição: 60 segundos (THEODORO et al., 2017; IVANAGA et al., 2019). O LED foi aplicado em um único ponto no centro do alvéolo com a ponteira posicionada paralelamente ao seu longo eixo e em contato com a área tratada. Nos grupos VEI-LED e ZOL-LED a irradiação foi realizada como descrito acima, no entanto, não houve deposição local prévia da curcumina (THEODORO et al., 2017; IVANAGA et al., 2019).

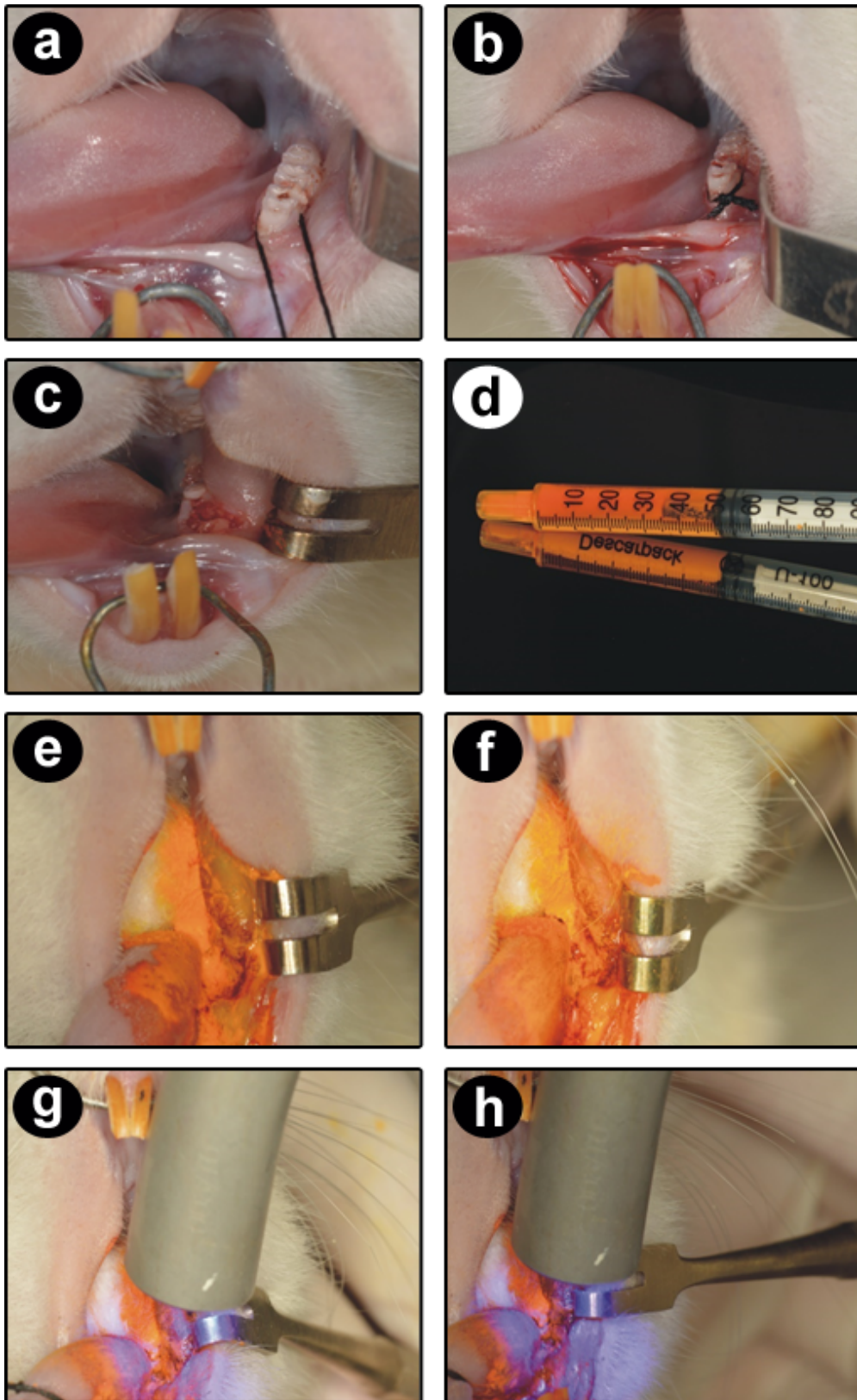


Figura 4: Fotos dos procedimentos realizados ao longo do experimento. A e B, instalação da ligadura; C, sítio de exodontia; D, 0,5ml de curcumina a serem depositados na ferida cirúrgica; E e F, deposição da curcumina sobre a área de exodontia; G e H, aPDT utilizando a curcumina como fotossensibilizador e a luz de LED (Fonte: Autoria Própria)

- Eutanásia

Os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca inicialmente com solução salina fisiológica (30ml / minuto), seguida de solução fixadora de formaldeído a 4%, em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, durante 30 minutos.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 8 grupos, cada um composto de 7 animais:

Grupo VEI: receberam uma injeção intraperitoneal de 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% a cada 72 horas, durante sete semanas. Ao completarem a terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e decorridos 28 dias pós-operatórios foram submetidos à eutanásia.

Grupo ZOL: receberam uma injeção intraperitoneal de 0,45 ml de zoledronato diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% a cada 72 horas, durante sete semanas. Ao completarem a terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e decorridos 28 dias pós-operatórios foram submetidos à eutanásia.

Grupo VEI-CUR: receberam uma injeção intraperitoneal de 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% a cada 72 horas, durante sete semanas. Ao completarem a terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Neste grupo aos 0, 2, 4 e 6 dias pós-operatórios foi realizada apenas a deposição da curcumina sobre o sítio de extração e mucosa sobrejacente por 60 segundos. A eutanásia foi realizada 28 dias após a exodontia.

Grupo ZOL-CUR: receberam uma injeção intraperitoneal de 0,45 ml de zoledronato diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% a cada 72 horas, durante sete semanas. Ao completarem a terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Neste grupo aos 0, 2, 4 e 6 dias pós-operatórios foi realizada apenas a deposição da curcumina sobre o sítio de extração e mucosa sobrejacente por 60 segundos. A eutanásia foi realizada 28 dias após a exodontia.

Grupo VEI-LED: receberam uma injeção intraperitoneal de 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% a cada 72 horas, durante sete semanas. Ao completarem a terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Neste grupo aos 0, 2, 4 e 6 dias pós-operatórios foi realizada apenas a irradiação do sítio de extração e mucosa sobrejacente com LED azul por 60 segundos. A eutanásia foi realizada 28 dias após a exodontia.

Grupo ZOL-LED: receberam uma injeção intraperitoneal de 0,45 ml de zoledronato diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% a cada 72 horas, durante sete semanas. Ao completarem a terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Neste grupo aos 0, 2, 4 e 6 dias pós-operatórios foi realizada apenas a irradiação do sítio de extração e mucosa sobrejacente com LED azul por 60 segundos. A eutanásia foi realizada 28 dias após a exodontia.

Grupo VEI-aPDT: receberam uma injeção intraperitoneal de 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% a cada 72 horas, durante sete semanas. Ao completarem a terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Neste grupo aos 0, 2, 4 e 6 dias pós-operatórios foi realizada terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no sítio de extração e mucosa sobrejacente. A eutanásia foi realizada 28 dias após a exodontia.

Grupo ZOL-aPDT: receberam uma injeção intraperitoneal de 0,45 ml de zoledronato diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% a cada 72 horas, durante sete semanas. Ao completarem a terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Neste grupo aos 0, 2, 4 e 6 dias pós-operatórios foi realizada a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no sítio de extração e mucosa sobrejacente. A eutanásia foi realizada 28 dias após a exodontia.

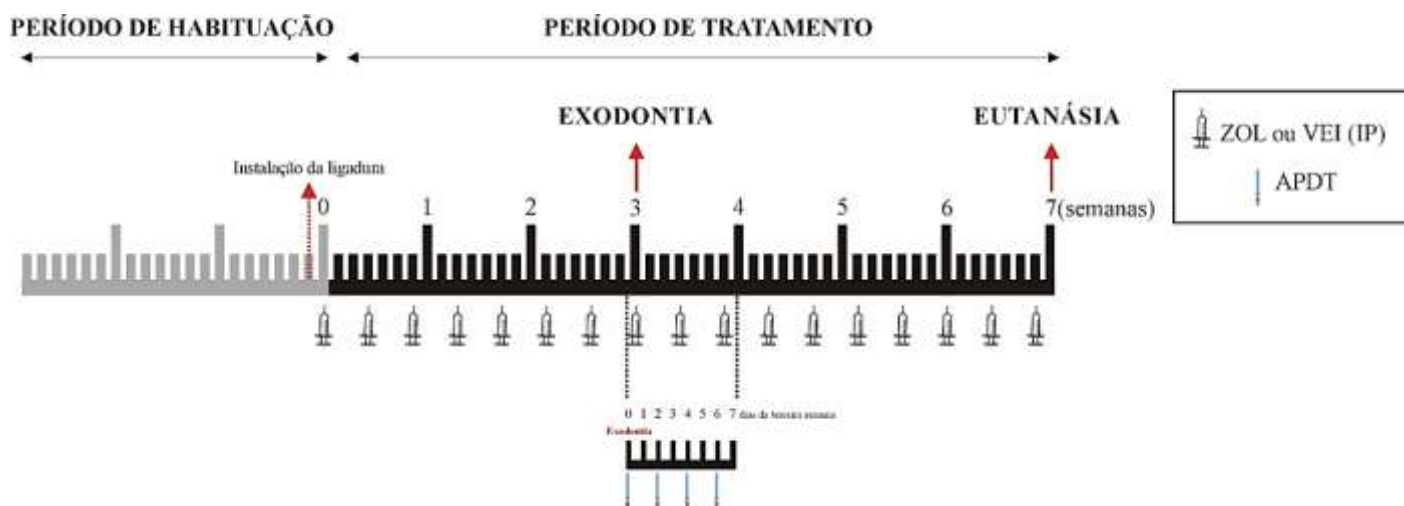


Figura 5: Resumo do protocolo experimental ao qual foram submetidos os diferentes grupos. As representações de seringas ilustram os dias em que foram feitas as aplicações de zoledronato ou do veículo por via intraperitoneal, as representações de LED, demonstram os dias em que foram feitas as sessões de aPDT. Abreviações: aPDT, terapia fotodinâmica antimicrobiana; IP, injeção intraperitoneal; VEI, solução de cloreto de sódio 0,9%; ZOL, zoledronato (Fonte: Autoria Própria).

Processamento histológico das amostras

- Preparado histológico com desmineralização

Após a eutanásia, as hemi-mandíbulas foram cuidadosamente dissecadas e submetidas à pós-fixação em formaldeído durante 24 horas.

As hemi-mandíbulas pós-fixadas foram submetidas à lavagem em água corrente por 12 horas e 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 desmineralização, as amostras foram novamente submetidas à lavagem em água corrente por 24 horas.

Na sequência foi realizado o processamento histológico convencional para microscopia de luz, através da desidratação em série crescente de etanol (70°GL, 60 minutos; 80°GL, 30 minutos; 90°GL, 30 minutos; 95°GL, 60 minutos; 100°GL-I, 60 minutos; 100°GL-II, 60 minutos; 100°GL-III, 60 minutos), diafanização em sequência de xilol (etanol / xilol, 60 minutos; xilol-I, 40 minutos, xilol-II, 40 minutos; xilol-III, 40 minutos), impregnação pela parafina histológica em série (parafina-I, 60 minutos; parafina-II, 60 minutos; parafina-III, 60 minutos) e, por fim, inclusão na parafina histológica. As amostras foram incluídas de modo que a face lingual do segundo molar inferior esquerdo ficasse paralela com a superfície do bloco de parafina (figura 6A – traço azul).

A microtomia foi executada seguindo um plano de corte que progrediu de lingual para vestibular. Foram coletados 13 cortes seriados da porção do alvéolo dental anteriormente ocupada pela raiz mesial e pela raiz distal do primeiro molar inferior esquerdo, tendo como orientação as raízes do segundo molar (figura 6A – traçado vermelho). As secções histológicas correspondentes à porção central da loja cirúrgica foram devidamente coletadas em lâminas de vidro (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais) impregnadas por polilisina, ou em lâminas de vidro silanizadas (Platinum Line® StarFrost, Mercedes Medical LLC., Sarasota/FL, EUA).

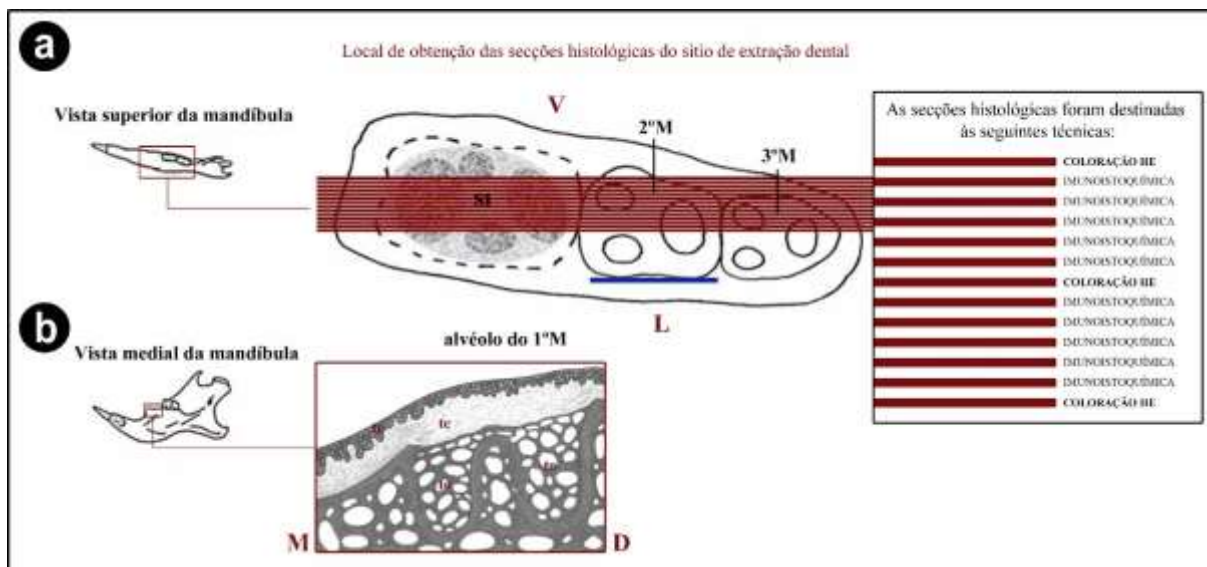


Figura 6: Resumo evidenciando a região de obtenção dos cortes histológicos (a) e a área de análise (b). Abreviações: AON, área de osso neoformado; D, face distal; L, face lingual; M, face mesial; SI, septo interradicular; TC, tecido conjuntivo; TE, tecido epitelial; V, face vestibular (Fonte: Autoria Própria).

- Coloração pela hematoxilina-eosina (HE)

Para a análise histopatológica, análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF) e análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo não vital (TONV), as seções histológicas foram submetidas à coloração pela HE. Para isso, as seções histológicas coletadas em lâminas de vidro convencionais para microscopia passaram pelo processo de desparafinização inicial em estufa com temperatura controlada (56°C a 58°C), durante 30 minutos, seguida pela desparafinização completa em sequência de xilol (xilol-I, 5 minutos; xilol-II, 5 minutos; xilol-III, 10 minutos), hidratação em série decrescente de etanol (100°GL-I, 2 minutos; 100°GL-II, 2 minutos; 100°GL-III, 2 minutos; 95°GL, 2 minutos; 70°GL, 2 minutos), lavagem em água, imersão em Hematoxilina por 45 segundos, lavagem em água, imersão em eosina acrescida de floxina por 3 minutos, lavagem em água, desidratação em série crescente de etanol (70°GL, 1 minuto; 90°GL, 1 minuto; 95°GL, 1 minuto; 100°GL-I, 1 minuto; 100°GL-II, 1 minuto; 100°GL-III, 1 minuto), diafanização em sequência de xilol (etanol /xilol, 1 minuto; xilol-I, 5 minutos; xilol-II, 5 minutos; xilol-III, 5 minutos) e, por fim, recobrimento com meio de montagem (Permount®, Fisher Scientific Company LLC., San Diego/CA, EUA) e proteção com lamínulas de vidro (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais).

- Imunoistoquímica

Para a análise imunoistoquímica, as secções histológicas coletadas em lâminas de vidro silanizadas para microscopia foram submetidas à reação imunoistoquímica pela técnica da imunoperoxidase indireta.

Para isso, tais secções histológicas foram submetidas à desparafinização inicial em estufa com temperatura controlada (56°C a 58°C), durante aproximadamente 30 minutos, seguida pela desparafinização completa em sequência de xilol (xilol-I, 5 minutos; xilol-II, 5 minutos; xilol-III, 10 minutos) e hidratação pelo etanol em série decrescente (100°GL-I, 2 minutos; 100°GL-II, 2 minutos; 100°GL-III, 2 minutos; 95°GL, 2 minutos; 70°GL, 2 minutos). A partir desta e previamente às próximas etapas da reação imunoistoquímica, os cortes histológicos foram lavados em PBS durante 5 minutos, PBS acrescido de 0,05% de Triton® X-100 (Sigma-Aldrich Co.) durante 5 minutos, e em PBS, novamente, durante mais 5 minutos.

