



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

LUAN FELIPE TORO

**Avaliação do potencial osteogênico da terapia fotodinâmica
em ratas com os principais fatores de risco para a
osteonecrose dos maxilares**

Araçatuba – SP

2016





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

LUAN FELIPE TORO

Avaliação do potencial osteogênico da terapia fotodinâmica em ratas com os principais fatores de risco para a osteonecrose dos maxilares

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Ervolino

Araçatuba – SP

2016

Dedicatória

Ao meu pai aldir

Pai, meu exemplo de honestidade, sabedoria, bondade e persistência. O senhor sempre acreditou e confiou cegamente em meu potencial, por muitas vezes até mais do que eu mesmo acreditava que seria possível. Sua forma de olhar a vida e de encarar os problemas foi a minha fonte de inspiração durante esta caminhada quando algo parecia desafiador demais. Não consigo expressar em palavras toda a gratidão que tenho por ter sido sempre este porto-seguro e esta pessoa maravilhosa. Dedico a você tudo o que hoje sou e conquistei, e espero um dia poder retribuir, ao menos um pouco, toda sua dedicação e apoio.

À minha mãe Marcia

Mãe, meu alicerce, meu maior exemplo de cuidado, amor, doação e entrega. Eu jamais conseguiria chegar até aqui sem você. Sabemos como foram difíceis as tantas lutas que sempre enfrentamos juntos, e quantas vezes você perdeu seu sono para que eu pudesse aproveitar o meu. Ao mesmo tempo, era impossível não querer buscar cada vez mais o melhor ao ver os seus olhos brilhando e o seu sorriso verdadeiro com uma nova conquista minha. Não quero ser repetitivo, mas também dedico a você tudo o que hoje sou e conquistei. Peço a Deus para que sempre consiga honrar a altura todo esse seu amor e devoção. Chega ao fim uma das caminhadas mais importantes da minha vida, mas sei que ainda teremos muitas outras para percorrermos juntos.

À minha irmã Aniele

Uma das grandes responsáveis pela minha escolha em querer me tornar um cirurgião-dentista. **Aniele**, você sempre foi o meu exemplo de perfeição, capricho, empenho, dedicação e organização, desde os tempos de criança até os dias atuais. Além disso, é uma pessoa íntegra, correta, sensível e com um coração que não

cabe em si. Sei o quanto você está feliz com essa conquista, e espero poder enchê-la de orgulho a cada nova vitória. A distância jamais conseguirá nos afetar, pelo contrário, ela só nos faz ter a certeza de que nossa sintonia é cada vez maior. Obrigado por ser essa pessoa maravilhosa comigo e com todos. Dedico a você todas as minhas alegrias e vitórias.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir.”

Augusto Cury

Agradecimentos

Especiais

A Deus e à Nossa Senhora

Minhas fontes inesgotáveis de busca por apoio, conselho e conforto. Agradeço e reverencio por toda força e inspiração que me foram dadas durante esta longa trajetória que agora chega ao fim. Sei que serão estas mesmas forças que me farão seguir por novos caminhos, buscando cada vez o melhor para mim e para todos aqueles que amo.

“Concedei-nos Senhor, serenidade necessária, para aceitar as coisas que não podemos modificar, coragem para modificar aquelas que podemos e sabedoria para distinguirmos umas das outras.”

Reinhold Niebuhr

Ao querido mestre, orientador e amigo Prof. Edilson Ervolino

Meu eterno exemplo de profissional dedicado, íntegro, disposto e competente. Mas acima de tudo, uma pessoa maravilhosa, digna dos melhores adjetivos que possam descrevê-la. O senhor me deu a honra de poder entrar em seu laboratório e aprender com seu vasto e admirável conhecimento. Abriu meus olhos para um mundo novo, o da docência e da ciência, que hoje tanto me atrai e fascina. Jamais me esquecerei de cada uma das oportunidades e das portas que abriu para que me tornasse melhor, tanto pessoal, quanto profissionalmente. Agradeço não só pelos ensinamentos técnicos e científicos, mas pelas conversas, conselhos, brincadeiras e risadas, e por todos os bons momentos que tivemos a chance de desfrutar. Espero ter atingido as expectativas que me foram depositadas e sempre ter sido motivo de alegria e orgulho dentro de sua carreira. Sei que a caminhada está apenas começando, e que ainda teremos muita convivência e trabalho pela frente. Muito obrigado por acreditar em mim e por me ajudar, com toda sua perfeição, paciência e dedicação, a realizar mais este sonho em minha vida.

Aos Amigos de Estágio

Com vocês aprendi o que é uma equipe de verdade, e ainda mais, aprendi como podemos chegar sempre mais longe quando trabalhamos ao lado de pessoas tão dedicadas e especiais. Formamos uma verdadeira família, nossa eterna Família ZOL. E este trabalho é fruto do empenho e doação de todos vocês.

João, obrigado por todo o apoio, parceria e confiança. O destino me trouxe um estágio e nele encontrei um irmão, com quem eu sei que posso contar a qualquer momento. Sua busca sempre incansável por inovações e melhorias contínuas foi essencial para o desenvolvimento do nosso trabalho e para o grupo, de modo geral. Espero trabalharmos muito tempo juntos ainda com essa mesma força e vontade de chegar cada vez mais longe.

Thamires, com seu jeito todo especial e personalidade única, chegou e fez acontecer. E hoje, trilhando seus novos caminhos, ainda nos deixa saudades. Obrigado pela amizade, compreensão em todos os momentos e pelo carinho de sempre. Minha admiração por você é eterna.

Cristian, grande amigo e companheiro. Agradeço não apenas pelas ajudas nos mais diversos trabalhos dentro do laboratório, mas por toda alegria que sempre nos contagiava. Tenho certeza de que você ainda vai muito além do que imagina, pois sua coragem e força de vontade são admiráveis. Conte sempre com meu apoio e amizade.

Fernanda, sua inteligência, alegria e competência abrilhantaram todos os nossos trabalhos. Admiro muito a sua forma de encarar a vida e o equilíbrio que consegue encontrar entre o dever e o lazer. Obrigado pela confiança, dedicação e amizade. Estarei presente, com toda a certeza, aplaudindo as suas conquistas e vitórias.

Letícia, dona de um coração gigante, que não mede esforços para ajudar a todos que necessitam. Sua alegria e empenho foram essenciais em todas as etapas do desenvolvimento desta pesquisa e ainda serão para os muitos trabalhos que realizaremos juntos. Muito obrigado pela amizade e carinho de sempre.

Daniela, o meu maior agradecimento a você é por confiar tanto em meu potencial e acreditar em mim desta maneira. Você soube usar as melhores palavras nas horas certas, fazendo com que eu não desistisse dos meus ideais ou desanimasse em meio a tantas dificuldades. Veja em mim sempre este amigo para todos os momentos.

Tiago, muito obrigado por todo auxílio e colaboração na execução deste trabalho e de tantos outros, e também pela amizade, confiança e parceria de longa data. Abrace seus ideais e conte sempre comigo para ajudar a conquistá-los.

Luy, menino dedicado, atencioso, íntegro. Sua força de vontade e o desejo de ajudar a todos são diferenciais que o levarão muito longe. Obrigado por todo carinho e repeito, por mim e por nosso trabalho.

Nathália, que prazer e alegria imensa recebê-la neste grupo tão especial. Não tenho dúvidas de que sua serenidade, alegria, simpatia e prontidão foram fundamentais para que conseguíssemos melhorar ainda mais os nossos trabalhos. Tenha sempre a certeza do meu carinho e afeição por você.

Aos Amigos de Graduação

A princípio, seis anos me parecia um tempo inesgotável, e é impossível negar que o maior de todos os objetivos era realmente a conclusão deste período. Porém, os anos foram passando, por vezes rápido demais, por outras lentamente, e todas as pessoas que fizeram parte desta trajetória permanecerão guardadas no meu coração e em minha memória.

Aos eternos amigos da **13ª turma do curso noturno de Odontologia**, meus mais sinceros agradecimentos. Vocês são espetaculares e se tornaram a minha segunda família. Será difícil acostumar que não nos encontraremos todos os dias, que não teremos mais a mesma rotina de clínicas, aulas ou estudaremos para as provas de final de bimestre. É difícil acreditar que não teremos mais nossas divertidas confraternizações de final ano ou de volta às aulas, festas juninas e churrascos. Porém, esta é a sequência natural da vida, na qual sempre precisamos

encerrar ciclos para começar outros ainda melhores e mais vitoriosos. Estarei na torcida pela felicidade e sucesso de cada um, e desejo que este seja apenas o primeiro grande passo para um futuro inenarrável.

Juliana, minha amiga e parceira de todas as horas, quantas coisas passamos juntos, não é? Sei que tropeçamos inúmeras vezes, mas sempre buscamos nos levantar e dar a volta por cima. É impossível traduzir em palavras todo o carinho, respeito, admiração e gratidão que tenho pela pessoa que é e por tudo o que fez por mim e pela nossa amizade. Foi um prazer imenso dividir experiências e poder aprender com você todo este tempo. Que Deus ilumine sempre os seus passos e que seu futuro seja ainda mais coroado de sucessos, pois capacidade e força de vontade para isso você tem, e de sobra. Estarei sempre ao seu lado, torcendo e vibrando com suas conquistas.

Ana e Henrique, às vezes o destino coloca algumas pessoas por acaso em nossas vidas, mas não é por acaso que elas permanecem. Vocês foram muito mais do que bons colegas de curso, foram verdadeiros amigos, com quem eu sei que poderei contar para o resto da vida. Só tenho a agradecer por toda confiança, conselhos, risadas e desafios que sempre enfrentamos e vencemos juntos. Não tenho dúvidas de que a vida os espera com muitas alegrias e recompensas por serem tão bons e dedicados em tudo que fazem. Muito obrigado por sonharem e realizarem mais este desafio juntos comigo.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

Agradecimientos

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, e em especial à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, nas pessoas do senhor diretor **Prof. Tit. Wilson Roberto Poi** e do senhor vice-diretor **Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho**, pela oportunidade de realizar o curso de graduação e esta pesquisa.

À **Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe-UNESP)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica PIBIC/Reitoria (2013-2014) e PIBIC/CNPq (2014-2015). À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, também pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica (processo nº 2015/22395-2).

Aos meus eternos e admirados **mestres**, professores efetivos e substitutos, que sempre se mostraram extremamente capacitados, preparados e dispostos para transmitir todo o conhecimento necessário, não se limitando às teorias, mas permitindo que eu realmente vivesse a Odontologia em sua forma mais profunda e ampla. Todos os passos que trilharei de agora em diante serão apoiados em bases sólidas adquiridas nesta casa. Muito obrigado.

Meu agradecimento especial à **Disciplina de Histologia e Embriologia**, representada pelos docentes **Prof. Adj. Cláudio Aparecido Casatti**, **Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino**, **Profª. Ass. Dra. Alaíde Gonçalves** e **Profª. Ass. Dra. Mariza Akemi Matsumoto**, pelo tão grande acolhimento e aceitação, pela possibilidade de monitoria e participação em projetos de pesquisa e extensão universitária, que permitiram meu crescimento pessoal, profissional e contribuíram sobremaneira para minha formação. Vocês se tornaram o ponto de referência para o meu futuro na sonhada carreira acadêmica.

À **Profª. Ass. Dra. Roberta Okamoto**, da **Disciplina de Anatomia**, pelo extraordinário convívio, carisma e pronta ajuda em todos os momentos do desenvolvimento deste e de outros projetos. Sua alegria e amor pelo trabalho contagiam a todos por onde passa. Meus sinceros agradecimentos e eterno respeito também aos demais docentes da Disciplina de Anatomia, **Prof. Tit. José Américo de Oliveira**, **Prof. Adj. Roelf Justino Cruz Rizzolo** e **Prof. Ass. Dr. Paulo Roberto Botacin**, por todos os ensinamentos transmitidos durante as aulas e conversas no departamento.

Aos colegas e amigos de departamento, com os quais tive a honra de trabalhar e o prazer de passar momentos indescritíveis. Meu agradecimento especial à **Jaqueline S. Hassumi**, pela amizade, companheirismo e ajuda de sempre; ao doutorando **Gestter W. L. Tessarin** e à doutora **Kelly R. T. Silva**, pela boa vontade para ensinar técnicas laboratoriais, pelo convívio, atenção e confiança; e à doutora **Bruna G. S. Kotake**, pela capacidade de transformar o ambiente de trabalho em um lugar mais alegre e motivador, e a pesquisa em algo mais prazeroso, sem perder o foco, a busca pela perfeição e o respeito que merece. Minha admiração e gratidão por vocês são eternas.

Ao **Departamento de Ciências Básicas**, na pessoa da chefe de departamento **Prof^a. Adj. Doris Hissako Sumida**, e aos servidores técnico-administrativos **Eliseide Maria Ferreira Silva Navega**, **André Luís Mattos Piedade**, **Sandra Aparecida dos Santos Pinheiro** e **Arnaldo César dos Santos**, pelo apoio e possibilidade de execução de toda a parte experimental e laboratorial do presente trabalho, além da convivência e aprendizado que tanto enriqueceram minha formação.

A todos os meus familiares, e em especial aos meus avós **Esther**, **Urbano**, **Marli** e **Jaime**, ao meu cunhado **Gustavo**, aos meus tios **Josiane** e **Márcio** e aos primos **Thaís** e **Vinícius**, pela dedicação, paciência, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida. Vocês foram essenciais para esta conquista, da mesma forma que serão para todas as outras. Muito obrigado.

Aos meus eternos amigos e colegas, que tanto me incentivaram e deram forças para que eu realizasse este sonho, mesmo em meio a tantas dificuldades e desafios. Os conselhos, o apoio e a alegria de vocês sempre motivaram a minha busca por novos ideais, dentro e fora da faculdade. Meus agradecimentos especiais aos amigos **Desirée A. Caldeira**, **Raquel L. Balesteros**, **Rafaela L. B. Érnica**, **Felipe N. Moraes**, **Denis Contini**, **Márcio R. Contardi**, **Natalie Bordin**, **Marina S. Fornazieri**, **Carolina C. S. Lacerda**, **Rafael S. Gonsalves**, **Henrique J. Mascotte**, **Diva G. Demarchi** e **Paula L. Faleiros**, por todos os bons momentos que passamos juntos.

E enfim, aos **animais** desta pesquisa, por servirem à ciência com suas próprias vidas.

Epígrafe

***“Há os que se queixam do vento, os que esperam que ele
mude e os que procuram ajustar as velas.”***

Willian G. Ward

Resumo

TORO, L. F. **Avaliação do potencial osteogênico da terapia fotodinâmica em ratas com os principais fatores de risco para a osteonecrose dos maxilares.** 2016. 73 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

Os bisfosfonatos (BPs) são medicamentos empregados no tratamento de doenças ou condições osteolíticas. Dentre seus efeitos adversos está a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M). A etiopatogenia de tal condição ainda não está completamente elucidada, uma das razões para que os tratamentos preventivos e curativos atuais não apresentem elevada efetividade. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), em função de sua potente ação bioestimulatória e de sua capacidade antimicrobiana se mostra uma estratégia terapêutica preventiva promissora para a ONM-M. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial osteogênico da aPDT no sítio de extração dental de ratas que apresentavam os principais fatores de risco para o desenvolvimento de ONM-M. Trinta ratas (20 meses de idade) foram divididas em quatro grupos experimentais: SAL, SAL/aPDT, ZOL e ZOL/aPDT. O plano de tratamento medicamentoso teve duração de sete semanas. As ratas receberam injeções intraperitoneais de 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (SAL e SAL/aPDT) ou 0,45 ml da mesma solução acrescida de 100 µg/Kg de zoledronato (ZOL e ZOL/aPDT) com um intervalo de dois dias entre as aplicações. Decorridas três semanas de tratamento, todas as ratas foram submetidas à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Nos grupos SAL/aPDT e ZOL/aPDT as ratas foram submetidas a sessões de aPDT aos 0, 2 e 4 dias pós-exodontia. Decorridos 28 dias pós-operatórios, todas as ratas foram submetidas à eutanásia. Amostras do sítio de extração dental foram devidamente processadas e submetidas ao exame clínico, avaliação histopatológica e análise imunoistoquímica direcionada para BMP2/4 (proteína morfogenética óssea 2/4), RUNX-2 (fator de transcrição relacionado à runt-2), OCN (osteocalcina), OPG (osteoprotegerina), RANKL (receptor ativador do fator nuclear kappa-β ligante) e TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato). Em ZOL o processo de reparação

tecidual foi severamente comprometido e condizente com um quadro de ONM-M. Este grupo apresentou menor imunomarcção para BMP2/4 e OCN e maior imunomarcção para RUNX-2 quando comparado com os demais grupos. O processo de reparação tecidual, a quantidade de células BMP2/4-positivas, OCN-positivas e RUNX-2-positivas em ZOL/aPDT não diferiu de SAL. Os grupos tratados com zoledronato apresentaram maior imunomarcção para OPG e menor imunomarcção para RANKL e TRAP quando comparados com os grupos que receberam o veículo. Deste modo, conclui-se que a aPDT mostrou-se uma terapia preventiva segura e efetiva para melhorar a reparação tecidual do sítio de extração dental em ratas com os principais fatores de risco para a ONM-M, a qual é substancialmente comprometida pelo tratamento com dose oncológica de zoledronato.

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

Abstract

TORO, L. F. **Osteogenic potential evaluation of photodynamic therapy in female rats with the main risk factors for osteonecrosis of the jaws**. 2016. 73 p. End of course paper (Bachelor degree) – Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

Bisphosphonates (BPs) are drugs used in the treatment of osteolytic diseases or conditions. Among their adverse effects there is the medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). The etiology of the disease is still poorly understood, being one of the reasons why the current preventive and curative treatments do not show high effectiveness. Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), due to its powerful biostimulator action and its antimicrobial capacity, is shown as a promising preventive therapeutic strategy for MRONJ. The purpose of this study was to evaluate the osteogenic potential of the aPDT in the site of tooth extraction in female rats presenting the main risk factors to development MRONJ. Thirty female rats (20 months old) were divided in four experimental groups: SAL, SAL/aPDT, ZOL, and ZOL/aPDT. Drug treatment plan lasted seven weeks and 0.45 ml solution of 0.9% NaCl (SAL and SAL/aPDT) or 0.45 ml of this solution plus 100 µg/kg of zoledronate (ZOL and ZOL/aPDT) was administered, every 2 days, by intraperitoneal injection. After three weeks of treatment, extraction of the lower left first molar was performed. The aPDT sessions were performed at 0, 2 and 4 days post extraction in groups SAL/aPDT and ZOL/aPDT. Twenty-eight days after the surgeries all the animals were euthanized. Samples of the site of tooth extraction were processed and submitted to clinical examination, histopathologic and immunohistochemical analysis directed to BMP2/4 (bone morphogenetic protein 2/4), RUNX-2 (runt-related transcription factor 2), OCN (osteocalcin), OPG (osteoprotegerin), RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-β ligand) and TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase). In ZOL group the tissue repair process has been severely compromised and consistent with MRONJ. It presented a lower immunostaining to BMP2/4 and OCN and a higher immunostaining to RUNX-2 compared to the other groups. The tissue repair process, the number of BMP2/4-positive, OCN-positive and

RUNX-2-positive cells in ZOL/aPDT were not different from SAL. The groups treated with zoledronate showed a higher immunostaining to OPG and a lower immunostaining to RANKL and TRAP compared to the groups that received vehicle. From the results, it can be concluded that aPDT is presented as a secure and an effective preventive therapy in order to improve tissue repair in the site of tooth extraction in female rats presenting the main risk factors to MRONJ, which is highly compromised by the treatment with oncologic doses of zoledronate.

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

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotografias evidenciando o aspecto clínico do primeiro molar inferior 59
esquerdo três semanas após a instalação da ligadura e sua
manutenção em posição peridental (A), as manobras operatórias para a
exodontia do primeiro molar inferior esquerdo (B), o alvéolo dental pós-
exodontia (C), assim como uma sessão de aPDT realizada 2 dias após
a exodontia do elemento dental (D).
- Figura 2 - Fluxograma evidenciando o delineamento experimental do estudo nos 59
grupos SAL e ZOL (A) e SAL/aPDT e ZOL/aPDT (B).
- Figura 3 - Gráfico apresentando a evolução do peso corporal das ratas ao longo 59
do período experimental nos grupos SAL (traçado cinza), SAL/aPDT
(traçado vermelho), ZOL (traçado azul) e ZOL/aPDT (traçado verde).
- Figura 4 - Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido 61
conjuntivo e tecido ósseo no sítio de extração dental e adjacências nos
grupos SAL (A, D, G, J, M), ZOL (B, E, H, K, N) e ZOL/aPDT (C, F, I, L,
O). Em ZOL observar: persistência de inflamação no tecido conjuntivo
sobrejacente ao sítio de extração dental (B); presença frequente de
área ocupada por osso não vital (E); grandes sequestros ósseos nas
adjacências do sítio de extração (H); pequena quantidade de tecido
ósseo neoformado no alvéolo dental (K) e; presença de osteoclastos
arredondados, hipernucleados e sem relação com a matriz óssea (N).
Em SAL e ZOL/aPDT as características histológicas se mostraram
similares: ausência de inflamação no tecido conjuntivo sobrejacente ao
sítio de extração dental (A, C); ausência de grandes áreas de osso não
vital (D, F, G, I); presença de pequena quantidade de lacunas vazias (F,
I); nenhum sequestro ósseo nas adjacências do sítio de extração e;
alvéolos dentais preenchidos por tecido ósseo (J, L). Em SAL os
osteoclastos se apresentaram grandes, multinucleados e associados ao
tecido ósseo (M), indício de atividade celular, ao passo que em
ZOL/aPDT os osteoclastos se mostraram com o mesmo aspecto
morfológico observado em ZOL (O). Abreviações e símbolos: tc, tecido

conjuntivo; to, tecido ósseo; vs, vasos sanguíneos; setas brancas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias; setas azuis, osteoblastos; setas verdes, osteoclastos. Coloração: *HE*. Aumento original: 400x (A-I); 200x (J-L); 2000x (M-O). Barras de escala: 75 µm (A-I); 150 µm (J-L); 15 µm (M-O).

Figura 5 - Imunomarcção para BMP2/4, RUNX-2 e OCN no tecido ósseo do sítio 62
de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. Gráficos apresentando a quantidade de células BMP2/4-positivas (A), células RUNX-2-positivas (B) e células OCN-positivas (C) no tecido ósseo do sítio do sítio de extração dental nos diferentes grupos. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para BMP2/4 (D, G, J, M), RUNX-2 (E, H, K, N) e OCN (F, I, L, O) em SAL (D-F), SAL/aPDT (G-I), ZOL (J-L) e ZOL/aPDT (M-O). Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação a SAL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação a SAL/aPDT; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris* (D, F, G, I, J, L, M, O); *Fast green* (E, H, K, N). Barras de escala: 25 µm (D-O).

Figura 6 - Imunomarcção para OPG, RANKL e TRAP no tecido ósseo do sítio de 63
extração dental aos 28 dias pós-operatórios. Gráficos apresentando a quantidade de células OPG-positivas (A), células RANKL-positivas (B) e células TRAP-positivas (C) no tecido ósseo do sítio do sítio de extração dental nos diferentes grupos. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OPG (D, G, J, M), RANKL (E, H, K, N) e TRAP (F, I, L, O) em SAL (D-F), SAL/aPDT (G-I), ZOL (J-L) e ZOL/aPDT (M-O). Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação a SAL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação a SAL/aPDT; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris* (D-O). Barras de escala: 25 µm (D-O).

Lista de

Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a 60
análise histopatológica dos tecidos durante o processo de reparação
pós-extração dental em SAL, SAL/aPDT, ZOL e ZOL/aPDT aos 28 dias
pós-operatórios.