A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato 10mM e pH 6,0 (Antigen Retrieval Buffer 1, 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 durante 5 minutos, seguida pelo resfriamento gradual até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram imersas em solução constituída de 3% de peróxido de hidrogênio em PBS durante 60 minutos, e em solução constituída de 4% de leite em pó desnatado em PBS durante 60 minutos, 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 durante 12 horas. As lâminas contendo as amostras de cada grupo experimental foram divididas em lotes, sendo que cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-VEGF do rato gerado em camundongo (SC-7269, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-TGFβ1 do rato gerado em coelho (SC-146, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-BMP 2/4 do rato gerado em coelho (SC-9003, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e anti-OCN do rato gerado em cabra (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado 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 foi realizada utilizando-se como cromógeno o composto 3,3'-diaminobenzidina (K3468; Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako North America Inc.). Para a contracoloração, os espécimes foram então lavados em água, imersos em hematoxilina de Harris por 10 segundos, lavados em água para retirada do excesso de corante, desidratados pelo etanol em série crescente (70°GL, 2 minutos; 95°GL, 2 minutos; 100°GL-I, 2 minutos; 100°GL-II, 2 minutos; 100°GL-III, 2 minutos), diafanizados em sequência de xilol (etanol 100°GL 50%/xilol 50%, 2 minutos; xilol-I, 5 minutos; xilol-II, 5 minutos; xilol-III, 10 minutos), recobertos pelo meio de montagem (Permount®, Fisher Scientific Company LLC) e protegidos com lamínulas de vidro (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais). Como controle negativo da reação, as secções histológicas foram submetidas às mesmas etapas descritas, suprimindo-se apenas a utilização dos respectivos anticorpos primários. Todas as etapas da reação imunoistoquímica basearam-se no protocolo descrito por Ervolino et al. (2019) e Garcia et al. (2014).

Análise das amostras

Para análise histopatológica foi analisada toda a área da mandíbula que continha o sítio de extração dental. Esta área compreendia o sítio de extração dental anteriormente ocupado pela raiz mesial e pela raiz distal do primeiro molar inferior, o tecido ósseo imediatamente adjacente a tais regiões e os tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração dental (figura 7 - a)

Nesta região foram avaliados os seguintes parâmetros: a) intensidade da resposta inflamatória local, categorizada em: (1) ausência de inflamação, (2) pequena quantidade de células inflamatórias, (3) moderada quantidade de células inflamatórias, (4) grande quantidade de células inflamatórias; b) extensão do processo inflamatório, categorizado em: (1) ausência de inflamação, (2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo, (3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo, sem atingir o tecido ósseo, (4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo; c) padrão de celularidade e de estruturação do tecido epitelial, categorizado em: (1) tecido epitelial de moderada espessura recobrimo completamente o sítio de extração, (2) tecido epitelial de delgada espessura recobrimo completamente o sítio de extração, (3) delgada camada de tecido epitelial apenas nas margens da ferida cirúrgica aberta, (4) ausência de tecido epitelial sobre a ferida cirúrgica aberta; d) padrão de celularidade e de estruturação do tecido conjuntivo, categorizado em: (1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas, (2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto

de fibras colágenas, (3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas, (4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose tecidual.

Para as análises histométricas da porcentagem de TONF e TONV foram capturadas imagens de quatro regiões via utilização de uma câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) acoplada ao microscópio óptico (Axiolab, Carl Zeiss) e conectada a um microcomputador. As regiões de captura são: 1) sítio de extração anteriormente ocupado pela raiz mesial do primeiro molar inferior; 2) sítio de extração anteriormente ocupado pela raiz distal do primeiro molar inferior; 3) tecido ósseo situado no septo interradicular e; 4) tecido ósseo situado na área desdentada localizada imediatamente a frente do primeiro molar inferior.

As regiões 1 e 2 foram empregadas para avaliação da porcentagem de TONF no interior dos alvéolos dentais (figura 7 - b). Para tal avaliação dois retângulos foram posicionados um no centro do sítio de extração da raiz mesial e outro no centro do sítio de extração da raiz distal do primeiro molar inferior. A base maior de tais retângulos acompanhava o longo eixo de tais raízes. Os retângulos tinham como limite apical a base dos alvéolos dentais.

As regiões 3 e 4 foram empregadas para mensurar a porcentagem de TONV nas adjacências do sítio de extração dental (figura 7 - c). Para tal avaliação dois retângulos foram posicionados um no centro do septo interradicular, sendo que a base maior de tal retângulo acompanhava o longo eixo de tais raízes, e um outro no tecido ósseo situado na área desdentada imediatamente a frente do sítio de extração anteriormente ocupado pela raiz mesial do primeiro molar inferior, sendo que a base maior de tal retângulo acompanhava a crista óssea alveolar. Cada um destes retângulos apresentava 710 μ m de altura e 530 μ m de largura, perfazendo uma área de 0.38mm². Como o sítio de extração dental e adjacências foram avaliadas em quatro regiões, a área total avaliada no presente estudo foi de 1,52mm².

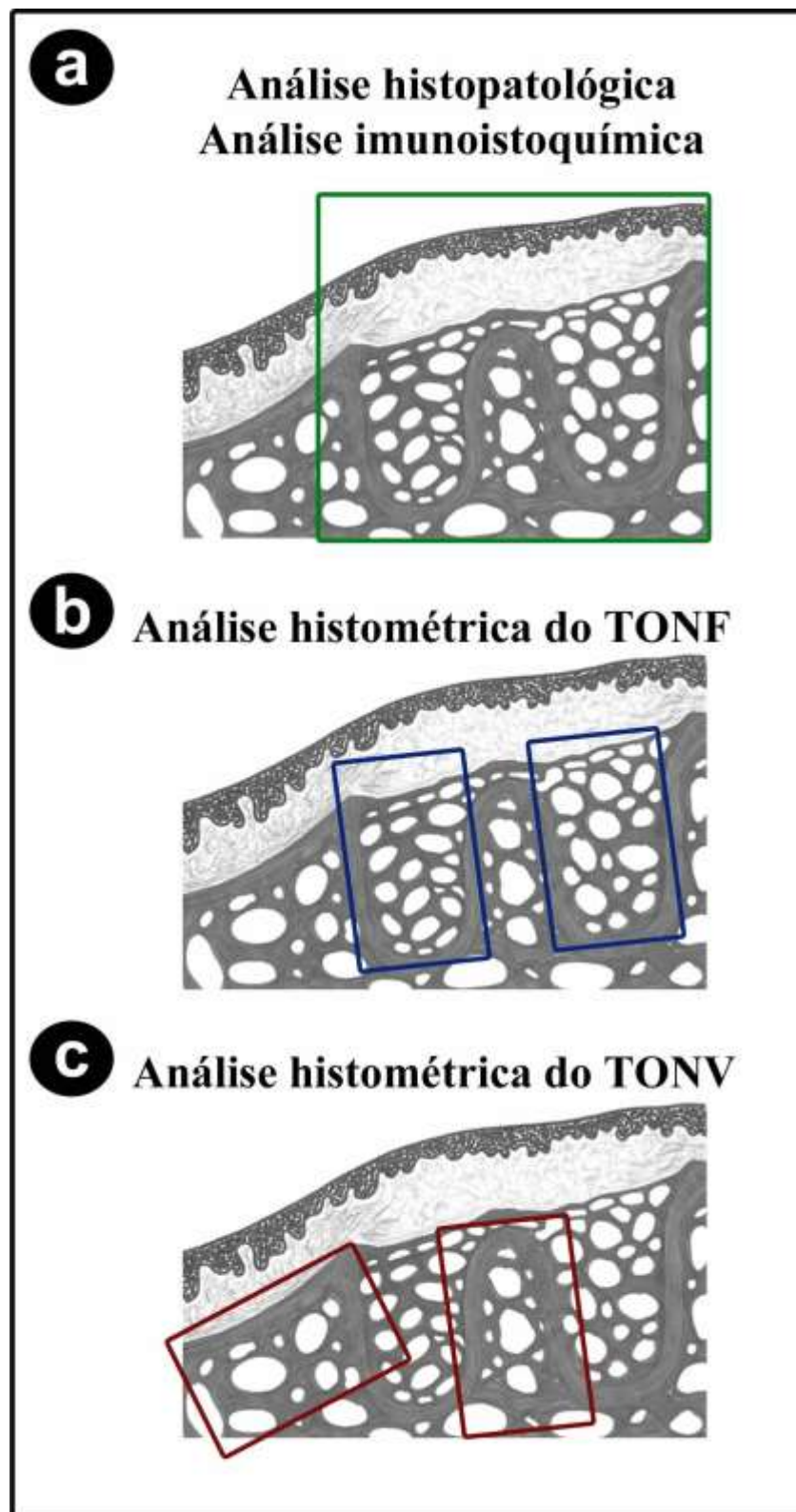


Figura 7: Regiões capturadas para análise. a - Análise histopatológica da reparação tecidual; b - Análise histométrica da porcentagem de TONF; c - Análise histométrica da porcentagem de TONV (Fonte: Autoria Própria).

Com o auxílio do programa de análise de imagens ImageJ foi delimitada na região 1 e 2 a área ocupada por TONF e na região 2 e 3 a área ocupada por TONV. A porcentagem de TONF

foi expressa como a porcentagem da área total ocupada por TONF. A porcentagem de TONV foi expressa como a porcentagem de tecido ósseo não vital em relação à porcentagem de tecido ósseo. Ambas as mensurações foram expressas como média \pm desvio padrão.

Para análise imunoistoquímica de VEGF, TGF β 1, BMP2/4 e OCN foi analisada toda a área da mandíbula que continha o sítio de extração dental, compreendendo a mesma região que foi efetuada a análise histopatológica (figura 7 - a).

Nesta região foi efetuada uma análise semi-quantitativa do padrão de imunomarcção para VEGF, TGF β 1, BMP2/4 e OCN, onde: ESCORE 0, imunomarcção nula, ausência de células imunorreativas e ausência de imunomarcção na matriz extracelular; ESCORE 1, baixo padrão de imunomarcção, aproximadamente 20% das células imunorreativas e fraca marcação na matriz extracelular; ESCORE 2, aproximadamente 40% das células imunorreativas e fraca marcação na matriz extracelular, ESCORE 3, aproximadamente 60% das células imunorreativas e moderada ou forte marcação na matriz extracelular.

Análise estatística dos dados

Empregou-se o programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamiruaá, Manaus, AM, Brasil). Para a análise dos pesos dos animais foi empregado o teste de variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's. Para a análise histopatológica e análise imunoistoquímica foram empregados os testes de Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. Para a análise histométrica da porcentagem de TONF e TONV foram empregados os testes de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$).

Resultados

RESULTADOS

Condições gerais de saúde e exame clínico intrabucal

As condições gerais e o peso corporal dos animais dos grupos VEI, VEI-CUR, VEI-LED, VEI-aPDT, ZOL-CUR e ZOL-aPDT se mantiveram dentro de um padrão de normalidade e constantes durante todo o período experimental. Os animais do grupo ZOL e ZOL-LED apresentaram uma leve diminuição no peso corporal, especialmente após a exodontia, a qual se manteve até o final do período experimental (Gráfico 1).

Ao exame clínico intrabucal, em ZOL e ZOL-LED observou-se uma loja cirúrgica mais ampla que nos demais grupos experimentais, cuja mucosa sobrejacente não se reconstituiu. Em alguns espécimes destes grupos havia exposição óssea e ampliação ainda maior do sítio de extração. Nos grupos VEI, VEI-CUR, VEI-LED, VEI-aPDT, ZOL-CUR 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.

GRÁFICO 1 - PESO DOS ANIMAIS AO LONGO DO EXPERIMENTO

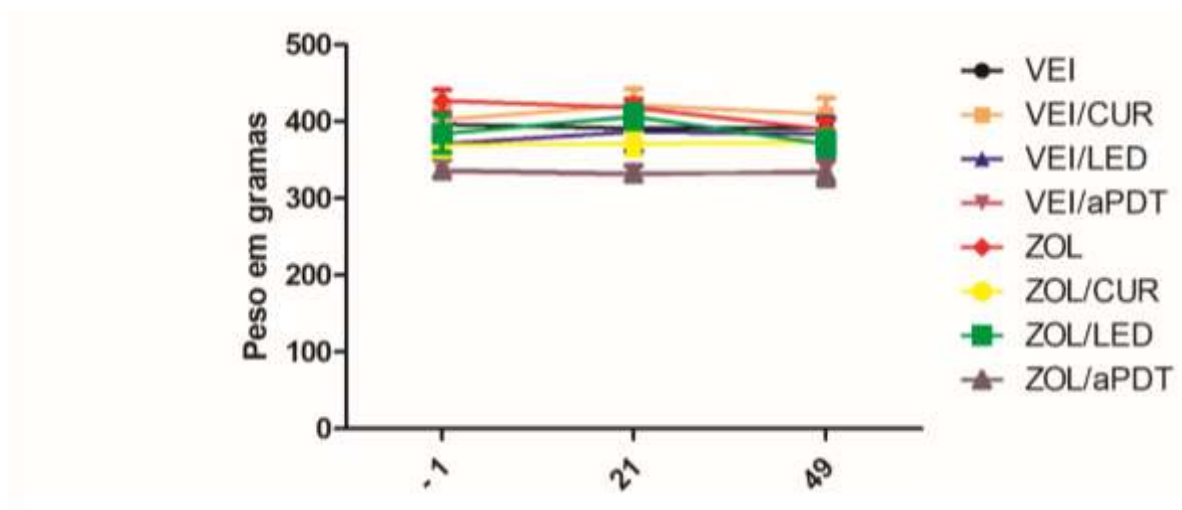


Gráfico 1: Peso de todos os animais no dia da execução da ligadura (-1), exodontia (21) e eutanásia (49). Linha preta: Grupo VEI; Linha laranja: Grupo VEI-CUR; Linha azul: Grupo VEI-LED; Linha rosa: Grupo VEI-aPDT; Linha vermelha: Grupo ZOL; Linha amarela: Grupo ZOL-CUR; Linha verde: Grupo ZOL-LED; Linha roxa: Grupo ZOL-aPDT.

Análise histopatológica: nível de inflamação tecidual

Os parâmetros avaliados, os escores atribuídos e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do nível de inflamação dos tecidos aos 28 dias pós-operatórios nos diferentes grupos experimentais estão apresentados na Tabela 1. Nos grupos tratados com

o veículo, VEI, VEI-CUR, VEI-LED, VEI-aPDT, observou-se ausência de inflamação no sítio de extração dental e mucosa sobrejacente aos 28 dias pós-operatórios (MEDIANA 1). Nos grupos ZOL e ZOL-LED observou-se uma grande quantidade de células inflamatórias (MEDIANA 4), as quais se estendiam por todo o tecido conjuntivo e ósseo (MEDIANA 4) situados no sítio de extração dental. Nestes grupos constatou-se maior intensidade na resposta inflamatória local, assim como, maior extensão do infiltrado inflamatório quando comparado com os grupos tratados com o veículo. No grupo ZOL-CUR observou-se pequena quantidade de células inflamatórias (MEDIANA 2), as quais se estendiam apenas pelo tecido conjuntivo (MEDIANA 2) situado na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental. Neste grupo a intensidade da resposta inflamatória local e a extensão do processo inflamatório foi maior que nos grupos tratados com o veículo. No grupo ZOL-aPDT a maior parte dos espécimes apresentou ausência de inflamação no sítio de extração dental (MEDIANA 1). Neste grupo a intensidade da resposta inflamatória local e a extensão do processo inflamatório foi menor que nos grupos ZOL e ZOL-LED, além disso, não houve diferença significativa com o grupo ZOL-CUR e com os grupos tratados com o veículo.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA: NÍVEL DE INFLAMAÇÃO TECIDUAL								
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	NÚMERO DE ESPÉCIMES							
	GRUPOS EXPERIMENTAIS							
	VEI	ZOL	VEI-CUR	ZOL-CUR	VEI-LED	ZOL-LED	VEI-aPDT	ZOL-aPDT
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL								
(1) ausência de inflamação	6		7		6		7	5
(2) pequena quantidade de células inflamatórias	1			7	1			2
(3) moderada quantidade de células inflamatórias		1				2		
(4) grande quantidade de células inflamatórias		6				5		
MEDIANA	1	4^a	1^b	2^{ac}	1^{bd}	4^{ace}	1^{bdf}	1^{bf}
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO								
(1) ausência de inflamação	6		7		6		7	5
(2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo	1			7	1			2
(3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo, sem atingir o tecido ósseo						1		
(4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo		7				6		
MEDIANA	1	4^a	1^b	2^{ac}	1^{bd}	4^{ace}	1^{bdf}	1^{bf}

Tabela 1: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histológica do nível de inflamação dos tecidos aos 28 dias pós-operatórios nos diferentes grupos experimentais. As letras indicam diferença significativa em relação ao grupo: **a**, VEI; **b**, ZOL; **c**, VEI-CUR; **d**, ZOL-CUR; **e**, VEI-LED; **f**, ZOL-LED; **g**, VEI-aPDT.

Análise histopatológica: padrão de estruturação tecidual da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental

Os parâmetros avaliados, os escores atribuídos e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do nível de inflamação dos tecidos aos 28 dias pós-operatórios nos diferentes grupos experimentais estão apresentados na Tabela 2. No grupo VEI e no grupo ZOL-CUR a maior parte dos espécimes apresentaram um tecido epitelial de delgada espessura recobrimdo completamente o sítio de extração dental (MEDIANA 2) e uma moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas na lâmina própria (MEDIANA 2).

Nos grupos VEI-CUR, VEI-LED e VEI-aPDT observou-se um tecido epitelial de moderada espessura recobrimdo completamente o sítio de extração dental (MEDIANA 1) e um tecido conjuntivo denso na lâmina própria (MEDIANA 1). Não houve diferença significativa no padrão de celularidade e de estruturação do tecido epitelial e do tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental entre os grupos tratados com o veículo. Nos grupos ZOL e ZOL-LED, na maioria das amostras, observou-se ausência de tecido epitelial sobre a ferida cirúrgica (MEDIANA 4) e uma severa desestruturação do tecido conjuntivo (MEDIANA 4). Não houve diferença significativa em tais parâmetros entre ZOL e ZOL-LED. Estes grupos apresentaram um maior comprometimento do tecido epitelial e do tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental quando comparados com os demais grupos experimentais.