Lista de
Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

% =	porcentagem
± =	mais ou menos
°C =	graus Celsius
< =	menor
† =	diferença estatisticamente significativa em relação a SAL
‡ =	diferença estatisticamente significativa em relação a SAL/aPDT
¶ =	diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL
µg/Kg =	microgramas por quilograma
µg/ml =	microgramas por mililitro
µl =	microlitros
µm =	micrômetros
AAOMS =	Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial
AM =	Amazonas, Brasil
aPDT =	terapia fotodinâmica antimicrobiana
BMP2/4 =	proteína morfogenética óssea 2/4
BP =	bisfosfonato
BPs =	bisfosfonatos
CEUA =	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm ² =	centímetros quadrados
EDTA =	ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA =	Estados Unidos da América
FOA =	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g =	gramas
HE =	hematoxilina-eosina
InGaAlP =	Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo
J/cm ² =	Joules por centímetro quadrado
J/ponto =	Joules por ponto
LLL=	laser em baixa intensidade
M =	molar
mg/Kg =	miligramas por quilograma
ml =	mililitros

mm =	milímetros
mm ² =	milímetros quadrados
MO =	Missouri, EUA
MRONJ =	medication-related osteonecrosis of the jaws
mW =	miliWatts
Nº =	número
nm =	nanômetros
OCN =	osteocalcina
ONM-M =	osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa
OPG =	osteoprotegerina
PBS =	tampão fosfato salino
PE =	periodontite experimental
pH =	potencial hidrogeniônico
RANKL =	receptor ativador do fator nuclear kappa-β ligante
RS =	Rio Grande do Sul, Brasil
RUNX-2 =	fator de transcrição relacionado à runt-2
seg =	segundos
SP =	São Paulo, Brasil
tc =	tecido conjuntivo
to =	tecido ósseo
TRAP =	fosfatase ácida resistente ao tartarato
UNESP =	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
vs =	vasos sanguíneos
x =	vezes
W/cm ² =	Watts por centímetro quadrado

Sumário

SUMÁRIO

1. Introdução	32
2. Objetivo	37
3. Metodologia	39
3.1 Delineamento experimental	40
3.1.1 Anestesia	40
3.1.2 Peridontite induzida por ligadura	40
3.1.3 Protocolo medicamentoso	40
3.1.4 Exodontia	41
3.1.5 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)	41
3.1.6 Grupos experimentais	41
3.1.7 Eutanásia e obtenção das amostras	42
3.2 Processamento histológico das amostras	42
3.3 Análise dos resultados	43
3.3.1 Análise da condição geral de saúde e exame clínico intrabucal	43
3.3.2 Análises histológicas	43
3.3.2.1 Análise histopatológica do sítio de extração dental e adjacências	43
3.3.2.2 Análise imunoistoquímica	44
3.3.3 Análise estatística dos dados	44
4. Resultados	45
4.1 Condição geral de saúde e exame clínico intrabucal	46
4.2 Análise histopatológica do processo de reparação tecidual pós-exodontia	46
4.3 Padrão de imunomarcacão	46
4.3.1 BMP2/4 no tecido ósseo do sítio de extração dental	47
4.3.2 RUNX-2 no tecido ósseo do sítio de extração dental	47
4.3.3 OCN no tecido ósseo do sítio de extração dental	47
4.3.4 OPG no tecido ósseo do sítio de extração dental	47
4.3.5 RANKL no tecido ósseo do sítio de extração dental	47
4.3.6 TRAP no tecido ósseo do sítio de extração dental	48
5. Discussão	49
6. Conclusão	56
Figuras e Tabelas	58

Referências	64
Anexos	72
ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	73

Introdução

1. Introdução

Os bisfosfonatos (BPs) são fármacos amplamente utilizados para o tratamento de osteopatias com atividade osteolítica, controle de dor óssea, regulação de hipercalcemia e inibição da progressão de metástase em neoplasias malignas osteotrópicas (DRAKE et al., 2008). Tais medicamentos exercem potente ação inibitória sobre o processo de reabsorção óssea (ROGERS et al., 2011). Os BPs apresentam uma estrutura química análoga ao pirofosfato endógeno, representada por dois grupamentos fosfatos unidos covalentemente a um carbono central, no qual estão ligadas duas cadeias laterais, R1 e R2, responsáveis pela afinidade da droga aos cristais de hidroxiapatita e pela potência e principais propriedades farmacológicas de cada um dos BPs, respectivamente (ROGERS et al., 2011). Há duas principais classes de BPs, cujas estruturas químicas diferem por apresentarem ou não nitrogênio em sua cadeia lateral R2 (ROGERS et al., 2011). Dos BPs que contêm nitrogênio, o zoledronato é o que apresenta a maior potência relativa. O zoledronato altera o metabolismo ósseo atuando pela inibição da via do mevalonato (ROGERS et al., 2011), que impede a ocorrência de inúmeras alterações na dinâmica do citoesqueleto dos osteoclastos, as quais são essenciais para a execução da atividade reabsortiva. Além disso, inibe a osteoclastogênese (ABE et al., 2012) e estimula o desencadeamento de apoptose prematura em osteoclastos ativos (COXON & ROGERS, 2003; EBERTINO et al., 2011; ORY et al., 2008; ROGERS et al., 2011).

Com o envelhecimento da população mundial, aumenta-se o surgimento de doenças ou condições osteolíticas e, conseqüentemente, será cada vez mais frequente o emprego de drogas com ação anti-reabsortiva, como os BPs e os inibidores de RANKL. Uma reação adversa ocasionada por estes tipos de medicamentos e que ainda se constitui em um desafio para a odontologia é a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M) (RUSSELL, 2011). A Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial (AAOMS, American Association of Oral and Maxilofacial Surgery) define a ONM-M como a presença de osso exposto na região maxilofacial, por um período maior do que oito semanas, em pacientes submetidos a tratamento prévio ou atual com droga anti-reabsortiva e que não possuem história prévia de radioterapia nos maxilares

(RUGGIERO & DODSON, 2014). Esta é uma condição bastante rara em pacientes que fazem uso de BPs administrados por via oral, no entanto, sua incidência atinge de 1 a 12% dos pacientes que utilizam tais medicamentos pela via intravenosa. Além disso, os BPs têm efeito cumulativo, e esta incidência pode atingir 21% dos pacientes após o terceiro ano de uso deste tipo de fármaco (GOMEZ FONT et al., 2008).

Estudos epidemiológicos reportaram que a ONM-M acomete com maior frequência pacientes do gênero feminino, com idade avançada, que fazem ou fizeram uso crônico de BPs administrados por via intravenosa, especificamente o zoledronato, ou este em associação com outros BPs. Há uma predileção pela ocorrência na mandíbula, na região de pré-molares e molares e a extração dentária tem sido apontada como um dos principais fatores desencadeadores (OTTO et al., 2011). Recentemente, estudos clínicos e experimentais têm atentado para o fato de que a exodontia de dentes com comprometimento periodontal e/ou periapical é um grande fator de risco local, ou seja, a presença prévia de inflamação e infecção local exerce um papel crucial no desencadeamento da ONM-M pós-exodontia (AGUIRRE et al., 2012; KANG et al., 2013; MAWARDI et al., 2009; RUGGIERO & DODSON, 2014).

Ainda que as primeiras descrições de ONM-M tenham sido publicadas em 2003 (MARX, 2003; MIGLIORATI, 2003; WANG et al., 2003), a etiopatogenia da doença é pobremente compreendida, o que dificulta sobremaneira sua prevenção e tratamento (HANASONO et al., 2013; RUGGIERO et al., 2009; WEITZMAN et al., 2007). Dentre os supostos fatores etiopatológicos apontados como desencadeadores da ONM-M estão: a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos; o efeito citotóxico dos BPs; o potente efeito antiangiogênico; e o favorecimento à infecção induzida por tais medicamentos, que aumentam significativamente a capacidade de adesão e colonização bacteriana ao tecido ósseo exposto (ALLEN & BURR, 2009; BADEL et al., 2013; MIGLIORATI et al., 2011; SHANNON et al., 2011; SIDDIQI et al., 2009). Todavia, muitas são as hipóteses e poucas são as comprovações científicas.

A investigação dos fatores etiopatológicos em humanos apresenta claras limitações e, portanto, atualmente os modelos experimentais em animais têm direcionado as pesquisas clínicas, os quais podem ser empregados na avaliação de terapias curativas e preventivas para a ONM-M. O tratamento da ONM-M tem sido

efetuado por diferentes abordagens clínicas, as quais têm se baseado exclusivamente no estadiamento clínico da doença, e compreendem desde bochechos com gluconato de clorexidina 0,12%, antibioticoterapia, até debridamento cirúrgico da lesão, que em alguns casos pode consistir em mandibulectomia ou maxilectomia parcial (HANASONO et al., 2013; LAM et al., 2007; RUGGIERO et al., 2009; WEITZMAN et al., 2007). No entanto, como alguns BPs são utilizados no tratamento de doenças extremamente graves e debilitantes, a ocorrência da ONM-M e, até mesmo o seu tratamento, comprometem substancialmente ou provocam a interrupção do tratamento da doença de base e a qualidade de vida do paciente.

Atualmente tem sido sugerida a prescrição de antibioticoterapia profilática em pacientes que fazem uso crônico de BPs e necessitam de intervenções odontológicas invasivas, especialmente exodontias (HOEFERT & EUFINGER, 2011; LITTLE et al., 2008; LOPEZ-JORNET et al., 2011). Um protocolo preventivo ideal é aquele que apresenta grande eficácia e nenhum ou desprezíveis efeitos adversos. Todavia, alguns estudos em animais e em humanos demonstraram que a antibioticoprofilaxia pode falhar na prevenção da ocorrência de ONM-M (HOEFERT & EUFINGER, 2011; LOPEZ-JORNET et al., 2011). Isso ocorre justamente por que tal conduta está baseada no empirismo, pois não há comprovação científica de que a ONM-M seja um evento desencadeado ou sustentado por um processo infeccioso, o que explicaria o insucesso da antibioticoterapia profilática. Soma-se a isso o fato de o uso inadequado de um antimicrobiano na antibioticoprofilaxia 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; LITTLE et al., 2008; PAGE et al., 1993).

Assim, uma proposta de terapia preventiva para ONM-M que merece ser avaliada é a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). A aPDT é uma técnica que utiliza espécies de oxigênio altamente reativo, predominantemente o oxigênio singleto, produzidas por uma solução não-tóxica ou molécula fotossensibilizadora na presença de luz visível em baixa intensidade, com o objetivo de destruir células, principalmente bacterianas, por meio de uma cascata de eventos oxidativos (ATHAR et al., 1988; KHARKWAL et al., 2011). Além disso, na aPDT são verificados todos os efeitos bioestimulatórios da irradiação com laser em baixa intensidade (LLL), as

quais têm sido reportadas por estudos *in vitro* (GUZZARDELLA et al., 2002; OZAWA et al., 1998; TAKEDA, 1988) e *in vivo* (BRAUN et al., 2008; DARRAS-VERCAMBRE et al., 2006; LUI et al., 2011). A irradiação com LLL estimula a proliferação de células epiteliais e, conseqüentemente, auxilia na regeneração dos epitélios de revestimento (ALGHAMDI et al., 2011). Ela induz proliferação de fibroblastos (ALGHAMDI et al., 2011) e estimula tais células a produzirem os elementos da matriz extracelular, especialmente o colágeno. Também estimula o processo de diferenciação de osteoblastos e provoca um aumento da atividade dos osteoblastos ativos, o que acelera o processo de reparo ósseo. E ainda é capaz de promover um substancial aumento na neoangiogênese local (SCHINDL et al., 2003). Segundo Takeda (1988), a irradiação com LLL em alvéolos dentais pós-exodontia mostrou-se capaz de promover significativo aumento na angiogênese local, acréscimo na quantidade de fibras colágenas e incremento na quantidade de osteoblastos, o que acelerou sobremaneira o processo de reparo alveolar. Diante de sua capacidade antimicrobiana, do seu efeito bioestimulatório e da ausência de efeitos adversos, a aPDT poderia se mostrar efetiva como proposta terapêutica preventiva para quem faz uso crônico de BPs e necessita de intervenções odontológicas invasivas.

Objetivo

2. Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da aPDT, especificamente seu potencial osteogênico, no sítio de extração dental de ratas que apresentavam os principais fatores de risco para o desenvolvimento de ONM-M. Tal avaliação consistiu em exame clínico; avaliação histopatológica do processo de reparação tecidual e; análise imunoistoquímica direcionada para os seguintes biomarcadores: BMP2/4 (proteína morfogenética óssea 2/4), RUNX-2 (fator de transcrição relacionado à runt-2) e OCN (osteocalcina), envolvidos com a osteoblastogênese e regulação da atividade dos osteoblastos; OPG (osteoprotegerina) e RANKL (receptor ativador do fator nuclear kappa- β ligante), envolvidos com a osteoclastogênese e regulação da atividade dos osteoclastos e; TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato), um evidenciador do recrutamento de osteoclastos

Metodologia

3. Metodologia

No presente estudo foram utilizadas 30 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), com 20 meses de idade e peso corporal compreendido entre 350 – 450 g. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA – UNESP (PROCESSO CEUA Nº 00581-2013).

3.1 Delineamento experimental

3.1.1 Anestesia

Para todos os procedimentos cirúrgicos (instalação da ligadura, exodontia e eutanásia), os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil).

3.1.2 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, que foi mantida durante três semanas, com o intuito de induzir a periodontite experimental (PE) (Fig. 1A).

3.1.3 Protocolo medicamentoso

O plano de tratamento medicamentoso teve duração de sete semanas e a administração de veículo ou zoledronato (Sigma Chemical®, St Louis, MO, EUA) ocorreu pela via intraperitoneal, obedecendo um intervalo de dois dias entre as injeções. A dose de zoledronato foi de 100 µg/Kg, a qual foi diluída em 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%. Tal dose e o plano de tratamento medicamentoso consistiram em uma adaptação para o rato do protocolo empregado atualmente para a terapia oncológica em humanos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2016; SILVA et al., 2015).

3.1.4 Exodontia

Para a exodontia do primeiro molar inferior, os animais foram posicionados em mesa cirúrgica, a ligadura foi removida, foi executada a anti-sepsia da cavidade bucal, sindesmotomia, luxação e extração do primeiro molar inferior esquerdo com a utilização de instrumentais odontológicos adaptados (Fig. 1B e 1C).

3.1.5 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

Foi utilizado como agente fotossensibilizador o azul de metileno na concentração de 100 µg/ml. Foi depositado no sítio de extração e na mucosa sobrejacente do primeiro molar inferior esquerdo 500 µl do agente fotossensibilizador. Sessenta segundos após a sua deposição foi realizada a irradiação com LLL. O laser de baixa potência que foi empregado no presente estudo para a realização da aPDT foi o Thera Lase® (D.M.C. Equipamentos Ltda®, SP, Brasil), que possui as seguintes características: emissor: InGaAlP; comprimento de onda: 660 nm (laser visível - vermelho); potência: 35 mW; modo de operação: laser contínuo; diâmetro do spot: 0,0283 cm²; modo de aplicação: laser contato, pontual; energia: 2,1 J/ponto; quantidade de pontos de aplicação: 1; tempo de exposição: 60 seg; densidade energética por ponto: 74,2 J/cm²; irradiância: 1,23 W/cm². O laser foi aplicado em um único ponto no centro do alvéolo com a ponteira laser posicionada paralelamente ao seu longo eixo e em contato com a área tratada (Fig. 1D).

3.1.6 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: SAL, SAL/aPDT, ZOL, ZOL/aPDT.

Grupo SAL: receberam injeção intraperitoneal de 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% a cada intervalo de dois dias, durante sete semanas. Na terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e, decorridos 28 dias pós-operatórios, foram submetidos à eutanásia (Fig. 2A).

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

Grupo ZOL: receberam injeção intraperitoneal de 0,45 ml de zoledronato diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% a cada intervalo de dois dias, durante sete semanas. Na terceira semana de tratamento foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e, decorridos 28 dias pós-operatórios, foram submetidos à eutanásia (Fig. 2A).

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

3.1.7 Eutanásia e obtenção das amostras

Para eutanásia, os animais foram profundamente anestesiados e procedeu-se a perfusão transcardíaca com solução salina fisiológica acrescida de 0,1% de heparina (100 ml), seguida de solução fixadora (800 ml), constituída de 4% de formaldeído (Sigma Chemical®) em tampão fosfato salino (PBS - Sigma Chemical®), 0,1M, 4°C, pH 7,4.

3.2 Processamento histológico das amostras

As hemimandíbulas foram dissecadas e submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora durante 72 horas. As amostras foram desmineralizadas em solução constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma Chemical®), durante 60 dias, submetidas ao processamento histológico convencional, incluídas em parafina, e seccionadas em micrótomo com 4 µm de espessura. Foram coletados, de lingual para vestibular, os cortes semi-seriados da porção do alvéolo dental anteriormente ocupada pelo primeiro molar inferior esquerdo e adjacências.

Para a análise histopatológica do sítio de extração dental e adjacências, as secções histológicas foram submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina (HE).

Para análise imunoistoquímica, as secções histológicas foram submetidas à técnica da imunoperoxidase indireta empregando-se os seguintes anticorpos primários: anti-BMP2/4 do rato gerado em coelho (SC-9003, Santa Cruz Biotechnology®), anti-RUNX-2 do rato gerado em coelho (SC-10758, Santa Cruz Biotechnology®), anti-

OCN do rato gerado em cabra (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology®), anti-OPG do rato gerado em cabra (SC-8468, Santa Cruz Biotechnology®), anti-RANKL do rato gerado em cabra (SC-7628, Santa Cruz Biotechnology®) e anti-TRAP do rato gerado em cabra (SC-30833, Santa Cruz Biotechnology®). O processamento imunoistoquímico seguiu o protocolo descrito por Garcia et al. (2014). Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos mesmos procedimentos, suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

3.3 Análise dos resultados

3.3.1 Análise da condição geral de saúde e exame clínico intrabucal

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

3.3.2 Análises histológicas

Foram utilizadas três secções histológicas equidistantes para se efetuar a análise histopatológica e uma secção histológica do centro do alvéolo dental para se efetuar as análises imunoistoquímicas. Em cada secção foi analisada uma área de 4 mm² (2 mm x 2 mm) da mandíbula, situada na porção mesial do segundo molar inferior esquerdo. As imagens foram capturadas via utilização de câmera digital (AxioCam®, Carl Zeiss) acoplada ao microscópio óptico (AxioLab®) e conectada a um microcomputador. Todas as análises foram realizadas por um histologista certificado (EE), previamente calibrado e cego aos tratamentos.

3.3.2.1 Análise histopatológica do sítio de extração dental e adjacências

Foi efetuada em microscopia óptica avaliando-se os seguintes parâmetros: 1) intensidade da resposta inflamatória local; 2) extensão do processo inflamatório; 3) padrão de celularidade e de estruturação do tecido epitelial; 4) padrão de celularidade e de estruturação do tecido conjuntivo; 5) padrão de celularidade e de estruturação do tecido ósseo e; 6) padrão de contaminação do sítio de extração dental.

3.3.2.2 Análise imunoistoquímica

Foram adquiridas imagens do tecido ósseo neoformado das secções histológicas imunomarcadas com BMP2/4, RUNX-2, OCN, OPG, RANKL e TRAP. Com o auxílio do programa de análise de imagens (ImageLab®) foi realizada a mensuração da área ocupada por tecido ósseo no sítio de extração dental. Em cada uma destas secções histológicas foram quantificadas as células imunomarcadas. Tais valores foram expressos por mm^2 sob a forma de média $\pm$ desvio padrão.

3.3.3 Análise estatística dos dados

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brasil). Foram empregados os testes de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey para estabelecimento das comparações entre os diferentes grupos experimentais e períodos. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

4. Resultados

4.1 Condição geral de saúde e exame clínico intrabucal

As condições gerais de saúde dos animais utilizados neste estudo se mantiveram constantes durante todo o período experimental. Tais animais toleraram muito bem o procedimento cirúrgico de exodontia do primeiro molar inferior, realizado em todos os grupos experimentais, assim como as três sessões de aPDT, realizadas nos grupos SAL/aPDT e ZOL/aPDT. Ao final do período experimental não houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal médio dos animais entre SAL, SAL/aPDT, ZOL e ZOL/aPDT. Também não houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal dos animais de um mesmo grupo ao longo do período experimental. A maioria dos animais apresentou uma leve redução do peso corporal após a exodontia, todavia houve um rápido restabelecimento (Fig. 3).

Ao exame clínico intrabucal não foi constatada nenhuma alteração macroscópica na cavidade bucal e no sítio de extração dental em SAL, SAL/aPDT e ZOL/aPDT. Em ZOL observou-se pequena exposição óssea no sítio de extração em três ratas aos 28 dias pós-operatórios, enquanto que as demais exibiram características que se apresentaram similares aos outros grupos, todavia, a dimensão da loja cirúrgica se apresentou maior, reflexo de um nítido atraso no processo de reparo alveolar.

4.2 Análise histopatológica do processo de reparação tecidual pós-exodontia

Os grupos SAL, SAL/aPDT e ZOL/aPDT apresentaram um processo de reparação tecidual do sítio de extração dental e mucosa sobrejacente similares. No entanto, o grupo ZOL teve o processo de reparação tecidual severamente comprometido e condizente com um quadro de ONM-M (Fig. 4). Os parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos durante o processo de reparação pós-exodontia em SAL, SAL/aPDT, ZOL e ZOL/aPDT aos 28 dias pós-operatórios estão apresentados na Tabela 1.

4.3 Padrão de imunomarcção

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de BMP2/4, RUNX-2, OCN, OPG, RANKL e TRAP mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da

reação. As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom escura confinada ao núcleo (para RUNX-2) e ao citoplasma (para BMP2/4, OCN, OPG, RANKL e TRAP). A imunomarcacão para BMP2/4 estava presente nas adjacências do tecido ósseo neoformado e em osteoblastos, para RUNX-2 em pré-osteoblastos nas adjacências do tecido ósseo e para OCN em osteoblastos e na matriz extracelular. A imunomarcacão para OPG e RANKL estava predominantemente presente em osteoblastos, enquanto que TRAP se mostrou presente em osteoclastos mononucleados e, principalmente, em osteoclastos multinucleados.

4.3.1 BMP2/4 no tecido ósseo do sítio de extração dental

Em ZOL a quantidade de células BMP2/4-positivas se apresentou significativamente menor que em SAL, SAL/aPDT e ZOL/aPDT. Em ZOL/aPDT a quantidade de células BMP2/4-positivas se apresentou significativamente menor que em SAL e SAL/aPDT. Não houve diferença estatisticamente significativa entre SAL e SAL/aPDT (Fig. 5A, 5D, 5G, 5J e 5M).

4.3.2 RUNX-2 no tecido ósseo do sítio de extração dental

Em ZOL a quantidade de células RUNX2-positivas se apresentou significativamente maior que em SAL, SAL/aPDT e ZOL/aPDT. Não houve diferença estatisticamente significativa entre SAL, SAL/aPDT e ZOL/aPDT (Fig. 5B, 5E, 5H, 5K e 5N).

4.3.3 OCN no tecido ósseo do sítio de extração dental

Em ZOL a quantidade de células OCN-positivas se apresentou significativamente menor que em SAL, SAL/aPDT e ZOL/aPDT. SAL não diferiu estatisticamente de ZOL/aPDT. Em SAL/aPDT a quantidade de células OCN-positivas se mostrou significativamente maior que em SAL e ZOL/aPDT (Fig. 5C, 5F, 5I, 5L e 5O).

4.3.4 OPG no tecido ósseo do sítio de extração dental

Não houve diferença estatisticamente significativa entre ZOL e ZOL/aPDT e ambos os grupos apresentaram maior quantidade de células OPG-positivas, tanto em relação a SAL, quanto em relação a SAL/aPDT. SAL não diferiu estatisticamente de SAL/aPDT (Fig. 6A, 6D, 6G, 6J e 6M).

4.3.5 RANKL no tecido ósseo do sítio de extração dental

Não houve diferença estatisticamente significativa entre ZOL e ZOL/aPDT e ambos os grupos apresentaram menor quantidade de células RANKL-positivas, tanto em relação a SAL, quanto em relação a SAL/aPDT. SAL não diferiu estatisticamente de SAL/aPDT (Fig. 6B, 6E, 6H, 6K e 6N).

4.3.6 TRAP no tecido ósseo do sítio de extração dental

Não houve diferença estatisticamente significativa entre ZOL e ZOL/aPDT e ambos os grupos apresentaram menor quantidade de células multinucleadas TRAP-positivas, tanto em relação a SAL, quanto em relação a SAL/aPDT. SAL não diferiu estatisticamente de SAL/aPDT (Fig. 6C, 6F, 6I, 6L e 6O).

Discussão

5. Discussão

O zoledronato é empregado no tratamento de osteopatias com atividade osteolítica, controle de dor óssea, regulação de hipercalcemia e inibição da progressão de metástase em neoplasias malignas osteotrópicas. Por ser o bisfosfonato de maior potência relativa dentro desta classe de medicamentos, seu uso tem sido associado com a maioria dos casos de ONM-M. A etiopatogenia da doença ainda é pobremente compreendida, o que dificulta sua prevenção e tratamento. Um estudo preliminar desenvolvido por nosso grupo de pesquisa empregando ratas senis mostrou que o uso de dose oncológica de zoledronato compromete o processo de reparação tecidual após exodontia de dente com comprometimento periodontal e desencadeia a ONM-M. Um dos intuitos do presente estudo foi investigar neste modelo experimental como o zoledronato afeta o processo de reparação tecidual. Para tal propósito investigou-se as características histopatológicas do sítio de extração dental e adjacências, assim como, a osteoblastogênese e os principais reguladores da atividade dos osteoblastos, o recrutamento de osteoclastos e os principais reguladores da osteoclastogênese e atividade osteoclástica. Constatamos que o zoledronato exerceu efeito negativo tanto sobre a osteoblastogênese quanto sobre a osteoclastogênese, além de comprometer a atividade de osteoblastos e o recrutamento de osteoclastos no sítio de extração dental.

Uma vez que a única proposta preventiva para a ONM-M é a antibioticoterapia, a qual se mostra falha na profilaxia desta condição, o outro propósito deste estudo foi avaliar neste modelo experimental a efetividade da aPDT na prevenção desta doença, em especial, investigar sua ação em células da linhagem osteoblástica e da linhagem osteoclástica durante o reparo ósseo alveolar. Verificamos que a aPDT minimiza as consequências negativas do zoledronato tanto sobre os tecidos moles quanto sobre os tecidos duros do sítio de extração dental, via estimulação da capacidade de reparação tecidual, em especial sua ação osteogênica, o que a coloca como estratégia potencialmente capaz de evitar o desencadeamento da ONM-M.