No grupo ZOL-aPDT a maior parte dos espécimes apresentou um tecido epitelial de delgada espessura recobrimdo completamente o sítio de extração dental (MEDIANA 2) e uma moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas na lâmina própria (MEDIANA 2). Este grupo não apresentou diferença significante quando comparado com o grupo ZOL-CUR e com os grupos tratados com o veículo, exceto pelo fato de ter apresentado um pior padrão de celularidade e de estruturação do tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental quando comparado com o grupo VEI-aPDT.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA: PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO TECIDUAL DA MUCOSA SOBREJACENTE AO SÍTIO DE EXTRAÇÃO DENTAL								
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	NÚMERO DE ESPÉCIMES							
	GRUPOS EXPERIMENTAIS							
	VEI	ZOL	VEI-CUR	ZOL-CUR	VEI-LED	ZOL-LED	VEI-aPDT	ZOL-aPDT
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO EPITELIAL								
(1) tecido epitelial de moderada espessura recobrimdo completamente o sítio de extração	3		4		4		6	2
(2) tecido epitelial de delgada espessura recobrimdo completamente o sítio de extração	4		3	7	3		1	5
(3) delgada camada de tecido epitelial apenas nas margens da ferida cirúrgica aberta		1				1		
(4) ausência de tecido epitelial sobre a ferida cirúrgica aberta		6				6		
MEDIANA	2	4 ^a	1 ^b	2 ^b	1 ^b	4 ^{acde}	1 ^{bdf}	2 ^{bf}
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO								
(1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas	3		4		4		6	
(2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	4		3	6	3		1	6
(3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas		1		1		1		1
(4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose tecidual		6				6		
MEDIANA	2	4 ^a	1 ^b	2 ^b	1 ^b	4 ^{acde}	1 ^{bdf}	2 ^{bfg}

Tabela 2: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histológica do padrão de estruturação tecidual da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios nos diferentes grupos experimentais. As letras indicam diferença significativa em relação ao grupo: **a**, VEI; **b**, ZOL; **c**, VEI-CUR; **d**, ZOL-CUR; **e**, VEI-LED; **f**, ZOL-LED; **g**, VEI-aPDT.

Porcentagem de TONF no sítio de extração dental

A porcentagem de TONF em todos os grupos experimentais está apresentada no Gráfico 2. O grupo VEI-aPDT apresentou maior porcentagem de TONF quando comparado com os demais grupos experimentais. Não houve diferença estatística na porcentagem de TONF entre VEI, VEI-CUR e VEI-LED. Os grupos ZOL e ZOL-LED apresentaram menor porcentagem de TONF quando comparados com os demais grupos experimentais. Não houve diferença significativa na porcentagem de TONF entre ZOL e ZOL-LED. A porcentagem de TONF em ZOL-CUR foi menor que nos grupos tratados com o veículo. O grupo ZOL-aPDT apresentou maior porcentagem de TONF quando comparado com o ZOL-CUR. Neste grupo a porcentagem de TONF foi menor que no grupo VEI-CUR, no entanto, não houve diferença significativa quando comparado com VEI e VEI-LED (Figura 9).

GRÁFICO 2 - PORCENTAGEM DE TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO

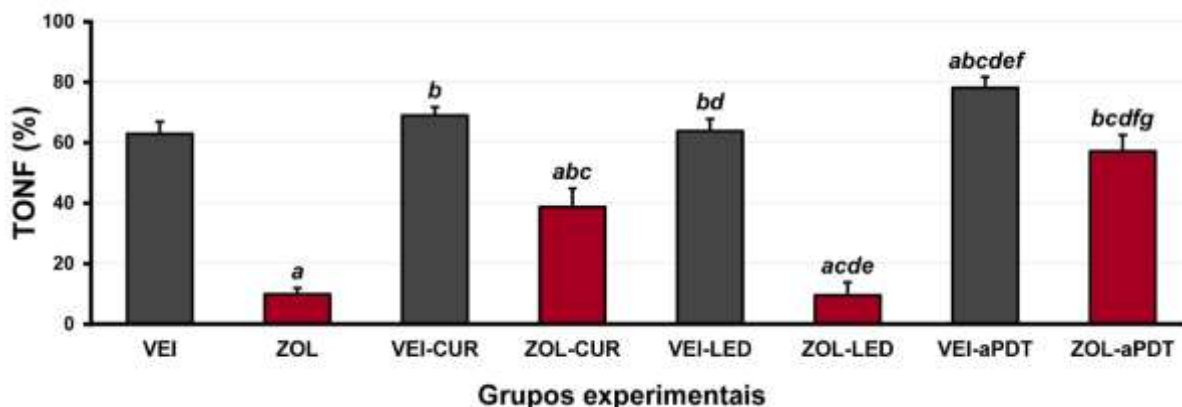


Gráfico 2: Porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF) no sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos diferentes grupos experimentais. As letras indicam diferença significativa em relação ao grupo: a, VEI; b, ZOL; c, VEI-CUR; d, ZOL-CUR; e, VEI-LED; f, ZOL-LED; g, VEI-aPDT.

Porcentagem de TONV nas adjacências do sítio de extração dental

A porcentagem de TONV em todos os grupos experimentais está apresentada no Gráfico 3. Não houve diferença significativa na porcentagem de TONV entre os grupos tratados com o veículo. Os grupos ZOL e ZOL-LED apresentaram maior porcentagem de TONV quando comparados com os demais grupos experimentais. Não houve diferença significativa na porcentagem de TONV entre ZOL-CUR e ZOL-aPDT, no entanto, estes grupos apresentaram maior porcentagem de TONV quando comparados com os grupos tratados com o veículo (Figura 8).

GRÁFICO 3 - PORCENTAGEM DE TECIDO ÓSSEO NÃO VITAL

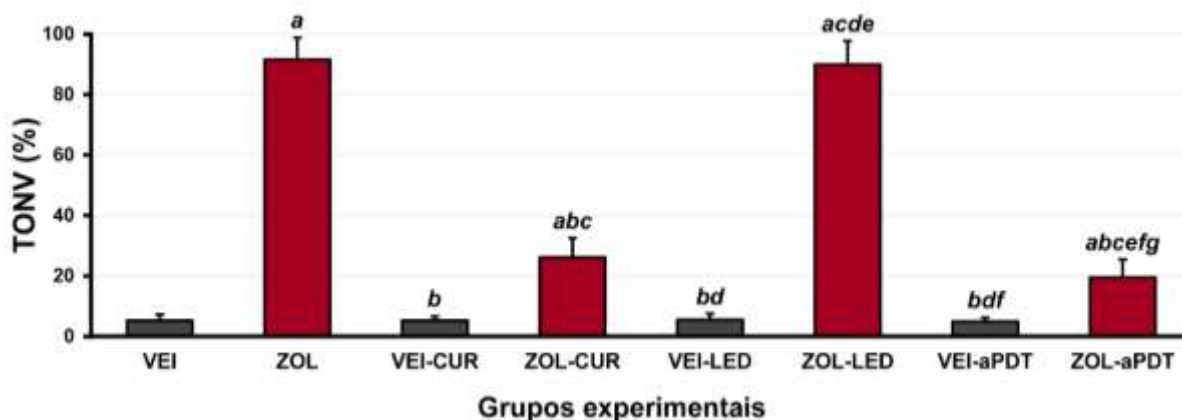


Gráfico 3: Porcentagem de tecido ósseo não vital (TONV) nas adjacências do sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos diferentes grupos experimentais. As letras indicam diferença significativa em relação ao grupo: a, VEI; b, ZOL; c, VEI-CUR; d, ZOL-CUR; e, VEI-LED; f, ZOL-LED; g, VEI-aPDT.

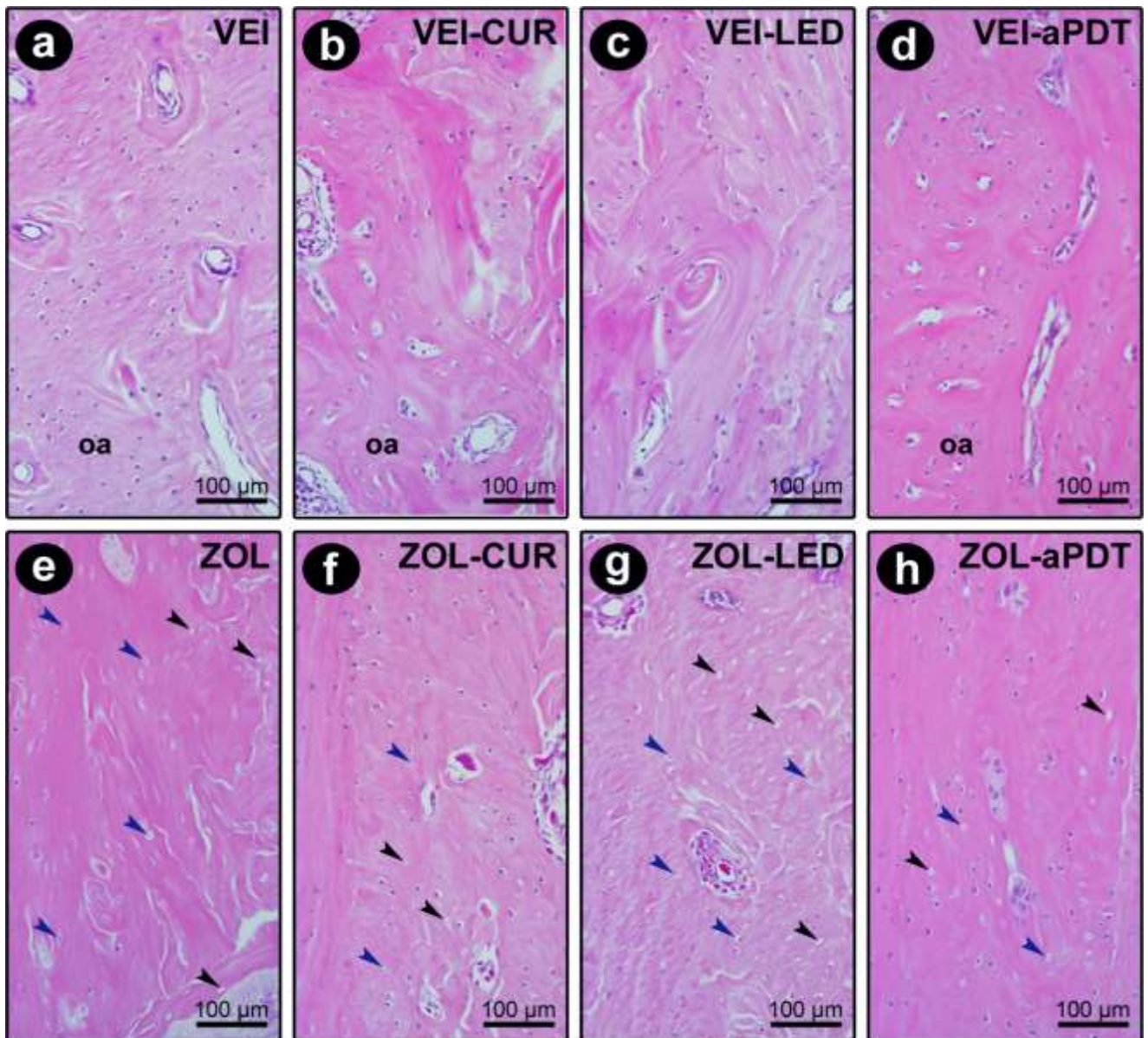


Figura 8: Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo adjacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), ZOL (b), VEI-CUR (c), ZOL-CUR (d), VEI-LED (e), ZOL-LED (d), VEI-aPDT (g) e ZOL-aPDT (h). Observar a grande quantidade de tecido ósseo não vital presente nos grupos ZOL e ZOL-LED. Nestes grupos observa-se grande quantidade de lacunas vazias (setas pretas) ou ocupadas por remanescentes de osteócitos (setas azuis), o que também é evidenciado, no entanto, em proporções muito menores, nos grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT. Abreviações e símbolos: setas pretas, lacunas vazias; setas azuis, lacunas contendo remanescente de osteócitos. Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm.

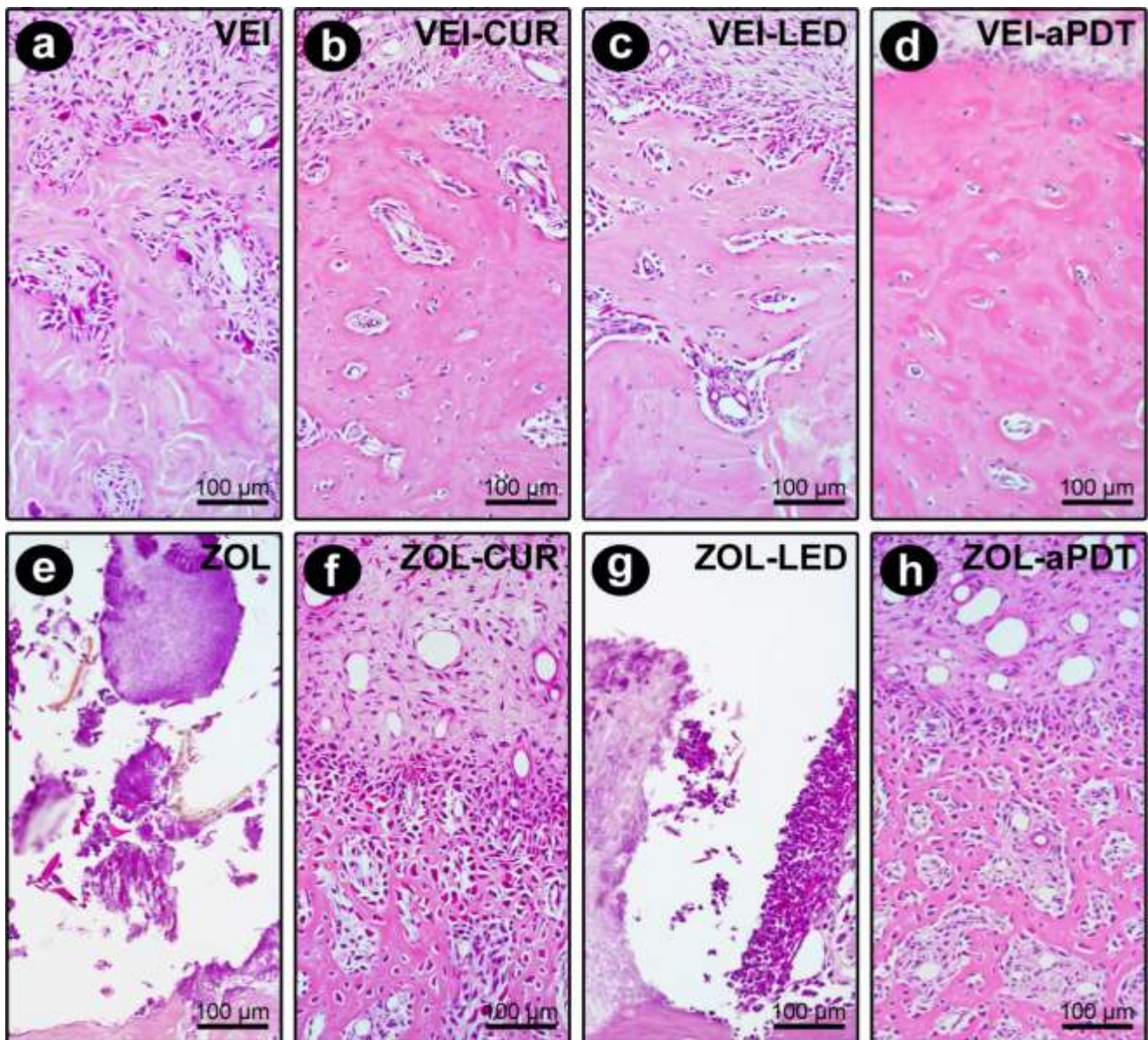


FIGURA 9: Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido ósseo no interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), ZOL (b), VEI-CUR (c), ZOL-CUR (d), VEI-LED (e), ZOL-LED (d), VEI-aPDT (g) e ZOL-aPDT (h). Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 µm.

VEGF no sítio de extração dental

O padrão de imunomarcção para VEGF no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentada no Gráfico 4. Nos grupos tratados com o veículo, VEI, VEI-CUR, VEI-LED e VEI-aPDT, a mediana e o desvio interquartis foi de 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), 3 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção) e 3 (3 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), respectivamente. Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL, ZOL-CUR, ZOL-LED e ZOL-aPDT, a mediana e o desvio interquartis foi de 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), 2 (1 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção) e 2 (2 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), respectivamente. Não houve diferença significativa quando os grupos tratados com o veículo (VEI, VEI-CUR, VEI-LED e VEI-aPDT) foram comparados entre si. Não houve diferença significativa entre ZOL e ZOL-LED. ZOL (ESCORE 1; baixo padrão de imunomarcção) e ZOL-LED (ESCORE 1; baixo padrão de imunomarcção) apresentaram um padrão de imunomarcção menor que o apresentado pelos grupos VEI, VEI-CUR, VEI-LED, VEI-aPDT e ZOL-aPDT). O grupo ZOL-CUR apresentou um menor padrão de imunomarcção quando comparado com os grupos tratados com o VEI, VEI-CUR, VEI-LED e VEI-aPDT, o que não ocorreu quando tais grupos foram comparados com o grupo ZOL-aPDT (figura 10).

GRÁFICO 4 – VEGF

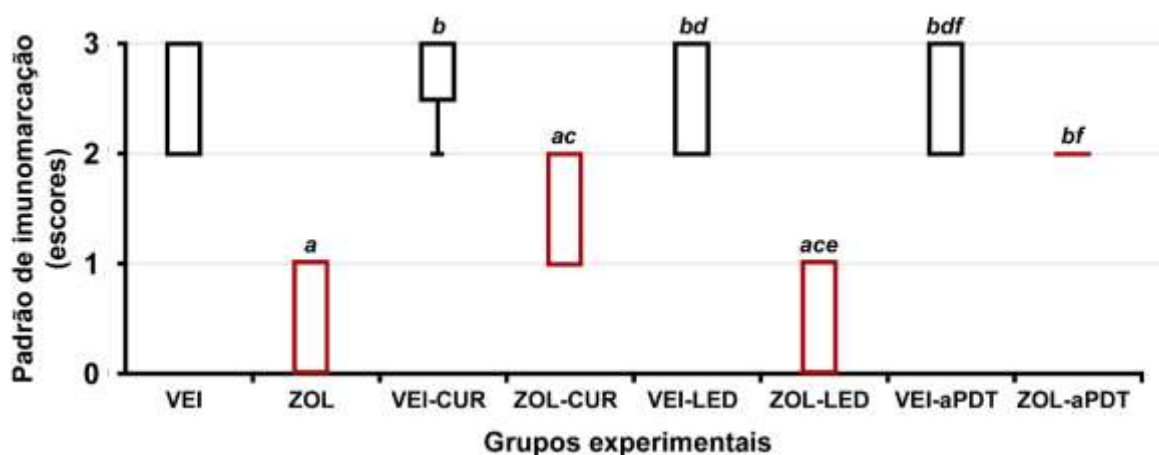


Gráfico 4: Padrão de imunomarcção para VEGF no sítio de extração dental. As letras indicam diferença significativa em relação ao grupo: a, VEI; b, ZOL; c, VEI-CUR; d, ZOL-CUR; e, VEI-LED; f, ZOL-LED; g, VEI-aPDT.

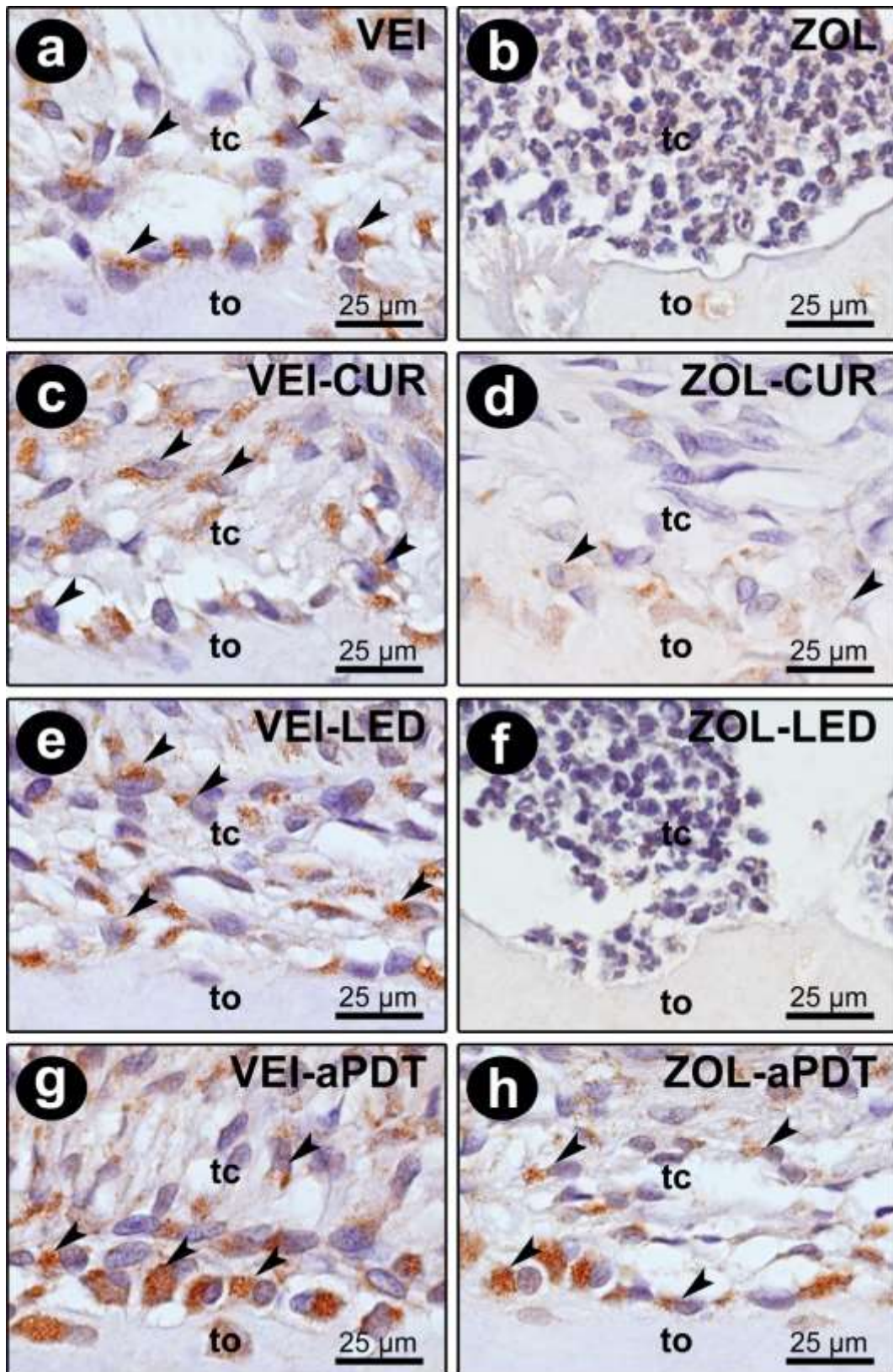


FIGURA 10: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para VEGF na interface entre o tecido ósseo do alveólo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), ZOL (b), VEI-CUR (c), ZOL-CUR (d), VEI-LED (e), ZOL-LED (d), VEI-aPDT (g) e ZOL-aPDT (h). Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo; setas: células VEGF-imunorrereativas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μm.

TGF- β 1 no sítio de extração dental

O padrão de imunomarcção para TGF β -1 no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentado no Gráfico 5. Nos grupos tratados com o veículo, VEI, VEI-CUR, VEI-LED e VEI-aPDT, a mediana e o desvio interquartis foi de 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), 3 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção) e 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), respectivamente. Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL, ZOL-CUR, ZOL-LED e ZOL-aPDT, a mediana e o desvio interquartis foi de 0 (0 – 1; prevaleceu padrão nulo de imunomarcção), 2 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção) e 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), respectivamente. Não houve diferença significativa quando os grupos tratados com o veículo (VEI, VEI-CUR, VEI-LED e VEI-aPDT) foram comparados entre si. Não houve diferença significativa quando os grupos tratados com zoledronato (ZOL, ZOL-CUR, ZOL-LED e ZOL-aPDT) foram comparados entre si. Não houve diferença significativa entre ZOL e ZOL-LED. ZOL (ESCORE 0; padrão nulo de imunomarcção) e ZOL-LED (ESCORE 1; baixo padrão de imunomarcção) apresentaram um padrão de imunomarcção menor que o apresentado pelos demais grupos experimentais (VEI, VEI-CUR, VEI-LED, VEI-aPDT, ZOL-CUR e ZOL-aPDT). Os grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT não apresentaram diferença significativa quando foram comparados entre si e quando foram comparados com os grupos tratados com o veículo (VEI, VEI-CUR, VEI-LED e VEI-aPDT) (figura 11).

GRÁFICO 5 – TGF- β 1

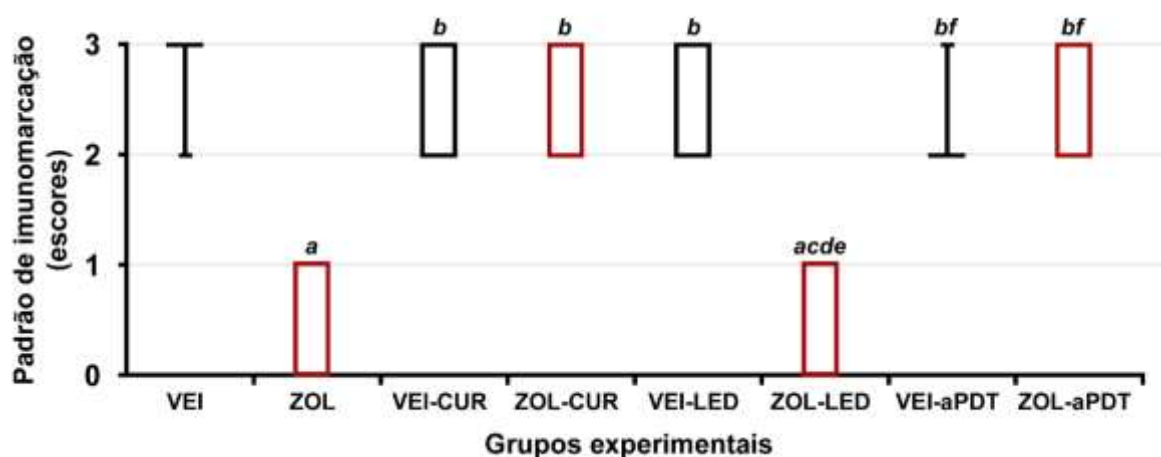


Gráfico 5: Padrão de imunomarcção para TGF- β 1 no sítio de extração dental. As letras indicam diferença significante em relação ao grupo: a, VEI; b, ZOL; c, VEI-CUR; d, ZOL-CUR; e, VEI-LED; f, ZOL-LED; g, VEI-aPDT.

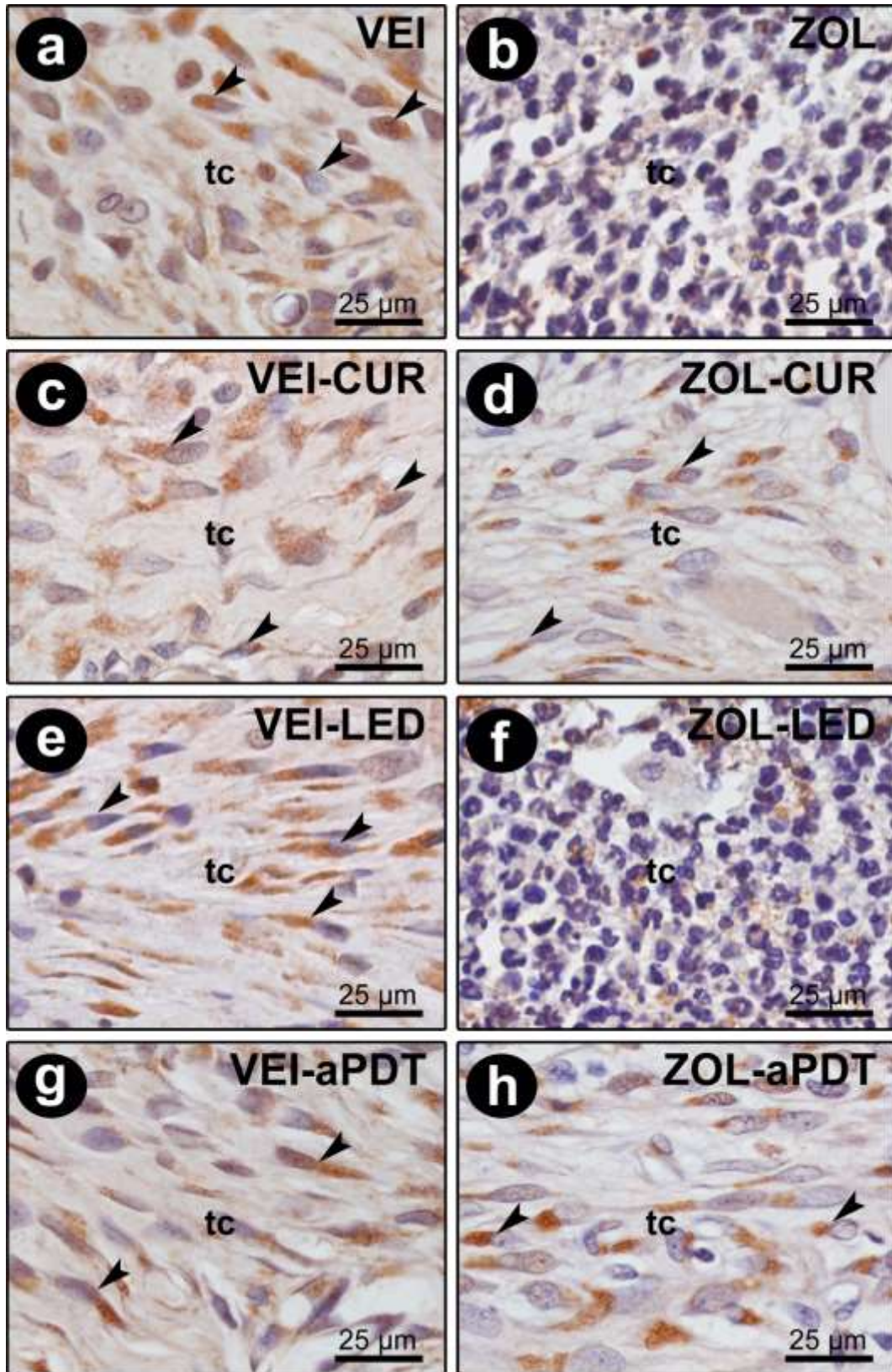


FIGURA 11: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TGF- β 1 na interface entre o tecido ósseo do alvéolo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), ZOL (b), VEI-CUR (c), ZOL-CUR (d), VEI-LED (e), ZOL-LED (d), VEI-aPDT (g) e ZOL-aPDT (h). Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo; setas: células TGF- β 1-imunorreativas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μ m.

BMP2/4 no sítio de extração dental

O padrão de imunomarcção para BMP2/4 no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentado no Gráfico 6. Nos grupos tratados com o veículo, VEI, VEI-CUR, VEI-LED e VEI-aPDT, a mediana e o desvio interquartis foi de 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção) e 3 (3 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), respectivamente. Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL, ZOL-CUR, ZOL-LED e ZOL-aPDT, a mediana e o desvio interquartis foi de 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção) e 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção), respectivamente. Não houve diferença significativa quando os grupos tratados com o veículo (VEI, VEI-CUR, VEI-LED e VEI-aPDT) foram comparados entre si. Não houve diferença significativa entre ZOL e ZOL-LED. ZOL (ESCORE 1; baixo padrão de imunomarcção) e ZOL-LED (ESCORE 1; baixo padrão de imunomarcção) apresentaram um padrão de imunomarcção menor que o apresentado pelos demais grupos experimentais (VEI, VEI-CUR, VEI-LED, VEI-aPDT, ZOL-CUR e ZOL-aPDT). Os grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT não apresentaram diferença significativa quando foram comparados entre si e quando foram comparados com os grupos tratados com o veículo (VEI, VEI-CUR, VEI-LED e VEI-aPDT) (figura 12).

GRÁFICO 6 – BMP2/4

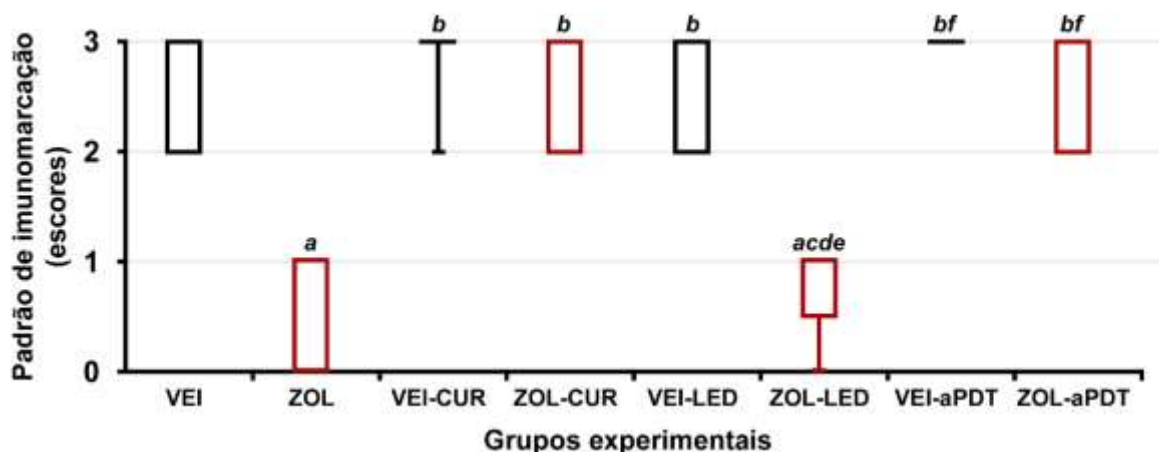


Gráfico 6: Padrão de imunomarcção para BMP 2/4 no sítio de extração dental. As letras indicam diferença significativa em relação ao grupo: a, VEI; b, ZOL; c, VEI-CUR; d, ZOL-CUR; e, VEI-LED; f, ZOL-LED; g, VEI-aPDT.