Com relação à osteoblastogênese e os principais reguladores da atividade dos osteoblastos durante o processo de reparo alveolar, nosso estudo demonstrou

maior quantidade de células RUNX-2-positivas no sítio de extração dental no grupo ZOL aos 28 dias pós-exodontia, todavia, verificou-se menor quantidade de tecido ósseo neoformado, menor quantidade de células BMP2/4-positivas e células OCN-positivas. Tais achados, interpretados conjuntamente, mostram que o zoledronato compromete o processo de reparo do tecido ósseo alveolar. BMP2/4 é um dos principais fatores de crescimento que induzem a diferenciação de osteoblastos (SALAZAR et al., 2016), processo este comprometido pelo tratamento com zoledronato, o que está de acordo com Huang et al. (2016). RUNX-2 é um fator de transcrição que denota a diferenciação dos osteoblastos (VIMALRAJ et al., 2015). Em ZOL a quantidade de células RUNX-2-positivas se mostrou maior que nos demais grupos experimentais, no entanto, isto não pode ser interpretado como um efeito positivo do zoledronato sobre o tecido ósseo alveolar.

Estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (dados não mostrados) demonstrou que em ratas tratadas com veículo a quantidade de células RUNX-2 aumenta de forma gradativa aos 7 e 14 dias pós-exodontia e diminuiu bruscamente aos 28 dias pós-operatórios, tendo em vista que nesta fase do processo de reparo alveolar predominam os osteoblastos maduros. O tratamento com zoledronato altera essa dinâmica de expressão de RUNX-2, ou seja, aos 7, 14 e 28 dias pós-exodontia, a quantidade de células RUNX-2-positivas não sofre alteração quantitativa, se mostrando muito menor em relação ao grupo SAL aos 7 e 14 dias pós-operatórios, que é o período de diferenciação osteoblástica. Todavia, com a severa redução que ocorre no grupo tratado com o veículo aos 28 dias pós-exodontia, a quantidade destas células no grupo ZOL se mostra maior que em SAL. Tais dados estão de acordo com Huang et al. (2016), que reportam uma redução dose-dependente na expressão gênica de RUNX-2 em osteoblastos tratados com zoledronato. Além disso, a área de tecido ósseo neoformado e a quantidade de células BMP2/4 e células OCN-positivas foram menores em ZOL, indicando um severo comprometimento da neoformação óssea.

Huang et al. (2016) ainda reportaram que a expressão gênica 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, é drasticamente reduzida em osteoblastos tratados com zoledronato. Tais autores reportaram que em altas concentrações o zoledronato exerce um potente efeito citotóxico sobre os osteoblastos, e em baixas concentrações compromete o processo de diferenciação

destas células via redução do nível de BMP-2, o que corrobora com nossos achados. Efeitos negativos do zoledronato sobre os osteoblastos foram reportados por vários outros autores (ANALI-LEV et al., 2013; BASSO et al., 2013; NAIDU et al., 2008; ORRISS et al., 2009; POZZI et al., 2009), todavia, outros estudos relatam que o zoledronato exerce efeito positivo sobre os osteoblastos (FROMIGUÉ & BODY, 2002; KOCH et al., 2011; PAN et al., 2004; REINHOLZ et al., 2000). As diferenças tão contraditórias existentes entre a ação do zoledronato sobre os osteoblastos podem ser resultado da quantidade da droga a que tais células estão sendo expostas, ou seja, até determinada concentração os efeitos podem ser positivos, mas ultrapassado tal limite, e quanto maior a concentração, observa-se os efeitos negativos, incluindo a ação citotóxica.

Os efeitos negativos do zoledronato sobre a osteoblastogênese e sobre os osteoblastos são revertidos pela aPDT. Tal tratamento resultou em maior área de tecido ósseo neoformado, menor quantidade de células RUNX-2-positivas e maior imunomarcação, tanto para BMP2/4 quanto para OCN em ZOL/aPDT, quando comparado com ZOL, inclusive vários destes parâmetros se assemelharam ao grupo SAL. Tal efeito pode ser resultado da combinação da potente ação bioestimulatória associada a alta capacidade antimicrobiana desta terapia. Em estudos *in vitro*, Bayram et al. (2013) e Walter et al. (2015) reportaram que a irradiação com LLL, como a empregada na aPDT, exerceu efeito bioestimulatório sobre linhagens de osteoblastos tratados com zoledronato. Todavia, Basso et al. (2014), constataram que a irradiação com LLL apresentou um efeito limitado sobre osteoblastos tratados com zoledronato, exercendo efeito positivo sobre expressão gênica do colágeno tipo I, mas sem efeito bioestimulatório sobre viabilidade celular, produção de proteínas totais, atividade e expressão gênica de fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização. Em estudo *in vivo*, Mergoni et al. (2016), mostraram que a irradiação com LLL aumentou a expressão de OCN no sítio de extração dental de ratos tratados com zoledronato, o que corrobora com nossos achados.

Embora o presente estudo não tenha sido delineado de modo a permitir uma avaliação microbiológica apurada, vale a pena ressaltar que enquanto o grupo ZOL apresentou áreas de osso necrótico (sequestro ósseo) envoltas por colônias de bactérias, isso não foi constatado no grupo ZOL/aPDT, o que sugere uma ação antimicrobiana. Theodoro et al. (2015) reportaram que a aPDT se mostrou um tratamento efetivo para reduzir a carga microbiana de alvéolos dentais pós-extração

de molares com periodontite experimental. Tendo em vista que em amostras de ONM-M há uma alta prevalência de bactérias, especialmente do gênero *Actinomyces*, alguns autores têm correlacionado esta condição com este microrganismo (para revisão DE CEULAER et al., 2015). Fimple et al. (2008) demonstraram que a aPDT foi capaz de promover uma redução de mais de 80% nas unidades formadoras de colônias bacterianas, inclusive de *Actinomyces*. Os dados do presente estudo suportam que a aPDT teve uma ação antimicrobiana no sítio de extração dental de ratas tratadas com zoledronato, todavia, estudos microbiológicos são necessários para complementar e tornar tais achados mais consistentes.

No presente estudo fica claro que a associação da ação bioestimulatória e da capacidade antimicrobiana da aPDT melhorou sobremaneira o processo de reparo alveolar em ratas tratadas com zoledronato. O presente estudo é o primeiro a empregar a aPDT como estratégia terapêutica preventiva para a ONM-N. No entanto, esta modalidade de tratamento foi empregada com sucesso para promover a reparação tecidual de feridas de extração dental infectadas (LOPES-JÚNIOR, 2000). Além disso, a aPDT tem se mostrado uma terapia efetiva quando empregada como adjuvante à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite experimental, uma outra condição infecciosa/inflamatória (DE ALMEIDA et al., 2007; DE ALMEIDA et al., 2008b). Os efeitos positivos da 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 do diabetes (DE ALMEIDA et al., 2008a), da imunossupressão (FERNANDES et al., 2009), da ação da nicotina (GARCIA et al., 2011; GUALBERTO-JÚNIOR, 2013) ou da depleção de hormônios sexuais em fêmeas (GARCIA et al., 2013). Longo (2015) reportaram ainda que a aPDT empregada como monoterapia ou como terapia adjuvante à raspagem e alisamento radicular exerceu efeitos positivos sobre a reparação periodontal em ratos com periodontite experimental e submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil.

O zoledronato, como todo BP nitrogenado, altera o metabolismo ósseo atuando pela inibição da via do mevalonato nos osteoclastos (KIMMEL, 2007). A interrupção de tal via metabólica provoca alterações na dinâmica do citoesqueleto destas células, impossibilitando a formação da zona clara e da zona preguçada, 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 reabsortiva (COXON

et al., 2006; KIMMEL, 2007). Além disso, promove inibição da osteoclastogênese e indução de apoptose prematura em osteoclastos ativos (ABE et al., 2012). No presente estudo, mesmo tendo apenas o alvéolo dental em processo de reparação como o foco de atenção, os efeitos do zoledronato ficaram evidentes. Nos grupos tratados com zoledronato constatou-se menor quantidade de células TRAP-positivas em comparação com os grupos tratados com o veículo e, além disso, esta e a análise histopatológica revelaram ainda que os osteoclastos presentes mostravam característica de inatividade, ou seja, grandes células arredondadas, hipernucleadas, desprovidas de polarização e distantes da matriz óssea, como reportado por Kuroshima et al. (2007). A observação de tais características nos fez analisar ainda a quantidade de osteoclastos multinucleados acoplados à matriz óssea, um indício de atividade reabsortiva da célula. Em tal análise constatou-se uma quantidade extremamente reduzida de osteoclastos acoplados à matriz óssea nos grupos tratados com o zoledronato. Ambos os dados demonstram a efetividade da terapia anti-reabsortiva empregada neste estudo.

A osteoclastogênese e atividade osteoclástica têm como um dos principais mecanismos de regulação local o sistema RANK/RANKL/OPG. RANK é expresso em pré-osteoclastos e osteoclastos. Quando é ativado por RANKL, promove osteoclastogênese, estimula a atividade de osteoclastos ativos e inibe a apoptose de osteoclastos maduros. Todavia, todos estes eventos são inibidos quando OPG se liga à RANKL, impedindo sua interação com RANK (MARTIN & SIMS, 2015). Neste estudo, os grupos tratados com zoledronato apresentaram menor quantidade de células RANKL-positivas, o que corrobora com estudos anteriores (ÇANKAYA et al., 2013; NAKAGAWA et al., 2015; YANG et al., 2015). No presente estudo o zoledronato aumentou a quantidade de células OPG-positivas no sítio de extração dental, o que está de acordo com estudos prévios. Em tais estudos constatou-se significativo aumento no nível de OPG no sítio de extração dental (OHE et al., 2012; YANG et al., 2015). Çankaya et al. (2013) reportaram que o nível de OPG na mandíbula mostrou apenas uma tendência ao aumento após tratamento com zoledronato. Yang et al. (2015) reportaram que durante tratamento com zoledronato ocorre uma drástica redução na razão RANKL/OPG no sítio de extração dental, o que determina o severo bloqueio da reabsorção óssea. Supostamente tal balanço também tenha sido reduzido no presente estudo. Kim et al. (2016) mostraram severa redução tanto do nível sérico de TRAP 5b quanto da razão RANKL/OPG em um

modelo experimental de ONM-M, colocando-os como potenciais biomarcadores para o monitoramento do risco de desencadeamento da doença.

Nas ratas tratadas com zoledronato, a aPDT não promoveu nenhuma modificação na quantidade de células OPG-positivas, RANKL-positivas e TRAP-positivas no sítio de extração dental, ou seja, o tratamento local em nada influenciou o tratamento sistêmico com zoledronato, o que indica que a potente ação anti-reabsortiva da droga permaneceu inalterada. A supressão da reabsorção óssea é tida como um dos supostos fatores etiopatogênicos da ONM-M, no entanto, nosso estudo mostrou que o efeito antimicrobiano e a capacidade bioestimulatória da aPDT sobre os tecidos moles e tecidos duros do sítio de extração dental permitiram que ocorresse a reparação da ferida cirúrgica, sem que a supressão da atividade osteoclástica fosse capaz de, por si só, desencadear a ONM-M. Tais achados nos permitem inferir que o emprego da aPDT pós-exodontia tem uma ação positiva sobre o processo de reparação tecidual e evita o desencadeamento da ONM-M, inclusive em situações onde outras terapias anti-reabsortivas são empregadas, como é o caso do inibidor de RANKL (Denosumab), cujo uso também está relacionado com as mesmas taxas de desencadeamento de ONM-M (DE OLIVEIRA et al., 2016).

Conclusão

6. Conclusão

Dentro dos limites do presente estudo, conclui-se que a aPDT estimula a osteoblastogênese e atividade dos osteoblastos, se mostrando uma terapia preventiva segura e efetiva para restabelecer a capacidade de reparação tecidual do sítio de extração dental em ratas com os principais fatores de risco para a ONM-M, a qual é substancialmente comprometida pelo tratamento com dose oncológica de zoledronato. Além disso, a ação do zoledronato sobre as células da linhagem osteoclástica permanece inalterada com o emprego da aPDT.

Figuras e

Tabelas

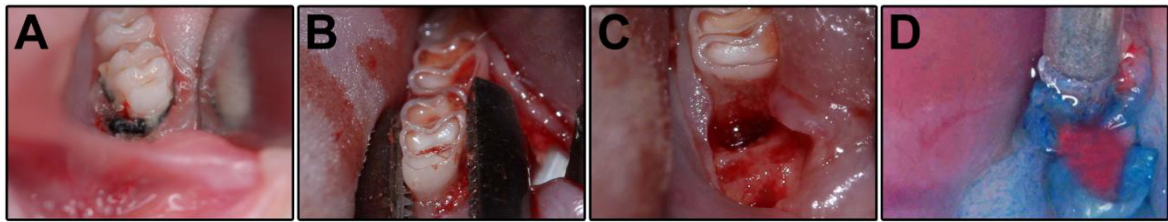


Figura 1 - Fotografias evidenciando o aspecto clínico do primeiro molar inferior esquerdo três semanas após a instalação da ligadura e sua manutenção em posição periodontal (A), as manobras operatórias para a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo (B), o alvéolo dental pós-exodontia (C), assim como uma sessão de aPDT realizada 2 dias após a exodontia do elemento dental (D).

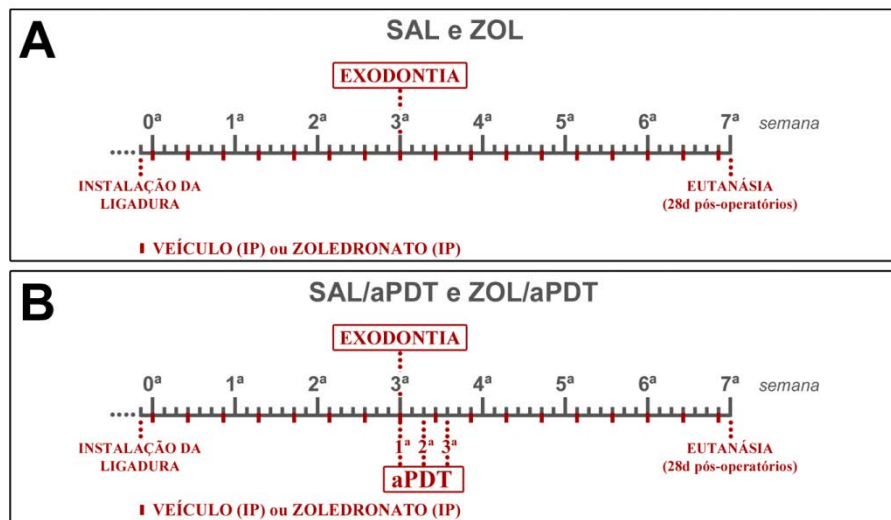


Figura 2 - Fluxograma evidenciando o delineamento experimental do estudo nos grupos SAL e ZOL (A) e SAL/aPDT e ZOL/aPDT (B).

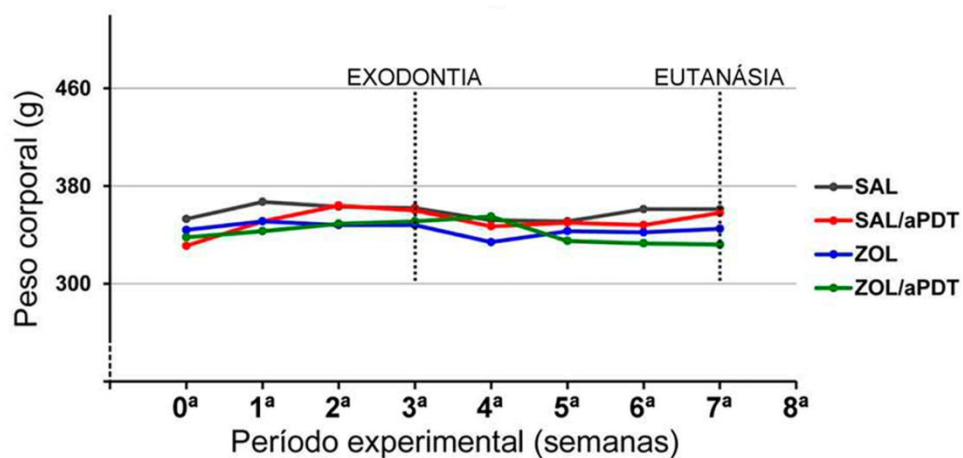


Figura 3 - Gráfico apresentando a evolução do peso corporal das ratas ao longo do período experimental nos grupos SAL (traçado cinza), SAL/aPDT (traçado vermelho), ZOL (traçado azul) e ZOL/aPDT (traçado verde).

Tabela 1 - Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos durante o processo de reparação pós-extração dental em SAL, SAL/aPDT, ZOL e ZOL/aPDT aos 28 dias pós-operatórios.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA				
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES			
	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	SAL	SAL/aPDT	ZOL	ZOL/aPDT
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL				
(0) ausência de inflamação	100%	100%	-	71%
(1) pequena quantidade de células inflamatórias	-	-	-	29%
(2) moderada quantidade de células inflamatórias	-	-	43%	-
(3) grande quantidade de células inflamatórias	-	-	57%	-
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO				
(0) ausência de inflamação	100%	100%	-	71%
(1) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo	-	-	-	29%
(2) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo, sem atingir o tecido ósseo	-	-	29%	-
(3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo	-	-	71%	-
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO EPITELIAL				
(0) tecido epitelial de moderada espessura recobrimdo completamente o sítio de extração	57%	75%	-	29%
(1) tecido epitelial de delgada espessura recobrimdo completamente o sítio de extração	43%	25%	-	71%
(2) delgada camada de tecido epitelial apenas nas margens da ferida cirúrgica aberta	-	-	57%	-
(3) ausência de tecido epitelial sobre a ferida cirúrgica aberta	-	-	43%	-
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO				
(0) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas	57%	75%	-	43%
(1) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	43%	25%	-	57%
(2) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	29%	-
(3) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose tecidual	-	-	71%	-
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO				
(0) ausência de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo mais da metade do alvéolo dental	100%	100%	-	71%
(1) ausência de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo menos da metade do alvéolo dental	-	-	-	29%
(2) presença de poucas áreas de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo menos de um terço do alvéolo dental	-	-	29%	-
(3) presença de muitas áreas de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo menos de um terço do alvéolo dental	-	-	71%	-
PADRÃO DE CONTAMINAÇÃO DO SÍTIO DE EXTRAÇÃO DENTAL				
(0) presença de bactérias difusamente distribuídas no sítio de extração, condizente com um quadro de normalidade	100%	100%	-	86%
(1) presença de grandes colônias de bactérias nos tecidos moles sobrejacentes ao alvéolo dental	-	-	-	14%
(2) presença de grandes colônias de bactérias na superfície do osso alveolar no interior do alvéolo dental	-	-	-	-
(3) presença de grandes colônias de bactérias envolvendo osso necrosado e/ou no interior de espaços medulares no interior e adjacências do alvéolo dental	-	-	100%	-

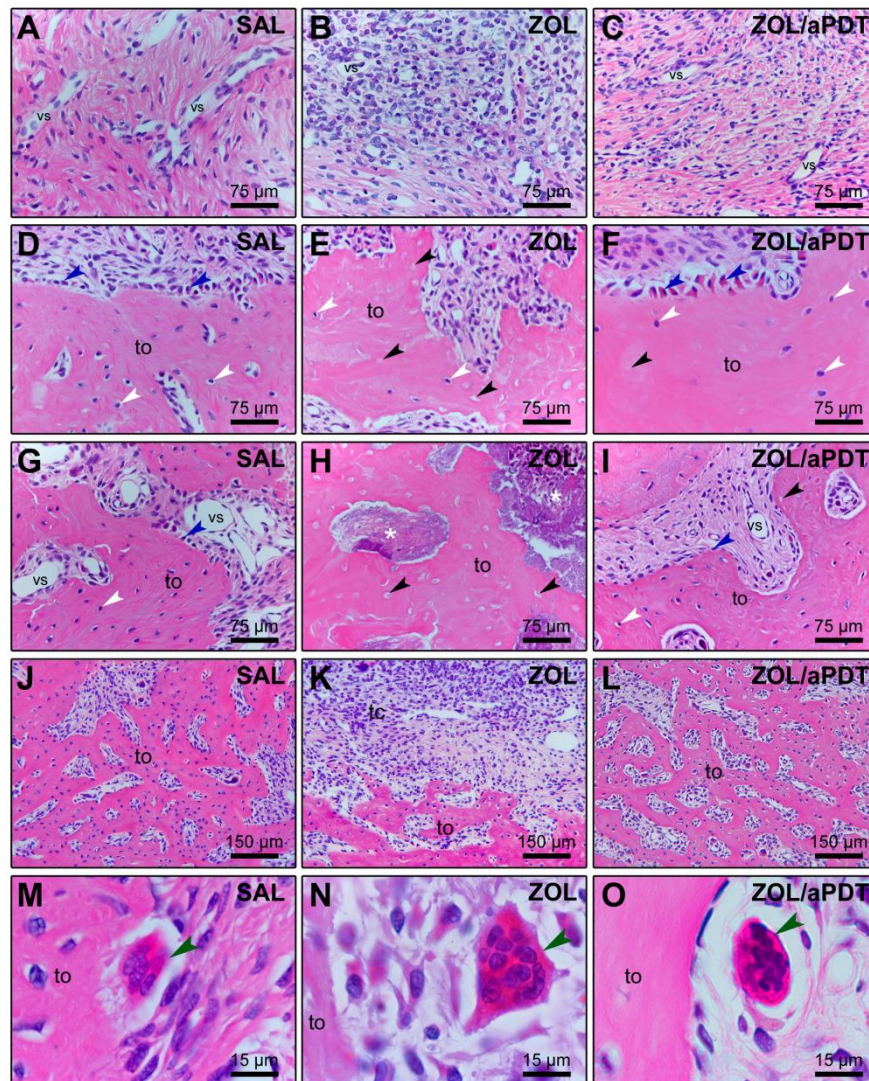


Figura 4 - Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido conjuntivo e tecido ósseo no sítio de extração dental e adjacências nos grupos SAL (A, D, G, J, M), ZOL (B, E, H, K, N) e ZOL/aPDT (C, F, I, L, O). Em ZOL observar: persistência de inflamação no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental (B); presença frequente de área ocupada por osso não vital (E); grandes sequestros ósseos nas adjacências do sítio de extração (H); pequena quantidade de tecido ósseo neoformado no alvéolo dental (K) e; presença de osteoclastos arredondados, hipernucleados e sem relação com a matriz óssea (N). Em SAL e ZOL/aPDT as características histológicas se mostraram similares: ausência de inflamação no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental (A, C); ausência de grandes áreas de osso não vital (D, F, G, I); presença de pequena quantidade de lacunas vazias (F, I); nenhum sequestro ósseo nas adjacências do sítio de extração e; alvéolos dentais preenchidos por tecido ósseo (J, L). Em SAL os osteoclastos se apresentaram grandes, multinucleados e associados ao tecido ósseo (M), indício de atividade celular, ao passo que em ZOL/aPDT os osteoclastos se mostraram com o mesmo aspecto morfológico observado em ZOL (O). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo; vs, vasos sanguíneos; setas brancas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias; setas azuis, osteoblastos; setas verdes, osteoclastos. Coloração: *HE*. Aumento original: 400x (A-I); 200x (J-L); 2000x (M-O). Barras de escala: 75 µm (A-I); 150 µm (J-L); 15 µm (M-O).