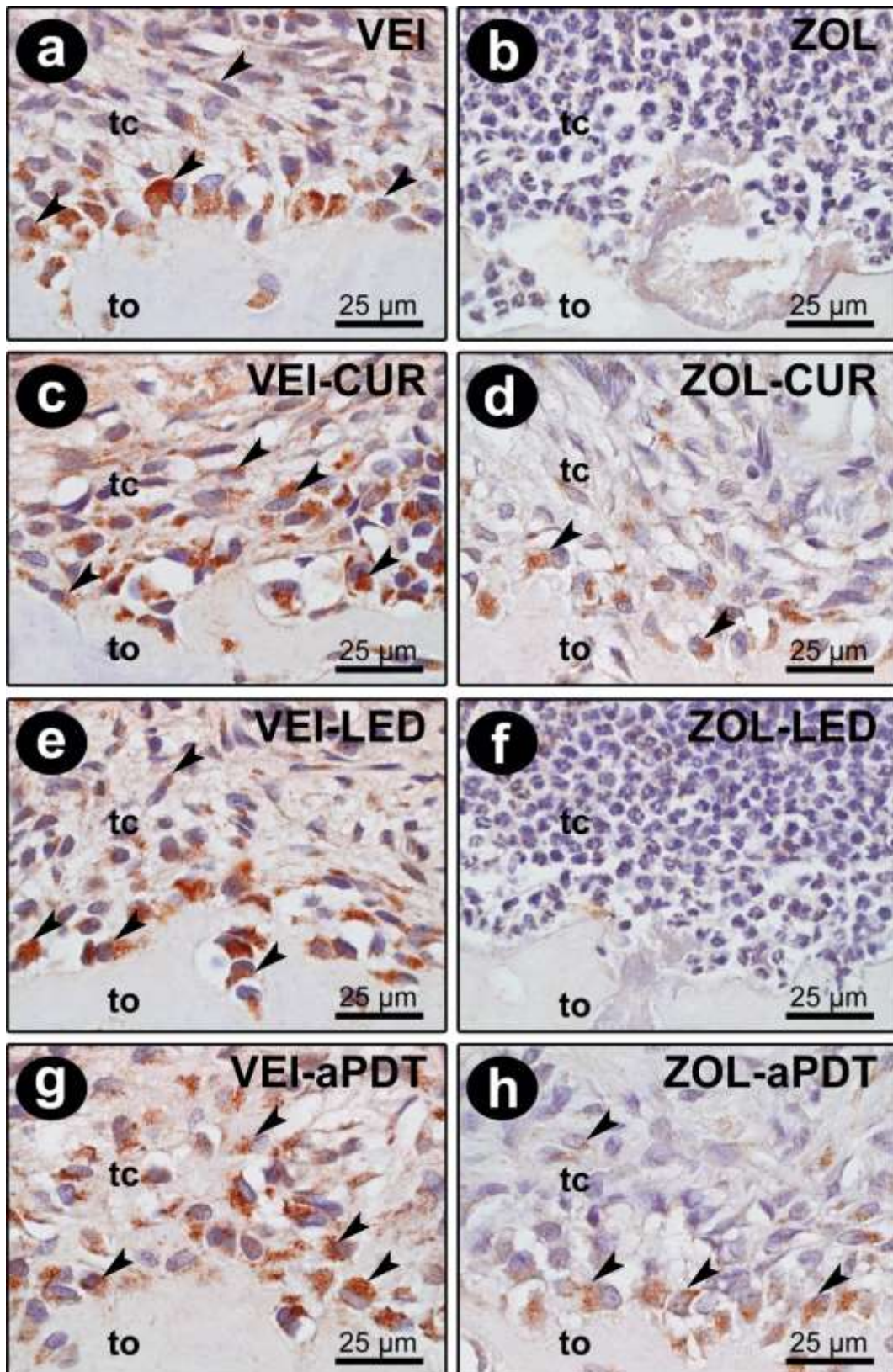


FIGURA 12: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para BMP2/4 na interface entre o tecido ósseo do alvéolo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), ZOL (b), VEI-CUR (c), ZOL-CUR (d), VEI-LED (e), ZOL-LED (d), VEI-aPDT (g) e ZOL-aPDT (h). Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo, setas: células BMP2/4-imunorreativas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.

OCN no sítio de extração dental

O padrão de imunomarcacão para OCN no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentada no Gráfico 7. Nos grupos tratados com o veículo, VEI, VEI-CUR, VEI-LED e VEI-aPDT, a mediana e o desvio interquartis foi de 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcacão), 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcacão), 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcacão) e 3 (3 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcacão), respectivamente. Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL, ZOL-CUR, ZOL-LED e ZOL-aPDT, a mediana e o desvio interquartis foi de 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcacão), 2 (2 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcacão), 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcacão) e 2 (2 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcacão), respectivamente. Não houve diferença significativa quando os grupos tratados com o veículo (VEI, VEI-CUR, VEI-LED e VEI-aPDT) foram comparados entre si, exceto na comparacão entre VEI-LED e VEI-aPDT, onde este último apresentou um padrão de imunomarcacão maior que o primeiro. Não houve diferença significativa entre ZOL e ZOL-LED. ZOL (ESCORE 1; baixo padrão de imunomarcacão) e ZOL-LED (ESCORE 1; baixo padrão de imunomarcacão) apresentaram um padrão de imunomarcacão menor que o apresentado pelos demais grupos experimentais (VEI, VEI-CUR, VEI-LED, VEI-aPDT, ZOL-CUR e ZOL-aPDT). Os grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT não apresentaram diferença significativa quando foram comparados entre si e quando foram comparados com os grupos tratados com o VEI, VEI-CUR e VEI-LED. O grupo VEI-aPDT apresentou um padrão de imunomarcacão maior que o grupo ZOL-aPDT (figura 13).

GRÁFICO 7 – OCN

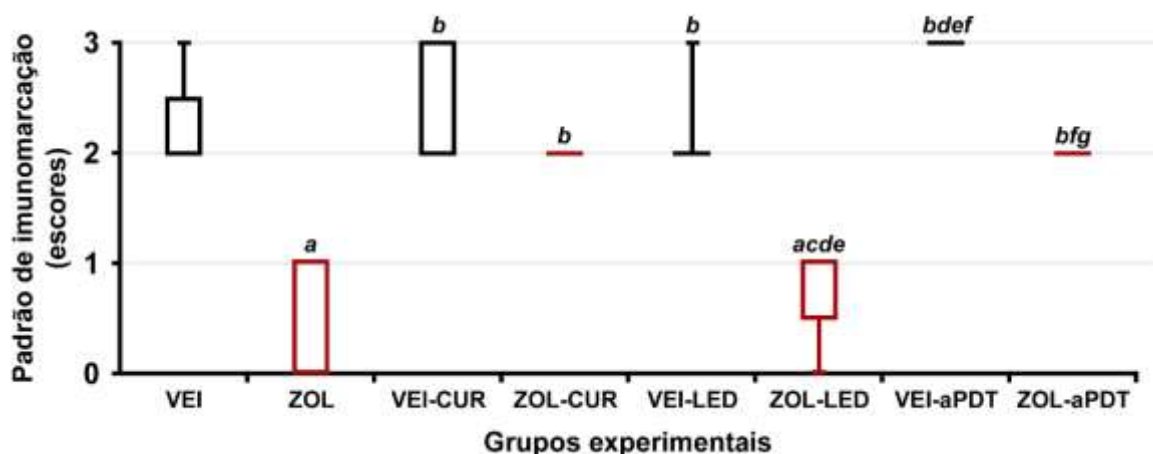


Gráfico 7: Padrão de imunomarcacão para OCN no sítio de extração dental. As letras indicam diferena significativa em relacão ao grupo: a, VEI; b, ZOL; c, VEI-CUR; d, ZOL-CUR; e, VEI-LED; f, ZOL-LED; g, VEI-aPDT.

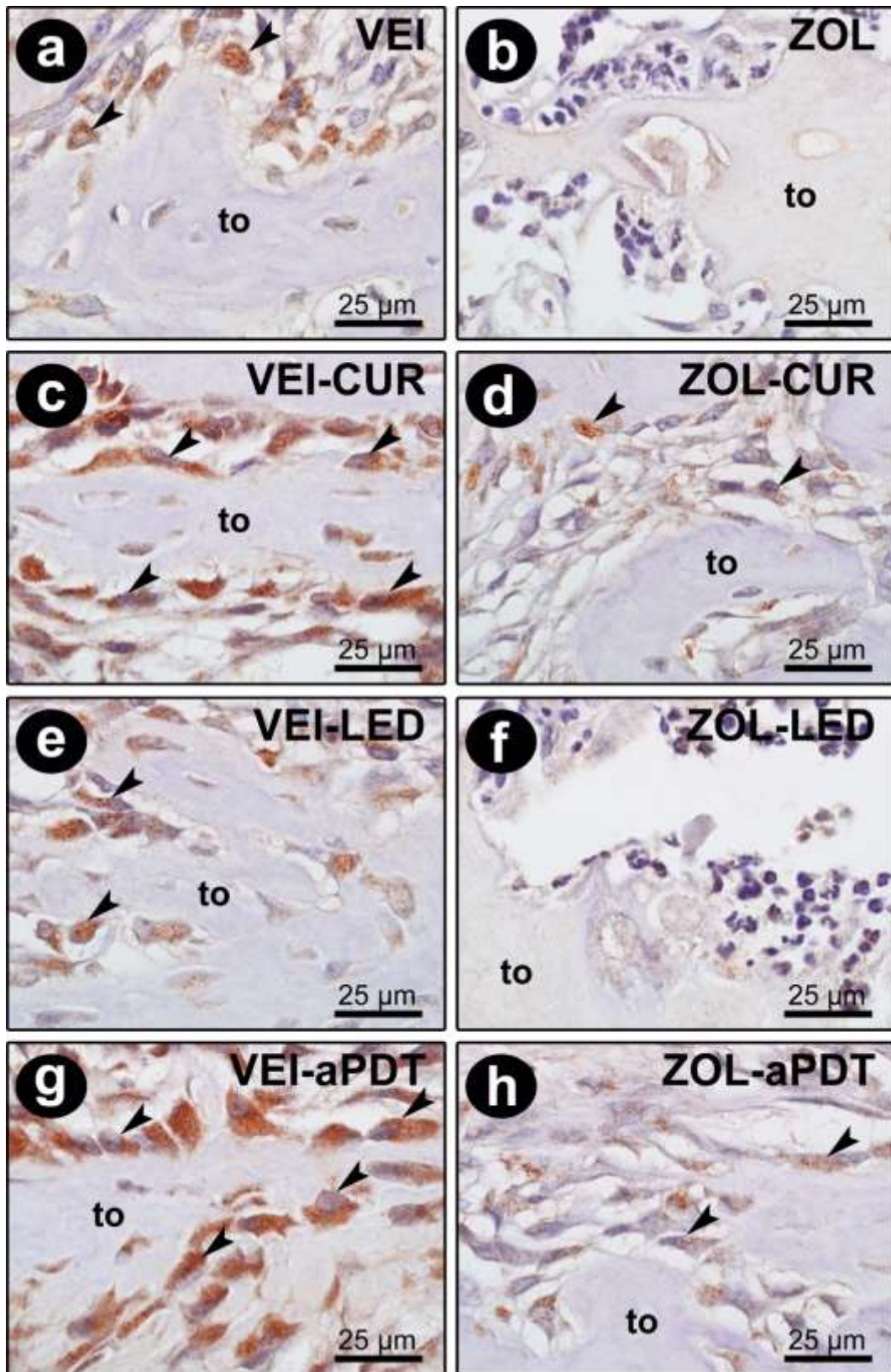


FIGURA 13: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OCN na interface entre o tecido ósseo do alveólo dental e o tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós exodontia nos grupos VEI (a), ZOL (b), VEI-CUR (c), ZOL-CUR (d), VEI-LED (e), ZOL-LED (d), VEI-aPDT (g) e ZOL-aPDT (h). Abreviações e símbolos: to: tecido ósseo alveolar; tc: tecido conjuntivo, setas: células OCN-imunorreativas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm.

Discussão

DISCUSSÃO

O zoledronato é um medicamento com ação antirreabsortiva empregado no tratamento de osteopatias que desencadeiam osteopenia/osteoporose, no controle da dor óssea, na regulação da hipercalcemia e na inibição da progressão de metástase óssea em neoplasias malignas osteotrópicas (COXON e ROGERS, 2003; ORY et al., 2008; EBETINO et al., 2011; ROGERS et al., 2011; RUGGIERO et al., 2014). Por ser o bisfosfonato que apresenta a maior potência relativa, sua utilização tem sido associada com grande parte dos casos de ONMM (RUGGIERO et al., 2014). A etiopatogenia desta doença ainda não se mostra totalmente elucidada, o que dificulta sobremaneira a sua prevenção e o seu tratamento (ALLEN e BURR, 2009; SIDDIQI et al., 2009; MIGLIORATI et al., 2011; SHANNON et al., 2011; BADEL et al., 2013).

Tendo em vista que o tratamento da ONMM pode ser extremamente longo, se mostrar falho ou resultar em sequelas graves, a melhor estratégia em se tratando desta condição é a prevenção. Embora a antibioticoterapia profilática prolongada tenha sido empregada como uma forma de evitar a ocorrência da ONMM (LITTLE et al., 2008; HOEFERT e EUFINGER, 2011; LOPEZ-JORNET et al., 2011; RUGGIERO et al., 2014; WILLIAMS et al., 2020), em muitos casos ela se mostra falha (HOEFERT e EUFINGER, 2011; LOPEZ-JORNET et al., 2011; WILLIAMS et al., 2020), tendo em vista que é capaz apenas de evitar a infecção, além disso, apresenta efeitos adversos. Uma terapia preventiva ideal para a ONMM seria aquela que apresentasse efetividade e, nenhum ou o mínimo, efeito adverso ao paciente. Dessa maneira, a busca por este tipo de terapia preventiva, efetiva e segura, tem se tornado uma grande necessidade.

Os materiais vegetais são comumente e amplamente utilizados para tratar várias condições médicas. Os produtos à base de plantas e outros produtos naturais vem ganhando espaço cada vez maior dentro da odontologia. Tais produtos tem se tornado uma opção mais frequente em detrimento dos medicamentos convencionais em razão de sua ampla e complexa atividade biológica, perfil de segurança geralmente favorável, custos mais baixos, biocompatibilidade e baixo impacto no meio ambiente (GÓSCINIAK et al., 2021).

Em contraposição os medicamentos convencionais geralmente provocam mais efeitos colaterais, são menos tolerados pelo organismo e, o seu uso de modo indiscriminado e irresponsável, pode trazer consequências individuais e coletivas graves, um dos grandes exemplos é a antibioticoterapia executada de modo inadequado, a qual tem proporcionado a geração de cepas multirresistentes, que passam a ser uma ameaça global (GÓSCINIAK et al., 2021).

Um destes produtos é a curcumina, a qual atualmente vem sendo extensivamente estudada. Suas múltiplas ações benéficas aos tecidos, tais como, efeito bioestimulatório sobre várias linhagens celulares, ação imunomodulatória e atividade antioxidante, estão aliadas a ação antimicrobiana (MARTINS et al., 2009; AGGARAWAL et al., 2015). Além disso, a curcumina pode ser empregada como um agente fotossensibilizador na aPDT em associação com o LED azul (DOVIGO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012; ARAÚJO et al., 2014; LEITE et al., 2014; DA FROTA et al., 2015; PASCOAL et al., 2015; SHEEDHAR et al., 2015; THEODORO et al., 2017; ROCHA et al., 2020), o que potencializa ainda mais o seu efeito antimicrobiano.

Diante disso, o propósito do presente estudo foi avaliar o efeito do uso local da curcumina sobre o processo de reparo alveolar em ratas senescentes tratadas com altas doses de zoledronato. O estudo consistiu na aplicação exclusivamente de curcumina sobre a ferida cirúrgica ou na deposição da curcumina seguida da irradiação com LED azul.

Tal avaliação consistiu em análise clínica do sítio de extração dental, análise histopatológica da reparação tecidual, análise da porcentagem de TONF, da porcentagem de TONV e análise imunoistoquímica direcionada para VEGF, TGF β -1, BMP2/4 e OCN. O uso da curcumina melhorou significativamente o processo de reparação tecidual e evitou a ocorrência de ONMM em ratas senescentes tratadas com altas doses de zoledronato. Os seus efeitos positivos foram consideravelmente potencializados na aPDT, ou seja, quando a curcumina foi empregada como agente fotossensibilizador sob irradiação com o LED azul.

Deve ser destacado que a curcumina é um produto de baixo custo. Além disso, o emprego da curcumina na aPDT implica na sua deposição sobre o sítio a ser tratado, seguida da irradiação com o LED azul, o qual pode consistir no mesmo aparelho encontrado na imensa maioria dos consultórios odontológicos para promover fotopolimerização de alguns materiais, ou seja, sem que haja necessidade de aquisição de um aparelho específico para promover seus efeitos fotodinâmicos, o que a torna uma alternativa popular e economicamente viável (ARAÚJO et al., 2014).

Os modelos experimentais de ONMM têm contribuído substancialmente para a elucidação da etiopatogenia e para a proposição/avaliação de terapias preventivas e/ou curativas, e com isso têm direcionado pesquisas clínicas (SONIS et al., 2009; SENEL et al., 2010; MAAHS et al., 2011; MARINO et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2012; BARBARCREO et al., 2013; CONTE NETO et al., 2013; TSURUSHIMA et al., 2013). No presente estudo foi empregado um modelo experimental estabelecido e caracterizado por nosso grupo de pesquisa e que foi delineado tendo como base estudos epidemiológicos (OTTO et al., 2011;

KHAN et al., 2017; MCGOWAN et al., 2018). Tais estudos epidemiológicos mostraram que a ONMM é mais frequente em mulheres com idade avançada (OTTO et al., 2011; KHAN et al., 2017; MCGOWAN et al., 2018), o que fez com que fossem empregadas ratas senescentes. O zoledronato é a droga antirreabsortiva relacionada com a maioria dos casos de ONMM (OTTO et al., 2011; KHAN et al., 2017; MCGOWAN et al., 2018), o que fez com que se optasse por seu uso, e na dose oncológica. A exodontia, especialmente de dentes inferiores posteriores e a presença de doença periodontal são o primeiro e o segundo fator de risco local, respectivamente (OTTO et al., 2011; KHAN et al., 2017; MCGOWAN et al., 2018). Desta maneira, foi induzida periodontite experimental no primeiro molar inferior e, posteriormente, este dente foi extraído, inclusive mimetizando uma condição clínica muito comum em pacientes nesta faixa etária, que é a exodontia motivada por comprometimento periodontal irreversível.

Em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa utilizou-se de um modelo experimental em ratas semelhante ao usado no presente estudo, no entanto, nesses estudos se empregaram ratas com 20 meses de idade (STATKIEVICZ et al., 2018; ERVOLINO et al., 2019; TORO et al., 2019). A utilização de ratas com idade muito avançada assegura a senescência reprodutiva, ou seja, a ausência de interferência dos hormônios ovarianos, no entanto, dificulta sobremaneira o delineamento experimental, tendo em vista que a ocorrência de tumores passa a ser muito frequente, inviabilizando a utilização dessas ratas no estudo, além disso, é a fase onde a morte natural passa a aumentar consideravelmente.

Diante disso, com a convicção de que o emprego de ratas senescentes é o mais adequado em se tratando deste modelo experimental optamos por, no início do experimento, fazer uma seleção de ratas a partir dos 14 meses as quais já haviam atingido a senescência reprodutiva, o que foi assegurado através do monitoramento do ciclo estral. Com isso continuamos empregando ratas consideradas senescentes que permaneceram no estudo dos 14 aos 16 meses e com a senescência reprodutiva instalada, o que reduziu sobremaneira as perdas ao longo do período experimental.

A ONMM é definida tradicionalmente como presença de osso exposto na região maxilofacial, por um período maior que oito semanas, em pacientes submetidos a tratamento prévio ou atual com droga antireabsortiva e que não possui história prévia de radioterapia nos maxilares (RUGGIERO et al., 2009). Atualmente tem sido proposta uma nova definição, em que a ONMM é definida como uma reação adversa à medicamento, caracterizada por destruição óssea progressiva que acomete a maxila e/ou mandíbula em pacientes expostos a tratamento com medicamentos conhecidos por aumentar o risco da doença, na ausência de radioterapia

nesta região (CAMPISI et al., 2020). Como pode ser observado, o crescente número de medicamentos potencialmente capazes de desencadear a ONMM têm estimulado uma caracterização mais abrangente desta condição. Além disso, também tem sido proposto que em uma grande quantidade de situações clínicas se consegue chegar ao diagnóstico definitivo mais precocemente, sem que haja a necessidade de respeitar o intervalo de oito semanas para esta finalidade. Diante disso, embora haja um conceito tradicional, até mesmo a definição desta condição está passando por aprimoramento e atualização.

Com relação aos modelos experimentais animais de ONMM, embora existam vários descritos na literatura, não há uma definição exata do que seria a ONMM em animais. Sendo assim, baseando-se na caracterização da ONMM em humanos, e em suas modificações mais recentes, nosso estudo definiu as lesões semelhantes à ONMM em ratos como: presença de loja cirúrgica apresentando sinais clínicos e histológicos de grande comprometimento da reparação tecidual e presença de grande quantidade de tecido ósseo não vital (mais da metade da quantidade de tecido ósseo presente) nas adjacências do alveólo dentário ao longo de 28 dias pós-operatórios, em ratas tratadas com medicamento antirreabsortivo e que nunca foram expostas à radiação X. Neste estudo tais lesões semelhantes à ONMM em ratas serão intituladas simplesmente de ONMM.

O grupo ZOL foi aquele que nos deu todos os subsídios para que pudéssemos adotar tal definição. Neste grupo houve um comprometimento severo da reparação tanto dos tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração dental quanto do tecido ósseo no interior e nas adjacências do alvéolo dental. O tratamento com zoledronato impediu a restituição do tecido epitelial e comprometeu o reparo do tecido conjuntivo, inclusive ocasionou persistência de inflamação na lâmina própria. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram que os BPs exercem um efeito negativo sobre os queratinócitos, células que estruturam o tecido epitelial, e sobre os fibroblastos, células que produzem a matriz extracelular que promove a estruturação do tecido conjuntivo. Esses estudos mostraram que os BPs são capazes de diminuir a proliferação e aumentar a ocorrência de apoptose em queratinócitos (PABST et al., 2012; SARACINO et al., 2012; SCHEPER et al., 2009) e fibroblastos (WALTER et al., 2011; SCHEPER et al., 2009) da mucosa bucal.

No presente estudo também se constatou que no grupo ZOL houve um severo comprometimento do processo de reparo ósseo alveolar, o que evidencia um efeito negativo dos BPs sobre as células formadoras de tecido ósseo. HUANG et al. (2016) reportaram que em altas concentrações o zoledronato exerce um potente efeito citotóxico sobre os osteoblastos, e

em baixas concentrações compromete o processo de diferenciação de seus precursores. Em tal estudo constatou-se que a expressão gênica de BMP2, o principal fator de crescimento com ação osteogênica, de colágeno tipo I, o principal elemento da matriz óssea orgânica, e de fosfatase alcalina e OCN, essenciais para o processo de biomineralização da matriz, sofrem redução, de modo dose depende, em osteoblastos tratados com zoledronato.

Outros estudos também mostraram que o zoledronato é capaz de prejudicar a atividade osteoblástica (CORDOVA et al., 2016; BASSO et al., 2013; NAIDU et al., 2008). Esses dados estão de acordo com os achados do presente estudo onde a porcentagem de TONF variou de nula à extremamente baixa no grupo ZOL, o qual também apresentou um baixo padrão de imunomarcção para TGF- β 1, BMP2/4 e OCN.

A ação do zoledronato sobre a vasculatura e seus principais moduladores locais também é algo que poderia afetar substancialmente o processo de reparo tanto dos tecidos moles quanto dos tecidos duros no sítio de extração dental. No presente estudo constatamos que o padrão de imunomarcção para VEGF, um dos principais fatores relacionados com a neoangiogênese, foi menor nos grupos ZOL. De acordo com nossos achados, estudos demonstraram que o zoledronato afeta negativamente a viabilidade (WALTER et al., 2011; ZAFAR et al., 2014), proliferação (MICHAILIDOU et al., 2010), migração (MICHAILIDOU et al., 2010) e formação de tubo (MICHAILIDOU et al., 2010) de células endoteliais, além disso, aumenta o índice de apoptose dessas células (ZAFAR et al., 2014). Ziebart et al., reportaram que o zoledronato reduz a capacidade de migração e de diferenciação das células progenitoras endoteliais (ZIEBART et al., 2013).

Corroborando os achados deste modelo experimental em animais, estudos clínicos em humanos têm mostrado resultados que convergem para um ponto comum. Santini et al. demonstraram que ocorre redução na quantidade de precursores de células endoteliais e células endoteliais no sangue periférico de pacientes sob tratamento com dose oncológica de zoledronato (SANTINI et al., 2013). Wehrhan et al. observaram que em amostras da mucosa bucal de pacientes com OMNM ocorre uma drástica redução na angiogênese (WEHRHAN et al., 2011). Em outro estudo clínico, Mozzati et al. reportaram que em amostras da mucosa bucal de pacientes tratados com zoledronato e que desenvolveram ONMM, a expressão de VEGF, hidroximetilglutaril coenzima A redutase (um marcador de proliferação celular) e IL-6 foi menor do que em pacientes tratados com esta droga e que não desenvolveram a doença (MOZZATI et al., 2012).

Uma outra característica apresentada pelo grupo ZOL, que consistiu em um dos principais critérios levados em consideração no presente estudo para se definir a ONMM, foi a elevada porcentagem de TONV. O tecido ósseo situado nas adjacências do alvéolo era constituído por cerca de 90% de tecido ósseo não vital, o qual estava associado com tecidos moles necrosados, intenso infiltrado inflamatório e presença de biofilme. Aguirre et al. (2021) propuseram que o processo inflamatório e/ou infeccioso eleva os níveis locais de citocinas com atividade pró-inflamatória, como $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$, o que seria capaz de promover morte de osteócitos. Os tipos de morte celular desencadeados pelo processo inflamatório e/ou infeccioso são: morte celular acidental e morte celular regulada, incluindo a apoptose e necroptose, ambas capazes de desencadear e potencializar ainda mais a inflamação. Na presença dos medicamentos antirreabsortivos, os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), se acumulam no tecido ósseo necrótico e ativam por sua vez vários receptores de reconhecimento de padrões (PRR), os quais estão presentes em osteoclastos, células fagocitárias e células apresentadoras de antígeno, estes são capazes de amplificar a resposta inflamatória local, induzindo a ocorrência de mais morte de osteócitos (AGUIRRE et al., 2021).

No presente estudo constatamos que o emprego do zoledronato potencializou a resposta inflamatória local, como pode ser observado na avaliação histopatológica, o que acreditamos que por si já tenha ocasionado morte de osteócitos. Os restos necroptóticos, e até mesmo os restos apoptóticos de tais células, presentes nas lacunas e no sistema de canaliculos, não podem ser eliminados pelas células fagocitárias, uma vez que os agentes antirreabsortivos impedem o acesso destas células aos remanescentes celulares, os quais ativam vias de sinalização que exacerbam ainda mais o processo inflamatório, desencadeando mais morte celular de osteócitos, isso explicaria a grande porcentagem de TONV presente nos grupos onde não se proporcionou nenhum controle do processo inflamatório local, como ocorreu no grupo ZOL.

O uso exclusivo da irradiação com LED azul no sítio de extração não exerceu efeitos sobre o processo de reparação tecidual, ou seja, a magnitude da resposta inflamatória local, o padrão de estruturação do tecido epitelial e tecido conjuntivo, a porcentagem de TONV e TONF, e o padrão de imunomarcacão para VEGF, $TGF-\beta 1$, BMP2/4 e OCN foram similares ao grupo ZOL, ou seja, condizentes com um quadro de ONMM. Nossos achados corroboram estudos anteriores em sítio com periodontite experimental tratado exclusivamente com o LED azul, onde não se constatou efeito positivo ao se empregar exclusivamente a irradiação com o LED azul (THEODORO et al., 2017; SHI et al., 2021).

No presente estudo os grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT, que foram submetidos ao tratamento com a curcumina isolada ou associada ao LED azul, respectivamente, exibiram um processo de reparo alveolar similar ao apresentado pelo grupo controle (VEI), além disso, em ambas as situações a ocorrência da ONMM foi evitada. Dentre os vários efeitos benéficos da curcumina está sua atividade anti-inflamatória (CHAINANI-WU, 2003; JURENKA, 2009; FADUS et al., 2017), que seria capaz de modular a resposta inflamatória local. Estudos mostram que a curcumina é capaz inibir a ativação da via NF- κ B e reduzir a expressão de citocinas com atividade pró-inflamatória, tais como TNF α , IL-1 β e IL-6. Supostamente tal ação da curcumina tenha sido capaz de modular a resposta inflamatória, a qual é exacerbada pelo tratamento com o zoledronato, como observado na avaliação histopatológica nos grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT.

A partir do momento que a resposta inflamatória está sob controle, uma outra ação que provavelmente tenha sido desencadeada pela curcumina nos grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT foi a ação bioestimulatória. Estudos mostraram que a curcumina é capaz de promover maior reepitelização, estimular a migração de fibroblastos, aumentar a síntese de elementos da matriz extracelular e incrementar a neoangiogênese em feridas cutâneas de ratos diabéticos (KANT et al., 2015). Esses dados corroboram os achados do presente estudo, onde a curcumina foi capaz de estimular a reparação do tecido epitelial e do tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental. A avaliação histopatológica e o alto padrão de imunomarcagem para TGF β 1 e VEGF confirmam este efeito bioestimulatório, o qual é severamente comprometido ao longo de um tratamento com zoledronato.

O VEGF promove angiogênese e a formação de tecido de granulação, estimulando as células endoteliais a se proliferar e formar novos vasos sanguíneos, e tem sido reportado que a curcumina é capaz de promover elevação nos níveis de VEGF em fibroblastos gengivais humanos em um modelo in vitro de reparação tecidual, o que reforça os nossos achados (RUJIRACHOTIWAT e SUTTAMANATWONG, 2021). Estudos anteriores já haviam demonstrado a capacidade da curcumina de induzir a angiogênese e, conseqüentemente, melhorar o processo cicatricial até mesmo em animais com deficiência nesse processo, como ratos diabéticos. Estudos demonstram que ela colabora no tratamento de feridas através da melhora da microcirculação, aumento da angiogênese, promoção da formação do tecido de granulação e aceleração da epitelização (RAMPRASAD, 1957; LONE et al., 2018).

O TGF β 1 é um fator de crescimento que participa da iniciação da inflamação, formação de tecido de granulação e estimula a síntese de colágeno (RUJIRACHOTIWAT e

SUTTAMANATWONG, 2021). Em tecidos com dificuldade de cicatrização, a expressão de TGFβ1 é mais baixa do que em tecidos com processo de cicatrização normal (JUDE et al., 2002). Estudos mostram que a curcumina é capaz de estimular a síntese de TGFβ1 (JOSHI et al., 2021), o que foi confirmado no presente estudo, especialmente nos grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT.

O estímulo ao reparo dos tecidos moles sobrejacentes ao sítio de extração dental é de grande importância para proteger o tecido ósseo situado mais profundamente e propiciar um microambiente mais favorável para o processo de neoformação óssea. Além dessa ação protetiva indireta que a curcumina exerceu sobre o tecido ósseo estimulando a restituição da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental, provavelmente foi capaz de exercer efeitos diretos sobre a neoformação óssea, o que resultou em uma maior porcentagem de TONF e maior padrão de imunomarcção para BMP2/4 e OCN nos grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT quando comparado com os demais grupos que também receberam zoledronato. Estudos tem mostrado que a curcumina é capaz estimular a diferenciação osteogênica de diferentes linhagens de células tronco mesenquimais (TAN et al., 2021; SAMIEI et al., 2021; SON et al., 2018; GU et al., 2021), o que explicaria as porcentagens maiores de TONF nos grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT. Além disso, LI et al. (2020) reportaram que a curcumina é capaz de exercer um papel protetivo sobre osteoblastos contra o estresse oxidativo, o qual alguns estudos mostram estar alterado na ONMM (BAGAN et al., 2014; YAZICI et al., 2018; TANIGUCHI et al., 2020).

CHEN et al. (2021), reportaram que a curcumina provoca aumento discreto na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais do osso, uma vez que é capaz de ativar diretamente essas células. Além disso, tais autores evidenciaram uma forma indireta de atuação da curcumina, a qual passa pela interação entre células tronco mesenquimais com macrófagos, via que promove significativo aumento na diferenciação osteogênica. Podemos depreender que esta via indireta de atuação da curcumina também tenha ocorrido no presente estudo, e explicaria o curso mais favorável da reparação tecidual, a maior porcentagem de TONF, os padrões de imunomarcção mais elevados de TFG-β1, BMP2/4 e OCN nos grupos ZOL-CUR e ZOL-aPDT.

Tem sido mostrado que o tratamento com drogas antirreabsotivas, além de afetar a atividade dos osteoclastos, afeta também a atividade das outras células que, como ele, fazem parte do sistema mononuclear fagocitário, dentre elas os macrófagos. Estudos mostram que a polarização de macrófagos é alterada com o tratamento com drogas antirreabsotivas, sendo que este medicamento estimula a polarização dos macrófagos para o fenótipo pró-inflamatório, ou

seja, gerando um microambiente com uma inflamação exacerbada e prolongada (GKOUVERIS et al., 2022), como nosso estudo mostrou nos grupos ZOL e ZOL-LED. Além disso, tais medicamentos inibem a polarização dos macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório, o que compromete grandemente o processo de reparação tecidual (GKOUVERIS et al., 2022). Todavia, CHEN et al. (2021), mostraram que a curcumina estimula a polarização de macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório, sendo assim, acreditamos que os resultados positivos observados nos grupos ZOL-CUR e ZOL-LED, podem ser explicados, pelo menos em parte, por esta via de atuação.

Um outro ponto de fundamental importância em se tratando da ONMM é o controle da necrose óssea. O presente trabalho mostra que as porcentagens de TONV, embora maiores que nos grupos tratados com veículo, é muito menor do que o que foi observado nos grupos ZOL e ZOL-LED e não configura um quadro de ONMM. Acreditamos que as porcentagens de TONV observadas em ZOL-CUR e ZOL-aPDT, embora maiores que os grupos que receberam o veículo, seja por uma ação específica da droga antirreabsortiva. Ao se comparar ZOL-CUR e ZOL-aPDT com ZOL e ZOL-LED a quantidade de TONV nestes últimos é muito maior e essa característica, aliada ao severo comprometimento da reparação da mucosa e da neoformação óssea, e a presença de bactérias fazem com que os dois últimos grupos possam ser incluídos em um quadro de ONMM e os dois primeiros não.

A superioridade do tratamento com aPDT empregando a curcumina e o LED azul supostamente se deve aos efeitos citados anteriormente, associados a uma ação antimicrobiana potencializada por esta terapia. Na aPDT emprega-se um agente fotossensibilizador, no caso do presente estudo, a curcumina, a qual é depositada previamente sobre o sítio a ser tratado, no caso o alvéolo dental, para que a mesma seja pré-absorvida seletivamente pelas células microbianas. Após esse período de pré-irradiação, que no presente estudo consistiu em 60 segundos, o sítio é irradiado com uma luz com um comprimento de onda ressonante à banda de absorção de um fotossensibilizador, no caso deste estudo, o LED azul. Sob essa irradiação apropriada, e na presença de oxigênio, o fotossensibilizador sofre alteração, ou seja, passa de um estado de baixa energia (estado singleto fundamental) para um estado singleto de excitação com tempo de vida curta, o qual pode ser convertido em um estado tripleto de excitação com tempo vida longa. Este último, na presença de oxigênio, é capaz de gerar altos níveis de espécies reativas de oxigênio via dois mecanismos: através da transferência de elétrons para formar predominantemente radicais superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (mecanismo tipo I) ou através da transferência de energia para produzir oxigênio singleto

altamente reativo (mecanismo tipo II). Os altos níveis de espécies reativas de oxigênio gerados exercem efeito citotóxico sobre as células microbianas que absorveram o agente fotossensibilizador, ou seja, ocorre um efeito antimicrobiano por ação fototóxica. (WAINWRIGHT, 2021; MAHMOUDI, H. et al., 2018; CIEPLIK, F. et al., 2018; HAMBLIN, 2016; WAINWRIGHT, 1998). Todavia, deve ser levado em consideração que a curcumina, mesmo sem ser irradiada, já apresenta um efeito antimicrobiano (MARTINS et al., 2009; AGGARAWAL et al., 2015), ou seja, esta ação é altamente potencializada com sua associação com o LED azul.