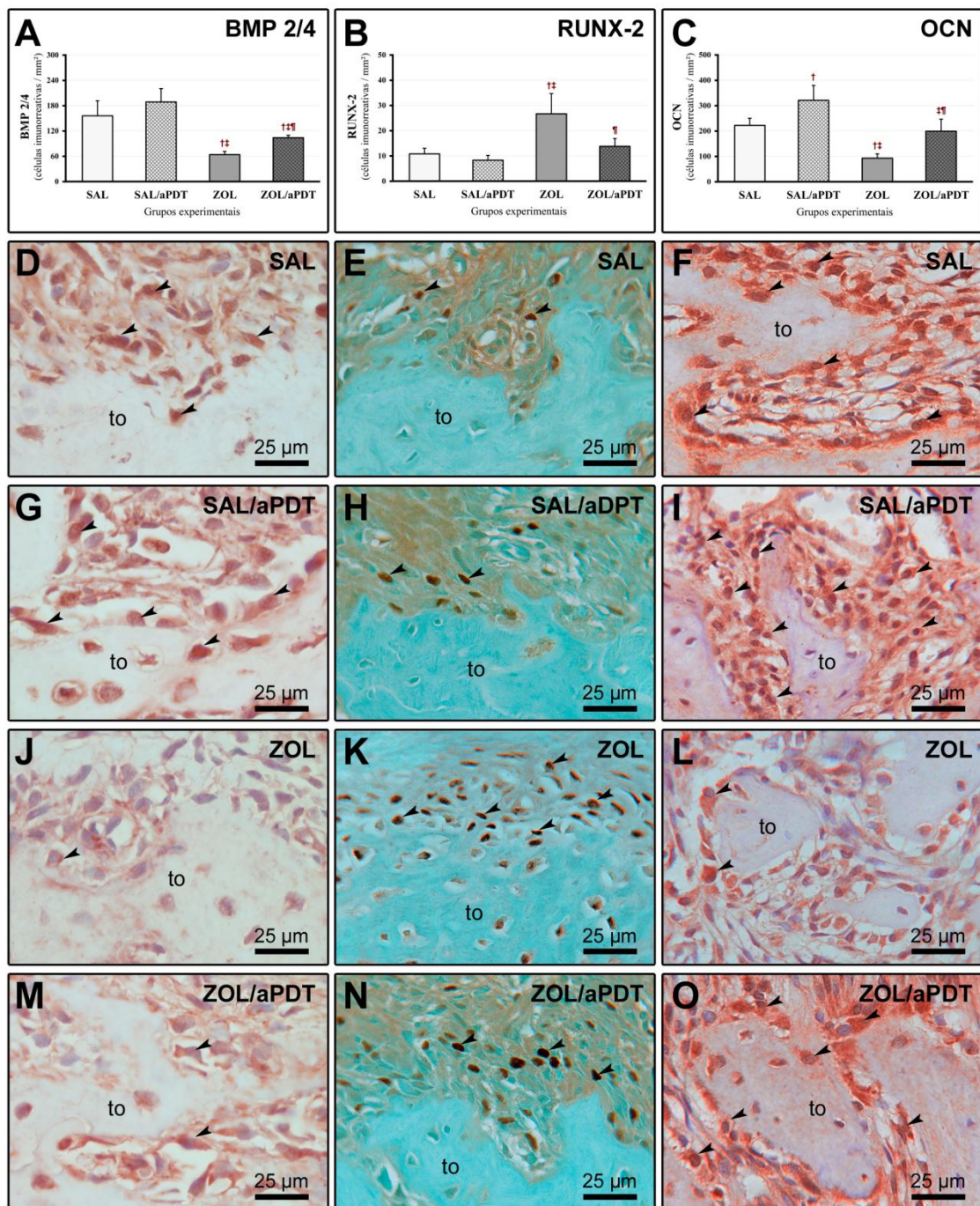


Figura 5 - Imunomarcção para BMP2/4, RUNX-2 e OCN no tecido ósseo do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. Gráficos apresentando a quantidade de células BMP2/4-positivas (A), células RUNX-2-positivas (B) e células OCN-positivas (C) no tecido ósseo do sítio de extração dental nos diferentes grupos. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para BMP2/4 (D, G, J, M), RUNX-2 (E, H, K, N) e OCN (F, I, L, O) em SAL (D-F), SAL/aPDT (G-I), ZOL (J-L) e ZOL/aPDT (M-O). Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação a SAL; ††, diferença estatisticamente significativa em relação a SAL/aPDT; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris* (D, F, G, I, J, L, M, O); *Fast green* (E, H, K, N). Barras de escala: 25 µm (D-O).

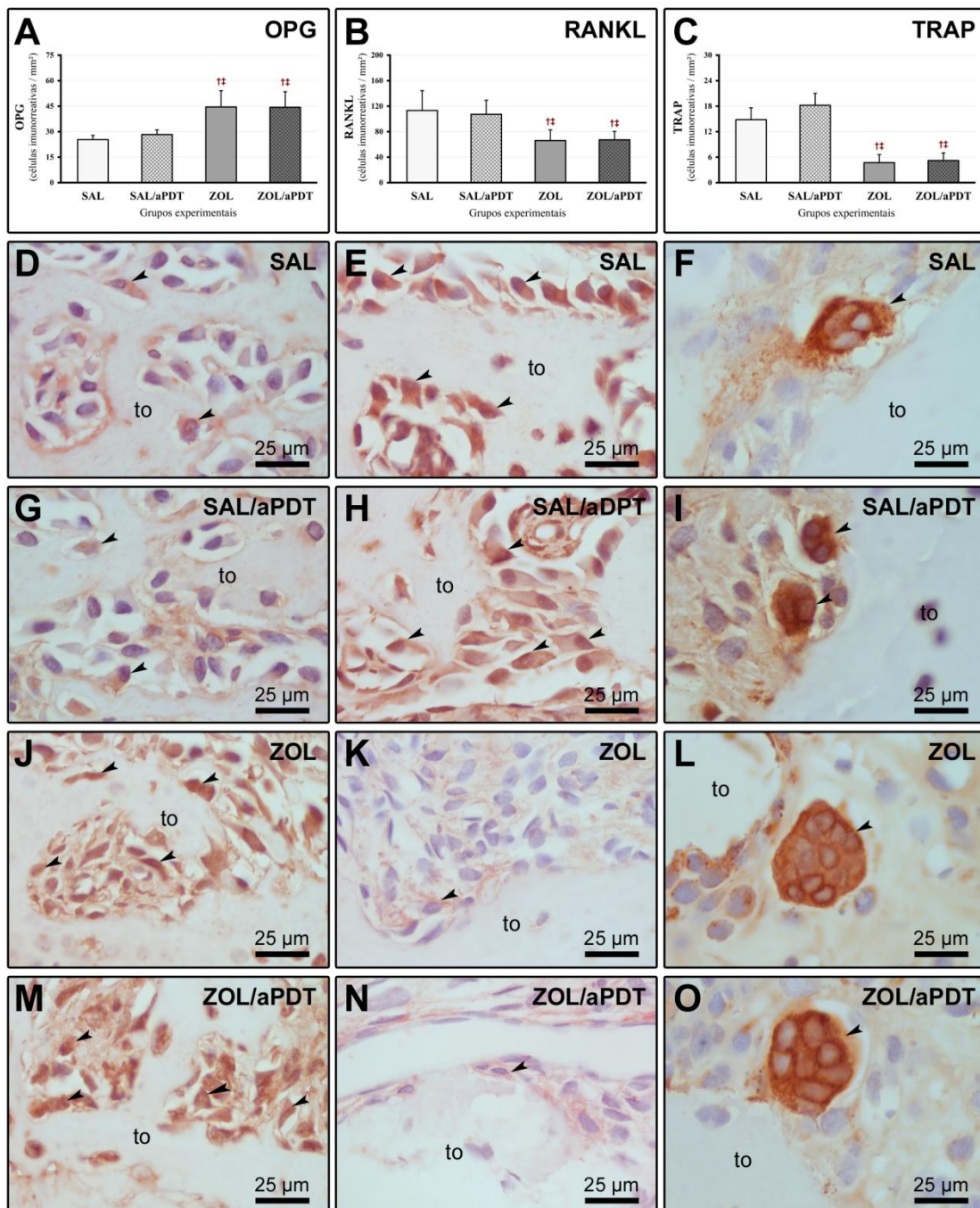


Figura 6 - Imunomarcção para OPG, RANKL e TRAP no tecido ósseo do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios. Gráficos apresentando a quantidade de células OPG-positivas (A), células RANKL-positivas (B) e células TRAP-positivas (C) no tecido ósseo do sítio do sítio de extração dental nos diferentes grupos. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OPG (D, G, J, M), RANKL (E, H, K, N) e TRAP (F, I, L, O) em SAL (D-F), SAL/aPDT (G-I), ZOL (J-L) e ZOL/aPDT (M-O). Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação a SAL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação a SAL/aPDT; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris* (D-O). Barras de escala: 25 µm (D-O).

Referências

REFERÊNCIAS

- ABE, K.; YOSHIMURA, Y.; DEYAMA, Y.; KIKUIRI, T.; HASEGAWA, T.; TEI, K.; SHINODA, H.; SUZUKI, K.; KITAGAWA, Y. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. **Int J Mol Med.**, v.29, n.6, p.1007-1015. 2012.
- AGUIRRE, J. I.; AKHTER, M. P.; KIMMEL, D. B.; PINGEL, J. E.; WILLIAMS, A.; JORGENSEN, M.; KESAVALU, L.; WRONSKI, T. J. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. **J Bone Miner Res.**, v.27, n.10, p.2130-43. 2012.
- ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N. A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers Med Sci.**, v.27, n.1, p.237-249. 2011.
- 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(5 Suppl), p.61-70. 2009.
- ANAVI-LEV, K.; ANAVI, Y.; CHAUSHU, G.; ALON, D. M.; GAL, G.; KAPLAN, I. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws: clinic-pathological investigation and histomorphometric analysis. **Oral and Maxillofacial Pathology**, v.115, n.5, p.660-666. 2013.
- 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, n.5, 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.
- BASSO, F. G.; SILVEIRA TURRIONI, A. P.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. **Gerontology**, v.59, p.534-541. 2013.
- BASSO, F. G.; TURRIONI, A. P.; SOARES, D. G.; BAGNATO, V. S.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. Low-level laser therapy for osteonecrotic lesions: effects on osteoblasts treated with zoledronic acid. **Support Care Cancer**, v.22, n.10, p.2741-8. 2014.
- BAYRAM, H.; KENAR, H.; TAŞAR, F.; HASIRCI, V. Effect of low level laser therapy and zoledronate on the viability and ALP activity of Saos-2 cells. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v.42, n.1, p.140-6. 2013.
- BRAUN, A.; DEHN, C.; KRAUSE, F.; JEPSEN, S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **J Clin Periodontol.**, v.35, n.10, p.877-884. 2008.

ÇANKAYA, M.; CIZMECI ŞENEL, F.; KADIOGLU DUMAN, M.; MUCI, E.; DAYISOYLU, E. H.; BALABAN, F. The effects of chronic zoledronate usage on the jaw and long bones evaluated using RANKL and osteoprotegerin levels in an animal model. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v.42, n.9, p.1134-9. 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, n.1, p.80-84. 2003.

COXON, F. P.; THOMPSON, K. ROGERS, M. J. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates - Review. **Curr Opin Pharmacol.**, v.6, n.3, p.307-12. 2006.

DARRAS-VERCAMBRE, S.; CARPENTIER, O.; VINCENT, P.; BONNEVALLE, A.; THOMAS, P. Photodynamic action of red light for treatment of erythrasma: preliminary results. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v.22, n.3, p.153-156. 2006.

DE ALMEIDA, J. M.; THEODORO, L. H.; BOSCO, A. F.; NAGATA, M. J.; BONFANTE, S.; GARCIA, V. G. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. **J Periodontol.**, v.79, n.11, p.2156-65. 2008a.

DE ALMEIDA, J. M.; THEODORO, L. H.; BOSCO, A. F.; NAGATA, M. J.; OSHIIWA, M.; GARCIA, V. G. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. **J Periodontol.**, v.79, n.6, p.1081-8, 2008b.

DE ALMEIDA, J. M.; THEODORO, L. H.; BOSCO, A. F.; NAGATA, M. J.; OSHIIWA, M.; GARCIA, V. G. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontol.**, v.78, n.3, p.566-75. 2007.

DE CEULAER, J. TACCONELLI, E. VANDECASTEELE, S. J. Actinomyces osteomyelitis in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): the missing link? **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v.33, n.11, p.1873-80. 2014.

DE OLIVEIRA, C. C.; BRIZENO, L. A.; DE SOUSA, F. B.; MOTA, M. R.; ALVES, A. P. Osteonecrosis of the jaw induced by receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (Denosumab) – Review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, vol.21, n.4, p.e431-9. 2016.

DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin Proc.**, v.83, n.9, p.1032-1045. 2008.

EBERTINO, F. H.; HOGAN, A. M.; SUN, S.; TSOUNPRA, M. K.; DUAN, X.; TRIFFITT, J. T.; KWAASI, A. A.; DUNFORD, J. E.; BARNETT, B. L.; OPPERMAN, U.; LUNDY, M. W.; BOYDE, A.; KASHEMIROV, B. A.; MCKENNA, C. E.; RUSSELL, R. G. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. **Bone**, v.49, n.1, p.20-33. 2011.

FERNANDES, L. A.; DE ALMEIDA, J. M.; THEODORO, L. H.; BOSCO, A. F.; NAGATA, M. J.; MARTINS, T. M.; OKAMOTO, T.; GARCIA, V. G. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. **J Clin Periodontol.**, v.36, n.3, p.219-28. 2009.

FIMPLE, J. L.; FONTANA, C. R.; FOSCHI, F.; RUGGIERO, K.; SONG, X.; PAGONIS, T. C.; TANNER, A. C.; KENT, R.; DOUKAS, A. G.; STASHENKO, P. P.; SOUKOS, N. S. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. **J Endod.**, v.35, n.6, p.728-34. 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Dose Calculator: Conversion Chemotherapy of Human to Animals. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

FROMIGUÉ, O.; BODY, J. J. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. **J Endocrinol Invest.**, v.25, p.539-546. 2002.

GARCIA, V. G.; FERNANDES, L. A.; MACARINI, V. C.; DE ALMEIDA, J. M.; MARTINS, T. M.; BOSCO, A. F.; NAGATA, M. J.; CIRELLI, J. A.; THEODORO, L. H. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. **J Clin Periodontol.**, v.38, n.12, p.1106-14. 2011.