ERVOLINO et al. (2019) foi o primeiro estudo que empregou a aPDT como estratégia terapêutica preventiva para a ONMM. Tais autores empregaram ratas senescentes tratadas com dose oncológica de zoledronato, submetidas à exodontia do molar inferior e tratadas localmente com aPDT. Neste estudo empregou-se como fotossensibilizador o azul de metileno (100 µg/ml) com tempo de pré-irradiação de 60 segundos, seguido da irradiação com laser de baixa potência (660 nm, 35 mW, 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. Foi verificado que a aPDT melhorou o processo de reparo alveolar e evitou a ocorrência da ONMM. O presente estudo foi o primeiro a utilizar a aPDT empregando curcumina associada ao LED azul como estratégia para prevenir a ocorrência da ONMM. De modo semelhante ao observado por ERVOLINO et al. (2019), o presente trabalho mostrou benefícios desta modalidade de aPDT no processo de reparo alveolar e na prevenção da ONMM.

STATKIEVICZ et al. (2018) empregaram exatamente o mesmo modelo experimental e o protocolo de irradiação com laser de baixa potência utilizado por ERVOLINO et al. (2019), ou seja, empregaram apenas a terapia de fotobiomodulação, sem se utilizar da ação fotodinâmica do agente fotossensibilizador. Os resultados apresentados por esse estudo foram positivos, o que indica que a fotobiomodulação apresentou efetividade, no entanto, os resultados apresentados ao se empregar a aPDT foram superiores (ERVOLINO et al. 2019). No presente estudo ocorreu algo diferente com o emprego do LED azul isolado, que não mostrou nenhuma efetividade, mas ocorreu algo semelhante com o uso exclusivo de curcumina, a qual exerceu efeitos positivos sobre o processo de reparo alveolar, no entanto, ao se empregar a aPDT com a curcumina e o LED azul os resultados foram superiores. Diante disso pode-se constatar que um controle bastante efetivo da infecção, via aPDT, associado a um efeito biomodulatório durante o processo de reparação tecidual é fundamental para se que se obtenha um maior êxito na prevenção da ocorrência da ONMM.

Em outras condições patológicas de caráter infeccioso/inflamatório que envolvem o processo de reparo concomitante de tecidos moles e tecido ósseo alveolar, a aPDT empregando curcumina associada LED azul também mostrou-se bastante satisfatória. Em estudos em animais foi evidenciado que a aPDT empregando curcumina associada ao LED azul apresentou efetividade no tratamento da periodontite experimental em ratos (THEODORO et al., 2017). Da mesma forma, estudo clínico em humanos evidenciou que a aPDT empregando curcumina associada ao LED azul se mostrou efetiva no tratamento da periodontite crônica quando utilizada como adjuvante à raspagem e alisamento radicular (SHEEDHAR et al., 2015). Além disso, os efeitos positivos desta modalidade de aPDT no processo de reparo periodontal são reportados inclusive em situações onde a resposta do hospedeiro apresenta algum tipo de comprometimento, como é o caso de portadores de diabetes tipo II (IVANAGA et al., 2019).

Outros estudos, com diferentes enfoques, e que avaliaram o efeito da aPDT utilizando curcumina como fotossensibilizador associada ao LED azul também reportaram efeitos positivos desse tratamento (DOVIGO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012; ARAÚJO et al., 2014; LEITE et al., 2014; DA FROTA et al., 2015; PASCOAL et al., 2015; SHEEDHAR et al., 2015; THEODORO et al., 2017; ROCHA et al., 2020).

A ONMM e seu tratamento afetam significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Em vista disso, o emprego de estratégias terapêuticas preventivas seria o ideal em se tratando desta condição. Os achados do presente estudo podem ser importantes para direcionar futuras pesquisas clínicas. Estudos clínicos visando o estabelecimento de protocolos preventivos para serem empregados em pacientes que fazem uso de drogas antirreabsortivas e que necessitam de intervenções odontológicas invasivas são necessários. Levando-se em consideração a ação antimicrobiana, o efeito bioestimulatório, a ausência de efeitos adversos, a não promoção de resistência bacteriana, o baixo custo e fácil execução, o uso da curcumina irradiada ou não com LED azul pode se constituir em uma terapia preventiva promissora para evitar a ocorrência de ONMM.

Conclusão

CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, conclui-se que a aplicação de curcumina no sítio de extração dental exerce efeito positivo sobre o processo de reparo alveolar em ratas senescentes tratadas com altas doses de zoledronato. Os efeitos benéficos sobre a reparação tecidual são potencializados quando a curcumina é associada à irradiação com LED azul, ou seja, na aPDT. O uso da curcumina, irradiada ou não com LED azul, evitou a ocorrência da ONMM pós exodontia em ratas senescentes tratadas com altas doses de zoledronato, o que a coloca como uma potencial estratégia terapêutica preventiva.

Referências Bibliográficas

- ABE, K.; YOSHIMURA, Y.; DEYAMA, Y.; KIKUIRI, T.; HASEGAWA, T.; TEI, K. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in raw264.7 cells. **Int J Mol Med**, v. 29, p. 1007-1015, 2012.
- AGGARAWAL, B. B.; DEB, L.; PRASAD, S. Curcumins differs from tetrahydrocurcumin for molecular targets, signaling pathways and cellular response. **Molecules**, v. 20, p. 185-205, 2015.
- ALJOHANI, S.; FLIEFEL, R.; IHBE, J.; KÜHNISCH, J.; EHRENFELD, M.; OTTO, S. J. J. What is the effect of anti-resorptive drugs (ards) on the development of medication-related osteonecrosis of the jaw (mronj) in osteoporosis patients: A systematic review. **J Craniomaxillofac Surg.**, v. 45, p. 1493–1502, 2017.
- 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, p. 61-70, 2009.
- ANITHA, V.; RAJESH, P.; SHANMUGAR, M.; MEENA PRIYA, B.; PRABHU, S.; SHIVAKUMAN, V. Comparative evaluation of natural curcumin and synthetic chlorhexidine in the management of chronic periodontitis as a local drug delivery: A clinical and microbiological study. v. 26, p. 53-56, 2015.
- ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological activities of curcuma longa l. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 723-728, 2001.
- ARAÚJO, N. C.; FONTANA, C. R.; BAGNATO, V. S.; GERBI, M. E. M. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. **Lasers Med. Sci.**, v. 29, p. 629-635, 2014.
- ARAÚJO, N. C.; FONTANA, C. R.; GERBI, M. E. M.; BAGNATO, V. S. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. **Photomed Lasers Surg**, v. 30, p. 96-101, 2012.
- ATHAR, M.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R. Differential role of reactive oxygen intermediates in photofrin-i- and photofrin-ii-mediated photoenhancement of lipid peroxidation in epidermal microsomal membranes. **J Invest Dermatol**, v. 90, p. 652-657, 1988.
- BADEL, T.; PAVICIN, I. S.; CAREK, A. J.; ROSIN-GRGET, K.; GRBESA, D. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate. **Coll Antropol**, v. 37, p. 645-651, 2013.
- BAGAN, J.; SÁEZ, G. T.; TORMOS, M. C.; ESTEVE, C. G.; BAGAN, L.; LEOPOLDO-RODADO, M.; CALVO, J.; CAMPS, C. Oxidative stress in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **J Oral Pathol Med**, v. 43, p. 371-377, 2014.
- BARBA-RECREO, P.; DEL CASTILLO PARDO DE VERA, J. L.; GARCIA-ARRANZ, M.; YEBENES, L.; BURGUENO, M. Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 42, p. 744-750, 2013.
- BLACK, D. M.; BOONEN, S.; CAULEY, J. A.; CUMMINGS, S. R.; LIPPUNER, K.; LEUNG, P. C.; MARTINEZ, R. L. M.; RUZYCKY, M. E.; EASTELL, R. The effect of 3 versus 6 years of zoledronic acid treatment of osteoporosis: A randomized extension to the horizon-pivotal fracture trial (pft). **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, p. 243-254, 2012.
- BRUZELL, E.; MORISBAK, E.; TONNESEN, H. H. Studies in curcumin and curcuminoids xxix. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. **Photochem Photobiol Sci**, v. 4, p. 523-530, 2005.
- CAMPISI, G.; MAUCERI, R.; BERTOLDO, F.; BETTINI, G.; BIASOTTO, M.; COLELLA, G. Medication-related osteonecrosis of jaws (mronj) prevention and diagnosis: Italian consensus update 2020. **Environ Res Public Health**, v. 17, p. 5998, 2020.
- CHAINANI-WU, N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: A component of tumeric (curcuma longa). **J Altern Complement Med**, v. 9, p. 161-168, 2003.
- CHEN, S.; LIANG, H.; JI, Y.; KOU, H.; ZHANG, C.; SHANG, G.; SHANG, C.; SONG, Z.; YANG, L.; LIU, L.; WANG, Y.; LIU, H. Curcumin modulates the crosstalk between

- macrophages and bone mesenchymal stem cells to ameliorate osteogenesis. **Front. Cell Dev. Biol**, v. 9, p. 634650, 2021.
- CIEPLIK, F.; DENG, D.; CRIELAARD, W.; BUCHALLA, W.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A.; MAISCH, T. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. **Crit Rev Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018.
- CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 8, p. 133–143, 2012.
- COLEMAN, R.; WOODWARD, E.; BROWN, J. Safety of zoledronic acid and incidence of osteonecrosis of the jaw (onj) during adjuvant therapy in a randomised phase iii trial (azure: Big 01–04) for women with stage ii/iii breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 127, p. 429–438, 2011.
- CONTE NETO, N.; SPOLIDORIO, L. C.; ANDRADE, C. R.; GUIMARAES, M.; MARCANTONIO, E. J. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. **Int J Exp Pathol**, v. 94, p. 65-73, 2013.
- COXON, F. P.; ROGERS, M. J. The role of prenylated small gtp-binding proteins in the regulation of osteoclast function. **Calcif Tissue Int**, v. 72, p. 80-84, 2003.
- DA FROTA, M. F.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; TANOMARU-FILHO, M. Photodynamic therapy in root canals contaminated with enterococcus faecalis using curcumin as photosensitizer. **Lasers Med Sci Rep**, v. 30, p. 1867–72, 2015.
- DAVE, D. H.; PATEL, P.; SHAH, M.; DEDAWALA, S. M.; SARAIYA, K.; SANT, A. V. Comparative evaluation of efficacy of oral curcumin gel as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. **Adv Hum Biol**, v. 8, p. 2018.
- DEVARAJ, S.; JAGANNATHAN, N.; NEELAKANTAN, P. Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against enterococcus faecalis in vitro. **Sci Rep**, v. 6, p. 24797, 2016.
- DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; CARMELLO, J. C.; MACHADO, A. L.; BRUNETTI, I. L.; BAGNATO, V. S. Susceptibility of clinical isolates of candida to photodynamic effects of curcumin. **Lasers Surg Med**, v. 43, p. 927-934, 2011.
- DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin Proc**, v. 83, p. 1032-1045, 2008.
- DUNFORD, J. E.; THOMPSON, K.; COXON, F. P.; LUCKMAN, S. P.; HAHN, F. M.; POULTER, C. D. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 296, p. 235-242, 2001.
- EBETINO, F. H.; HOGAN, A. M.; SUN, S.; TSOUMPRAS, M. K.; DUAN, X.; TRIFFITT, J. T. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. **Bone**, v. 49, p. 20-33, 2011.
- EIGNER, D.; SCHOLZ, D. Ferula asa-foetida and curcuma longa in traditional medical treatment and diet in nepal. **J Ethnopharmacol**, v. 67, p. 1-6, 1999.
- ERVOLINO, E.; STATKIEVICZ, C.; TORO, L. F.; DE MELLO-NETO, J. M.; CAVAZANA, T. P.; ISSA, J. P. M.; DORNELLES, R. C. M.; DE ALMEIDA, J. M.; NAGATA, M. H.; OKAMOTO, R.; CASATTI, C. A.; GARCIA, V. G.; THEODORO, L. H. 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.
- FADUS, M. C.; LAU, C.; BIKHCHANDANI, J.; LYNCH, H. T. Curcumin: An age old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. **J Tradit Complement Med.**, v. 7, p. 339-346, 2017.
- FOROUNZAFAR, F.; FOROUNZAFAR, A.; SATHYAPALAN, T.; ORAFI, H.; SAHEBKAR, A. Curcumin for the management of periodontal diseases: A review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, p. 4277-4284, 2020.
- GARCIA-DIAZ, M.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Use of fluorescent probes for ros to tease apart type i and type ii photochemical pathways in photodynamic therapy. . **Methods**, v. 109, p. 158–166, 2016.

- GKOUVERIS, I.; SOUNDIA, A.; GOUVERIS, P.; ZOUKI, D.; HADAYA, D.; TETRADIS, S. Macrophage involvement in medication-related osteonecrosis of the jaw (mronj): A comprehensive, short review. **Cancers**, v. 14, p. 330, 2022.
- GOEL, A.; AJAIKUMAR, B.; KUNNUMAKKARA;BHARAT, B.; AGGARWAL Curcumin as "curecumin": From kitchen to clinic. **biochemical pharmacology**, v. 75, p. 787– 809, 2008.
- GÓSCINIAK, A.; PACZKOWSKA-WALENDOWSKA, M.; SKOTNICKA, A.; RUCHAŁA, M. A.; CIELECKA-PIONTEK, J. Can plant materials be valuable in the treatment of periodontal diseases? Practical review. **Pharmaceutics**, v. 13, p. 2185, 2021.
- GRBIC, J. T.; BLACK, D. M.; LYLES, K. W.; REID, D. M.; ORWOLL, E.; MCCLUNG, M.; C., B.-R.; SU, G. The incidence of osteonecrosis of the jaw in patients receiving 5 milligrams of zoledronic acid: Data from the health outcomes and reduced incidence with zoledronic acid once yearly clinical trials program. **The Journal of the American Dental Association**, v. 141, p. 1365-1370, 2010.
- HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 33, p. 67-73, 2016.
- HANASONO, M. M.; MILITSAKH, O. N.; RICHMON, J. D.; ROSENTHAL, E. L.; WAX, M. K. Mandibulectomy and free flap reconstruction for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 139, p. 1135-1142, 2013.
- HAUKVIK, T.; BRUZELL, E.; KRISTENSEN, S.; TONNESEN, H. H. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids xxxvii. **Pharmazie**, v. 64, p. 666-673, 2009.
- HENRY, D. H.; COSTA, L.; GOLDWASSER, F. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. **J. Clin. Oncol.**, v. 29, p. 1125, 2011.
- 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, p. 362-380, 2011.
- IVANAGA, C.A.; MIESSI, D.M.J.; NUERNBERG, M.A.A.; CLAUDIO, M.M.; GARCIA, V.G.; THEODORO, L.H. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with curcumin and LED, as an enhancement to scaling and root planing in the treatment of residual pockets in diabetic patients: A randomized and controlled split-mouth clinical trial. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 27, p. 388-395, 2019.
- JOSHI, P.; JOSHI, S.; SEMWAL, D.; BISHT, A.; PALIWAL, S.; DWIVEDI, J.; SHARMA, S. Curcumin: An insight into molecular pathways involved in anticancer activity. **Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 2420-2457, 2021.
- JUDE, E. B.; BLAKYTTY, R.; J., B.; A.J., B.; M.W., F. Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type i and ii in diabetic foot ulcer. **Diabetic Med J Br Diabetic Assoc**, v. 19, p. 440–447, 2002.
- JURENKA, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of curcumin longa: A review of preclinical and clinical research. **Altern Med Rev**, v. 14, p. 141-153, 2009.
- KANT, V.; GOPAL, A.; KUMAR, D.; PATHAK, N. N.; M., R.; JANGIR, B. L.; TANDAN, S. K.; KUMAR, D. Curcumin-induced angiogenesis hastens wound healing in diabetic rats. **J Surg Res**, v. 193, p. 978–988, 2015.
- KIM, J. W.; KONG, K. A.; KIM, S. J.; CHOI, S. K.; CHA, I. H.; KIM, M. R. Prospective biomarker evaluation in patients with osteonecrosis of the jaw who received bisphosphonates. **Bone**, v. 57, p. 201-205, 2013.
- KUNIN, C. M.; JOHANSEN, K. S.; WORNING, A. M.; DASCHNER, F. D. Report of a symposium on use and abuse of antibiotics worldwide. **Rev Infect Dis**, v. 12, p. 12-19, 1990.