GARCIA, V. G.; GUALBERTO JÚNIOR, E. C.; FERNANDES, L. A.; BOSCO, A. F.; HITOMI NAGATA, M. J.; CASATTI, C. A.; ERVOLINO, E.; THEODORO, L. H. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. **J Periodontol.**, v.84, n.4, p.556-65. 2013.

GARCIA, V. G.; LONGO, M.; GUALBERTO JÚNIOR, E. C.; BOSCO, A. F.; NAGATA, M. J. H.; ERVOLINO, E.; THEODORO, L. H. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. **J Periodontal Res.**, v.49, p.584–594. 2014.

GOMEZ FONT, R.; MARTINEZ, G. M. L.; OLMOS, M. J. M. Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments. Update. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.13, n.5, p.E318-324. 2008.

GUALBERTO-JÚNIOR, E. C. **Efeitos do laser e da terapia fotodinâmica no tratamento periodontal mecânico em ratas ovariectomizadas e sob influências sistêmicas de nicotina: Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico.** 2013. 103f. Tese (Doutorado em Odontologia, Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

GUZZARDELLA, G. A.; FINI, M.; TORRICELLI, P.; GIAVARESI, G.; GIARDINO, R. Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. **Lasers Med Sci.**, v.17, n.3, p.216-220. 2002.

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. **JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.**, v.139, n.11, p.1135-1142. 2013.

HOEFERT, S.; EUFINGER, H. Relevance of a prolonged preoperative antibiotic regime in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.69, n.2, p.362-380. 2011.

HUANG, X.; HUANG, S.; GUO, F.; XU, F.; CHENG, P.; YE, Y.; DONG, Y.; XIANG, W.; CHEN, A. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. **Mol Med Rep.**, v.13, n.1, p.613-22. 2016.

KANG, B.; CHEONG, S.; CHAICHANASAKUL, T.; BEZOUGLAIA, O.; ATTI, E.; DRY, S. M.; PIRIH, F. Q.; AGHALOO, T. L.; TETRADIS, S. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. **J Bone Miner Res.**, v.28, p.1631-40. 2013.

KHARKWAL, G. B.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y. Y.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. **Lasers Surg Med.**, v.43, n.7, p.755-767. 2011.

KIM, J. W.; CHA, I. H.; KIM, S. J.; KIM, M. R. Biomarkers for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. **Clin Implant Dent Relat Res.**, v.18, n.2, p.281-91. 2016.

KIMMEL, D. B. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates - Review. **J Dent Res.**, v.86, n.11, p.1022-33. 2007.

KOCH, F. P.; MERKEL, C.; AL-NAWAS, B.; SMEETS, R.; ZIEBART, T.; WALTER, C.; WAGNER, W. Zoledronate, ibandronate and clodronate enhance osteoblast differentiation in a dose dependent manner - a quantitative in vitro gene expression analysis of Dlx5, Runx2, OCN, MSX1 and MSX2. **J Craniomaxillofac Surg.**, v.39, p.562-569. 2011.

KUNIN, C. M.; JOHANSEN, K. S.; WORNING, A. M.; DASCHNER, F. D. Report of a symposium on use and abuse of antibiotics worldwide. **Ver Infect Dis.**, v.12, n.1, p.12-19. 1990.

KUROSHIMA, S.; GO, V. A.; YAMASHITA, J. Increased numbers of nonattached osteoclasts after long-term zoledronic acid therapy in mice. **Endocrinology.** V.153, n.1, p.17-28. 2012.

LAM, D. K.; SANDOR, G. K.; HOLMES, H. I.; EVANS, A.W.; CLOKIE, C. M. A review of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws and its management. **J Can Dent Assoc.**, v.73, n.5, p.417-422. 2007.

LITTLE, J. W.; FALACE, D. A.; MILLER, C. S.; RHODUS, N. L. Antibiotic prophylaxis in dentistry: an update. **Gen Dent.**, v.56, n.1, p.20-28. 2008.

LONGO, M. **Avaliação de diferentes protocolos de aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento da periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e microbiológico.** 2015. 178f. Tese (Doutorado em Odontologia, Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

LOPES-JÚNIOR, W. **Reparação em feridas de extração dental, infectadas, tratadas com droga fotossensibilizadora, associada ou não ao laser de baixa intensidade: Estudo histológico em ratos.** 2000. 142f. Dissertação (Mestrado em

Odontologia, Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2000.

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, n.10, p.2488-2493. 2011.

LUI, J.; CORBET, E. F.; JIN, L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. **J Periodontal Res.**, v.46, n.1, p.89-96. 2011.

MARTIN, T. J.; SIMS, N. A. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. **Rev Endocr Metab Disord.**, v.16, n.2, p.131-9. 2015.

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.61, n.9, p.115-7. 2003.

MAWARDI, H.; TREISTER, N.; RICHARDSON, P.; ANDERSON, K.; MUNSHI, N.; FAIELLA, R. A.; WOO, S. B. Sinus tracts--an early sign of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws? **J Oral Maxillofac Surg.**, v.67, n.3, p.593-601. 2009.

MERGONI, G.; VESCOVI, P.; SALA, R.; MERIGO, E.; PASSERINI, P.; MAESTRI, R.; CORRADI, D.; GOVONI, P.; NAMMOUR, S.; BIANCHI, M. G. The effect of laser therapy on the expression of osteocalcin and osteopontin after tooth extraction in rats treated with zoledronate and dexamethasone. **Support Care Cancer.**, v.24, n.2, p.807-13. 2016.

MIGLIORATI, C. A. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. **J. Clin Oncol.**, v.21, n.22, p.4253-4. 2003.

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.

NAIDU, A.; DECHOW, P. C.; SPEARS, R.; WRIGHT, J. M.; KESSLER, H. P.; OPPERMAN, L. A. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.106, p.5-13. 2008.

NAKAGAWA, T.; OHTA, K.; KUBOZONO, K.; ISHIDA, Y.; NARUSE, T.; TAKECHI, M.; KAMATA, N. Zoledronate inhibits receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand-induced osteoclast differentiation via suppression of expression of nuclear factor of activated T-cell c1 and carbonic anhydrase 2. **Arch Oral Biol.**, v.60, n.4, p.557-65. 2015.

OHE, J. Y.; KWON, Y. D.; LEE, H. W. Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived osteoblasts. **Clin Oral Investig.**, v.16, v.4, p.1153-9. 2012.

ORRISS, I. R.; KEY, M. L.; COLSTON, K. W.; ARNETT, T. R. Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. **J Cell Biochem.**, v.106, p.109-118. 2009.

ORY, S.; BRAZIER, H.; PAWLAK, G.; BLANGY, A. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. **Eur J Cell Biol.**, v.87, n.8-9, 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. **J Med Case Rep.**, v.23, n.5, p.477. 2011.

OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA, G.; ABIKO, Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. **Bone**, v.22, n.4, p.347-354. 1998.

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, n.1, p.79-88. 1993.

PAN, B.; TO, L. B.; FARRUGIA, A. N.; FINDLAY, D. M.; GREEN, J.; GRONTHOS, S.; EVDOKIOU, A.; LYNCH, K.; ATKINS, G. J.; ZANNETTINO, A. C. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro. **Bone**, v.34, p.112-123. 2004.

POZZI, S.; VALLET, S.; MUKHERJEE, S.; CIRSTEAN, D.; VAGHELA, N.; SANTO, L.; ROSEN, E.; IKEDA, H.; OKAWA, Y.; KIZILTEPE, T.; SCHOONMAKER, J.; XIE, W.; HIDESHIMA, T.; WELLER, E.; BOUXSEIN, M. L.; MUNSHI, N. C.; ANDERSON, K. C.; RAJE, N. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. **Clin Cancer Res.**, v.15, p.5829-5839. 2009.

REINHOLZ, G. G.; GETZ, B.; PEDERSON, L.; SANDERS, E. S.; SUBRAMANIAM, M.; INGLE, J. N.; SPELSBERG, T. C. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. **Cancer Res.**, v.60, p.6001-6007. 2000.

ROGERS, M. J.; CROCKETT, J. C.; COXON, F. P.; MONKKONEN, J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, v.49, n.1, p.34-41. 2011.

RUGGIERO, S. L.; DODSON, T. B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws - 2014 Update. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.72, n.12, p.2381-2. 2014.

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 - 2009 update. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.67, n.5, p.2-12. 2009.

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

SALAZAR, V. S.; GAMER, L. W.; ROSEN, V. BMP signaling in skeletal development, disease and repair. **Nat Rev Endocrinol.**, v.12, n.4, p.203-21. 2016.

SCHINDL, A.; MERWALD, H.; SCHINDL, L.; KAUN, C.; WOJTA, J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **Br J Dermatol.**, v.148, n.2, p.334-336. 2003.

SHANNON, J.; MODELEVSKY, S.; GRIPPO, A. A. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. **J Am Geriatr Soc.**, v.59, p.2350-2355. 2011.

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.

SILVA, P. G.; FERREIRA JUNIOR, A. E.; TEÓFILO, C. R.; BARBOSA, M. C.; LIMA JÚNIOR, R. C.; SOUSA, F. B.; MOTA, M. R.; RIBEIRO, R. A.; ALVES, A. P. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate related osteonecrosis. **Arch Oral Biol.**, v.60, n.9, p.1237-45. 2015.

TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v.17, n.6, p.388-391. 1988.

THEODORO, L. H.; PIRES, J. R.; FERNANDES, L. A.; GUALBERTO JÚNIOR, E. C.; LONGO, M.; DE ALMEIDA, J. M.; GARCIA, V. G. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontally infected tooth sockets in rats. **Lasers Med Sci.**, v.30, n.3, p.677-83. 2015.

VIMALRAJ, S.; ARUMUGAM, B.; MIRANDA, P. J.; SELVAMURUGAN, N. Runx-2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. **Int J Biol Macromol.**, v.78, p.202-8. 2015.

WALTER, C.; PABST, A. M.; ZIEBART, T. Effects of a low-level diode laser on oral keratinocytes, oral fibroblasts, endothelial cells and osteoblasts incubated with bisphosphonates: An in vitro study. **Biomed Rep.**, v.3, n.1, p.14-18. 2015.

WANG, J.; GOODGER, N. M.; POGREL, M. A. Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.61, p.1104-110. 2003.

WEITZMAN, R.; SAUTER, N.; ERIKSEN, E. F.; TARASSOFF, P. G.; LACERNA, L. V.; DIAS, R.; ALTMAYER, A.; CSERMAK-RENNER, K.; MCGRATH, L.; LANTWICKI, L.; HOHNEKER, J. A. Critical review: updated recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in cancer patients - May 2006. **Crit Ver Oncol Hematol.**, v.62, n.2. p.148-152. 2007.

YAMASHITA, J.; KOI, K.; YANG, D. Y.; MCCAULEY, L.K. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. **Clin Cancer Res.**, v.17, n.6, p.1405-1414. 2010.

YANG, H.; PAN, H.; YU, F.; CHEN, K.; SHANG, G.; XU, Y. A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats. **Int J Clin Exp Pathol.**, v.8, n.5, p.5161-7. 2015.

Anexos

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

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”	
CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA		
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals		
CERTIFICADO		
Certificamos que o Projeto “Efeito do zoledronato sobre o processo de reparo alveolar em ratos: estudo envolvendo os principais fatores de risco para o desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares e avaliação de diferentes terapias preventivas” sob responsabilidade do Pesquisador EDILSON ERVOLINO e colaboração de Cristian Statkiewicz, Valdir Gouveia Garcia, Cláudio Aparecido Casatti, Leticia Helena Theodoro, Juliano Milanezi de Almeida, Maria José Hitomi Nagata, João Paulo Mardegan Issa, Rita Cássia Menegatti Dorneles, Luan Felipe Toro, Thamires Priscila Cavazana, João Martins de Mello Neto, Leticia Chaves Ferreira, Fernanda Furuse Ventura dos Santos e João Vicente Feres-Rodrigues está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-00581-2013.		
CERTIFICATE		
We certify that the research “Effect of zoledronate during the alveolar healing process in rats: study involving the major risk factors for developing osteonecrosis of the jaws and evaluation of different preventive therapies”, process number FOA-00581-2013, under responsibility of EDILSON ERVOLINO and with collaboration of Cristian Statkiewicz, Valdir Gouveia Garcia, Cláudio Aparecido Casatti, Leticia Helena Theodoro, Juliano Milanezi de Almeida, Maria José Hitomi Nagata, João Paulo Mardegan Issa, Rita Cássia Menegatti Dorneles, Luan Felipe Toro, Thamires Priscila Cavazana, João Martins de Mello Neto, Leticia Chaves Ferreira, Fernanda Furuse Ventura dos Santos and João Vicente Feres-Rodrigues agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.		
 Profa. Dra. Mary Marcondes Vice-Coordenadora da CEUA CEUA Vice-Coordinator		
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Odontologia de Araçatuba Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br		