- LEE, R.; SOHN, S.; SHIN, K.; KANG, M.; PARK, N.; KIM, R. Bisphosphonate inhibits the expression of cyclin a2 at the transcriptional level in normal human oral keratinocytes. **Int J Mol Med**, v. 40, p. 623–630, 2017.
- LEITE, D. V.; PAOLILLO, F. R.; PARMESANO, T. N.; FONTANA, C. R.; BAGNATO, V. S. Effect of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection **Photomed Lasers Surg**, v. 32, p. 627-632, 2014.
- LITTLE, J. W.; FALACE, D. A.; MILLER, C. S.; RHODUS, N. L. Antibiotic prophylaxis in dentistry: An update. **Gen Dent**, v. 56, p. 20-28, 2008.
- LO, J. C.; O'RYAN, F. S.; GORDON, N. P.; YANG, J.; HUI, R. L.; MARTIN, D.; HUTCHINSON, M.; LATHON, P. V.; SANCHEZ, G.; SILVER, P.; CHANDRA, M.; MCCLOSKEY, C. A.; STAFFA, J. A.; WILLY, M.; SELBY, J. V.; GO, A. S. Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 68, p. 243-253, 2010.
- LONE, P. A.; AHMED, S. W.; PRASAD, V.; AHMED, B. Role of turmeric in management of alveolar osteitis (dry socket): A randomised clinical study. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 8, p. 44-47, 2018.
- LOPEZ-JORNET, P.; CAMACHO-ALONSO, F.; MARTINEZ-CANOVAS, A.; MOLINA-MINANO, F.; GOMEZ-GARCIA, F.; VICENTE-ORTEGA, V. 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, p. 2488-2493, 2011.
- LUCKMAN, S. P.; HUGHES, D. E.; COXON, F. P.; GRAHAM, R.; RUSSELL, G.; ROGERS, M. J. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of gtp-binding proteins, including ras. **J Bone Miner Res**, v. 13, p. 581-589, 1998.
- MAAHS, M. P.; AZAMBUJA, A. A.; CAMPOS, M. M.; SALUM, F. G.; CHERUBINI, K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: A study in wistar rats. **Head Neck**, v. 33, p. 199-207, 2011.
- MAHMOUDI, H.; BAHADOR, A.; POURHAJIBAGHER, M.; ALIKHANI, MY. Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Bacterial Infections. **J Lasers Med Sci.**, v. 9, n. 3, p. 154-160, 2018.
- MARINO, K. L.; ZAKHARY, I.; ABDELSAYED, R. A.; CARTER, J. A.; O'NEILL, J. C.; KHASHABA, R. M.; ELSALANTY, M.; STEVENS, M. R.; BORKE, J. L. Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (bronj). **J Oral Implantol**, v. 38, p. 511-518, 2012.
- MARTINS, C. V. B.; DA SILVA, D. L.; NERES, A. T.; MAGALHÃES, T. F.; WATANABE, G. A.; MODOLO, L. V.; SABINO, A. A.; DE FÁTIMA, A.; DE RESENDE, M. A. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, p. 337-339, 2009.
- MARX, R. E.; CILLO, J. E.; ULLOA, J. J. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: Risk factors, prediction of risk using serum ctx testing, prevention, and treatment. **Oral Maxillofac Surg**, v. 65, p. 2397-2410, 2007.
- MAULINA, T.; DIANA, H.; CAHYANTO, A.; AMALIYA, A. The efficacy of curcumin in managing acute inflammation pain on the post-surgical removal of impacted third molars patients: A randomised controlled trial. **J Oral Rehabil.**, v. 45, p. 677–683, 2018.
- MICHAILIDOU, M.; BROWN, H. K.; LEFLEY, D. V.; EVANS, A.; CROSS, S. S.; COLEMAN, R. E.; BROWN, N. J.; HOLEN, I. Microvascular endothelial cell responses in vitro and in vivo: Modulation by zoledronic acid and paclitaxel? . **J Vasc Res**, v. 47, p. 481-493, 2010.
- MIGLIORATI, C. A.; EPSTEIN, J. B.; ABT, E.; BERENSON, J. R. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates in cancer: A narrative review. **Nat Rev Endocrinol**, v. 7, p. 34-42, 2011.

- MOGHADMTOUSI, S. Z.; KADIR, H. A.; HASSANDARVISH, P.; TAJIK, H.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed Researching Corporation**, v. 2014, p. 2014.
- MONTEIRO, M. H. D. A.; FRAGA, S. A. P. M. Fitoterapia na odontologia: Levantamento dos principais produtos de origem vegetal para saúde bucal. **Rev. Fitos**, v. 9, p. 253-303, 2015.
- MOZZATI, M.; GALLESIO, G.; ARATA, V.; POL, R.; SCOLETTA, M. Platelet-rich therapies in the treatment of intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: A report of 32 cases. **Oral Oncol**, v. 48, p. 469-474, 2012.
- MYLONA, V.; ANAGNOSTAKI, E.; PARKER, S.; CRONSHAW, M.; LYNCH, E.; GROOTVELD, M. Laser-assisted apdt protocols in randomized controlled clinical trials in dentistry: A systematic review. **Dentistry Journal**, v. 8, p. 107, 2020.
- NEELAKANTAN, P.; CHENG, C. Q.; RAVICHANDRAN, V. Photoactivation of curcumin and sodium hypochlorite to enhance antibiofilm efficacy in root canal dentin. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, p. 108-114, 2015.
- ORY, S.; BRAZIER, H.; PAWLAK, G.; BLANGY, A. Rho gtpases in osteoclasts: Orchestrators of podosome arrangement. **Eur J Cell Biol**, v. 87, p. 469-477, 2008.
- OTTO, S.; SOTLAR, K.; EHRENFELD, M.; PAUTKE, C. Osteonecrosis of the jaw as a possible rare side effect of annual bisphosphonate administration for osteoporosis: A case report. **Med Case Rep**, v. 5, p. 477, 2011.
- PAGE, C. P.; BOHNEN, J. M.; FLETCHER, J. R.; MCMANUS, A. T.; SOLOMKIN, J. S.; WITTMANN, D. H. Antimicrobial prophylaxis for surgical wounds. Guidelines for clinical care. **Arch Surg**, v. 128, p. 79-88, 1993.
- PASCOAL, M. A.; MOURA, C. M.; JEREMIAS, F.; SOUZA, J. F.; BAGNATO, V. S.; GIUSTI, J. S.; SANTOS-PINTO, L. Longitudinal effect of curcumin-photodynamic antimicrobial chemotherapy in adolescents during fixed orthodontic treatment: A single-blind randomized clinical trial study. **Lasers Med. Sci.**, v. 30, p. 2059-2065, 2015.
- RAMPRASAD, C. Observation on the pharmacology of curcuma longa,. **Ind. J. Phys. and Pharm.**, v. 1, p. 136-143, 1957.
- RASMUSSEN, H. B.; CHRISTENSEN, S. B.; KVIST, L. P.; KARAZMI, A. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of curcuma longa. **Planta Med**, v. 66, p. 396-398, 2000.
- ROCHA, M. P.; RUELA, A. L. M.; ROSA, L. P.; SANTOS, G. P. O.; ROSA, F. C. S. Antimicrobial photodynamic therapy in dentistry using an oil-in-water microemulsion with curcumin as a mouthwash. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, p. 101962, 2020.
- ROGERS, M. J.; CROCKETT, J. C.; COXON, F. P.; MONKKONEN, J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, v. 49, p. 34-41, 2011.
- RUGGIERO, S. L.; DODSON, T. B.; ASSAEL, L. A.; LANDESBURG, R.; MARX, R. E.; MEHROTRA, B. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 67, p. 2-12, 2009.
- RUGGIERO, S. L.; DODSON, T. B.; FANTASIA, J.; GOODDAY, R.; AGHALOO, T.; MEHROTRA, B. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-2014 update. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 73, p. 1879, 2014.
- RUJIRACHOTIWAT, A.; SUTTAMANATWONG, S. Curcumin upregulates transforming growth factor- β 1, its receptors, and vascular endothelial growth factor expressions in an in vitro human gingival fibroblast wound healing model. **BMC Oral Health**, v. 21, p. 535, 2021.
- SAAD, F.; BROWN, J. E.; POZNAK, C. V.; IBRAHIM, T.; STEMMER, S. M.; STOPECK, A. T.; DIEL, I. J.; TAKAHASHI, S.; SHORE, N.; HENRY, D. H.; BARRIOS, C. H.; FACON, T.; SENEAL, F.; FIZAZI, K.; ZHOU, L.; DANIELS, A.; CARRIÈRE, P.; DANSEY, R. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: Integrated analysis

- from three blinded active-controlled phase iii trials in cancer patients with bone metastases. **Annals of Oncology**, v. 23, p. 1341-1347, 2012.
- SANTINI, D.; ZOCCOLI, A.; GREGORJ, C.; DI CERBO, M.; IULIANI, M.; PANTANO, F.; ZAMARCHI, R.; SERGI, F.; FLAMMIA, G.; BUSCARINI, M.; RIZZO, S.; CICERO, G.; RUSSO, A.; VINCENZI, B.; AVVISATI, G.; TONINI, G. Zoledronic acid induces a significant decrease of circulating endothelial cells and circulating endothelial precursor cells in the early prostate cancer neoadjuvant setting. **Oncology**, v. 85, p. 342-347, 2013.
- SENEL, F. C.; KADIOGLU DUMAN, M.; MUCI, E.; CANKAYA, M.; PAMPU, A. A.; ERSOZ, S.; GUNHAN, O. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, p. 385-391, 2010.
- SHANNON, J.; MODELEVSKY, S.; GRIPPO, A. A. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. **J Am Geriatr Soc**, v. 59, p. 2350-2355, 2011.
- SHEEDHAR, A.; SARKAR, I.; RAJAN, P.; PAI, J.; MALAGI, S. Comparative evaluation of the efficacy of curcumin gel with and without photo activation as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A split mouth clinical and microbiological study. **J Nat Sci Biol Med**, v. 6, p. 102-109, 2015.
- SHI, W.; LING, D.; ZHANG, F.; FU, X.; LAI, D.; ZHANG, Y. Curcumin promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells by inducing egr1 expression. **Archives of Oral Biology**, v. 121, p. 104958, 2021.
- SIDDHARTH, M.; SINGH, P.; GUPTA, R.; SINHA, A.; SHREE, S.; SHARMA, K. A comparative evaluation of subgingivally delivered 2% curcumin and 0.2% chlorhexidine gel adjunctive to scaling and root planing in chronic periodontitis. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v. 21, p. 494-499, 2020.
- SIDDIQI, A.; PAYNE, A. G.; ZAFAR, S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: A medical enigma? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 108, p. e1-8, 2009.
- SONIS, S. T.; WATKINS, B. A.; LYNG, G. D.; LERMAN, M. A.; ANDERSON, K. C. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. **Oral Oncol**, v. 45, p. 164-172, 2009.
- SOUZA, E.; ARAÚJO, J. S. M.; PIRES, A. C.; DOS SANTOS, E. J. L. Local delivery natural products to treat periodontitis: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, p. 4599-4619, 2021a.
- SOUZA, E. Q. M.; DA ROCHA, T. E.; TORO, L. F.; GUIATI, I. Z.; FREIRE, J. O. A.; ERVOLINO, E.; BRANDINI, D. A.; GARCIA, V. G.; THEODORO, L. H. Adjuvant effects of curcumin as a photoantimicrobial or irrigant in the non-surgical treatment of periodontitis: Systematic review and meta-analysis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, p. 102265, 2021b.
- STATKIEVICZ, C.; TORO, L. F.; DE MELLO-NETO, J. M.; DE SÁ, D. P.; CASATTI, C. A.; ISSA, J. P. M.; CINTRA, L. T. A.; DE ALMEIDA, J. M.; NAGATA, M. H.; GARCIA, V. G.; THEODORO, L. H.; ERVOLINO, E. 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.
- TANIGUCHI, N.; OSAKI, M.; ONUMA, K.; ISHIKAWA, M.; RYOKE, K.; KODANI, I.; OKADA, F. Bisphosphonate-induced reactive oxygen species inhibit proliferation and migration of oral fibroblasts: A pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **J Periodontol**, v. 7, p. 947-955, 2020.
- TERBY, S.; SHEREEF, M.; RAMANARAYANAN, V.; BALAKRISHNAN, B. The effect of curcumin as an adjunct in the treatment of chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. **Saudi Dental Journal**, v. 33, p. 375-385, 2021.
- THEODORO, L. H.; FERRO-ALVES, M. L.; LONGO, M.; NUERNBERG, M. A. A.; FERREIRA, R. P.; ANDREATI, A.; ERVOLINO, E.; DUQUE, C.; GARCIA, V. G. Curcumin

- photodynamic effect in the treatment of the induced periodontitis in rats. **Lasers Med. Sci.**, v. 32, p. 1783-1791, 2017.
- TSURUSHIMA, H.; KOKURYO, S.; SAKAGUCHI, O.; TANAKA, J.; TOMINAGA, K. Bacterial promotion of bisphosphonate-induced osteonecrosis in wistar rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 42, p. 1481-1487, 2013.
- TORO, L. F. **Avaliação do processo de reparo peri-implantar em ratas tratadas com dose oncológica ou dose osteoporótica de zoledronato**. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.
- TORO, L.F.; DE MELLO-NETO, J.M.; SANTOS, F.F.V.D.; FERREIRA, L.C.; STATKIEVICZ, C.; CINTRA, L.T.Â.; ISSA, J.P.M.; DORNELLES, R.C.M.; DE ALMEIDA, J.M.; NAGATA, M.J.H.; GARCIA, V.G.; THEODORO, L.H.; CASATTI, C.A.; ERVOLINO, E. 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, p. 22, 2019.
- UNNIKRISHNAN, M. K.; RAO, M. N. Inhibition of nitrite induced oxidation of hemoglobin by curcuminoids. **Pharmazie**, v. 50, p. 490-492, 1995.
- VASCONCELOS, A. C.; BERTI-COUTO, S. A.; AZAMBUJA, A. A.; SALUM, F. G.; FIGUEIREDO, M. A.; DA SILVA, V. D.; CHERUBINI, K. Comparison of effects of clodronate and zoledronic acid on the repair of maxilla surgical wounds - histomorphometric, receptor activator of nuclear factor-kb ligand, osteoprotegerin, von willebrand factor, and caspase-3 evaluation. **J Oral Pathol Med**, v. 41, p. 702-712, 2012.
- VILELA, M. G.; DOS SANTOS JÚNIOR, J. L.; CASTRO E SILVA, J. B. Determination of estrous cycle in rats by vaginal lavage. **Femina**, v. 35, p. 2007.
- WALTER, C.; PABST, A.; ZIEBART, T.; KLEIN, M.; AL-NAWAS, B. Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of huvec, fibroblasts and osteoblasts in vitro. **Oral Dis**, v. 17, p. 194-199, 2011.
- 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.
- WAINWRIGHT, M.; MAISH, T.; NONELL, S.; PLAETZER, K.; ALMEIDA, A.; TEGOS, G. P. Photoantimicrobials—are we afraid of the light? **The Lancet**, v. 17, p. 49-65, 2017.
- WAINWRIGHT, M. Photoantimicrobials and PACT: what's in an abbreviation? **Photochem Photobiol Sci.**, v. 18, n. 1, p. 12-14, 2019.
- WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.
- WEHRHAN, F.; STOCKMANN, P.; NKENKE, E.; SCHLEGEL, K.; GUENTSCH, A.; WEHRHAN, T.; NEUKAM, F.; AMANN, K. Differential 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, p. 216-221, 2011.
- WEITZMAN, R.; SAUTER, N.; ERIKSEN, E. F.; TARASSOFF, P. G.; LACERNA, L. V.; DIAS, R.; ALTMAYER, A.; CSERMAK-RENNER, K.; MCGRATH, L.; LANTWICKI, L. Critical review: Updated recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in cancer patients. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 62, p. 148-152, 2007.
- WILLIAMS, D. W.; VUONG, H. E.; KIM, S.; LENON, A.; HO, K.; HSIAO, E. Y. Indigenous microbiota protects against inflammation-induced osteonecrosis. **J Dent Res**, v. 99, p. 676–684, 2020.
- YAZICI, T.; KOÇER, G.; NAZIROGLU, M.; OVEY, I. S.; OZ, A. Zoledronic acid bevacizumab and dexamethasone-induced apoptosis, mitochondrial oxidative stress, and calcium signaling are decreased in human osteoblast-like cell line by selenium treatment. **Biol. Trace Elem Res.**, v. 184, p. 358-368, 2018.

- ZAFAR, S.; COATES, D. E.; CULLINAN, M. P.; DRUMMOND, B. K.; MILNE, T.; SEYMOUR, G. J. Zoledronic acid and geranylgeraniol regulate cellular behaviour and angiogenic gene expression in human gingival fibroblasts. **J Oral Pathol Med**, v. 43, p. 711-721, 2014.
- ZHANG, W.; GAO, L.; REN, W.; LI, S.; ZHENG, J.; LI, S.; JIANG, C.; YANG, S.; ZHI, K. The role of the immune response in the development of medication-related osteonecrosis of the jaw. **Front. Immunol.**, v. 12, p. 2021.
- ZHOU, T.; CHEW, D.; LI, Q.; SUN, X.; SONG, Y.; WANG, C. Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, p. 349–356, 2013.
- ZIEBART, T.; ZIEBART, J.; GAUSS, L.; PABST, A.; ACKERMANN, M.; SMEETS, R.; KONERDING, M. A.; WALTER, C. Investigation of inhibitory effects on epc-mediated neovascularization by different bisphosphonates for cancer therapy. **Biomed Rep**, v. 1, p. 719-722, 2013.

Anejos

ANEXO 1



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 emprego da curcumina associada ao diodo emissor de luz durante o reparo alveolar em ratas com alto risco para a osteonecrose dos maxilares", Processo FOA nº 00565-2018, sob responsabilidade de Edilson Ervolino apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 15 de Março de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Março de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Abril de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of the use of curcumin associated with the light emitting diode during alveolar repair in rats at high risk for osteonecrosis of the jaw", Protocol FOA nº 00565-2018, under the supervision of Edilson Ervolino presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 15, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 30, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 30, 2023.

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 (16) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO 2

DILUIÇÃO DA CURCUMINA - LABORATÓRIO DE MANIPULAÇÃO APOTHCÁRIO

- Foi feita uma solução de DMSO 0,1% mais ÁLCOOL ABSOLUTO 99,99%
- Uma diluição na concentração de 100ml/ml.
- Para solução de 50ml foram usadas 5g do ativo.
- A curcumina foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), com as especificações:

Linha	Código do material.	Descrição
000010	C1386-10G	CURCUMIN FROM CURCUMA LONGA CRYSTALLINE