

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO E EFICÁCIA
DA FOTOBIMODULAÇÃO NO TRATAMENTO DA
OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA
POR BIFOSFONATOS EM MODELO MURINO**

JANNERSON CESAR XAVIER DE PONTES

SAPIENTIA AEDIFICAT

2022

JANNERSON CESAR XAVIER DE PONTES

**AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO E EFICÁCIA DA
FOTOBIMODULAÇÃO NO TRATAMENTO DA OSTEONECROSE
DOS MAXILARES INDUZIDA POR BIFOSFONATOS EM MODELO
MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Francisco Alves

Coorientadora: Prof. Dra. Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida

João Pessoa

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P813a Pontes, Jannerson Cesar Xavier de.

Avaliação da imunomodulação e eficácia da
fotobiomodulação no tratamento da osteonecrose dos
maxilares induzida por bifosfonatos em modelo murino /
Jannerson Cesar Xavier de Pontes. - João Pessoa, 2022.
65 f. : il.

Orientação: Adriano Francisco Alves.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Odontologia. 2. Osteonecrose. 3. Bifosfonatos. 4.
NF-kappaB. I. Alves, Adriano Francisco. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.314((043)



**ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
2022**

Aos treze dias do mês de maio do ano de 2022, às 14:00 horas, no auditório do Programa de Pós Graduação em Odontologia, reuniram-se os membros da banca examinadora composta pelas professores doutores: ADRIANO FRANCISCO ALVES (Orientador e Presidente), RICARDO DIAS DE CASTRO (membro interno ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) e LUCIENE SIMOES DE ASSIS TAFURI (membro externo ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) a fim de arguirem o mestrando JANNERSON CESAR XAVIER DE PONTES, com relação ao seu trabalho final de curso de mestrado (dissertação), sob o título "Avaliação da imunomodulação e eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da osteonecrose dos maxilares induzida por bifosfonatos em modelo murino". Aberta a sessão pelo presidente da mesma, coube o candidato, na forma regimental, expor o tema de sua dissertação, dentro do tempo regulamentar. Em seguida, foi questionado pelos membros da banca examinadora, sendo as explicações necessárias fornecidas e as modificações solicitadas registradas. Logo após, os membros da banca examinadora reuniram-se em sessão secreta, tendo chegado ao seguinte julgamento, que, de público, foi anunciado: 1º Examinador (membro externo): Conceito "Aprovado"; 2º Examinador (membro vinculado ao PPGO): Conceito "Aprovado, 3º Examinador (Orientadora e presidente): Conceito "Aprovado". O que resultou em conceito final igual: "APROVADO", o que permite o candidato fazer jus ao título de Mestre em Odontologia. Os documentos utilizados para avaliação do candidato durante o processo aqui descrito apresentam-se como prova documental do mesmo e, como tal, serão anexadas a esta ata para arquivamento. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo presidente, pelos demais membros da banca e pela candidata.

Luciene L. de Assis Tafari

1º Examinador – Membro Externo

Ricardo Dias de Castro

2º Examinador – Membro do PPGO

Adriano Francisco Alves

3º Examinador – Presidente

Jannerison Cesar Xavier de Pontes

Candidato

Em memória às vítimas da COVID-19 no mundo.

Aos pesquisadores brasileiros, que resistem em meio a desvalorização e desincentivo à ciência em nosso país.

À Francisca e Marinaldo, que abriram mão de seus sonhos para realizarem os meus.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus no qual tenho fé, por estar sempre comigo, me guiando, protegendo e dando forças quando nem eu mesmo sabia que tinha.

Aos meus pais Francisca e Marinaldo, por toda paciência e doação. Por apostarem na minha educação mesmo sendo leigos na ciência, mas sempre experts no amor.

Aos meus irmãos Jefferson e João, meus primeiros amigos e exemplos de disciplina e dedicação.

Aos meus familiares e amigos, que em meio às ausências e surtos leves sempre demonstraram apoio e orgulho diante das minhas escolhas e conquistas.

Aos amigos que acompanharam essa jornada desde quando ainda era sonho: Elza, Rênnis e Tainá. Dividimos angústias, conhecimentos, experiências, aflições e gargalhadas. Sonhamos e realizamos juntos!

Ao meu orientador Adriano Alves, pela confiança e parceria. Ele literalmente segurou minha mão e compartilhou seus conhecimentos de maneira franca, paciente e clara. Não somente me orientou na ciência, mas na vida. Fez com que eu olhasse o mundo com mais generosidade e humildade.

À minha coorientadora Leopoldina Almeida, pela preocupação e compromisso. Por ser presente e contribuir de forma geral no desenvolvimento deste trabalho. Pela amizade e paciência de longas datas, e por desacelerar meus anseios nos momentos de crise interna, trazendo conforto e soluções.

Aos meus colegas de pesquisa Ludmila e Wilson, pela paciência e cuidado. Pelas maratonas no laboratório compartilhando aflições e conquistas. Pelos conselhos, puxões de orelha, lanches, substituições e apoio físico e moral no manejo dos animais.

Ao Laboratório de Imunopatologia Experimental (LABIPEX) na pessoa de Mayara e de todos os alunos de Iniciação Científica, pela contribuição técnico-científica, mas também pela amizade, carinho e pelo ambiente de trabalho que se tornou familiar.

Aos professores André Ulisses, Frederico Sousa e Jailane Aquino, por terem aberto as portas de seus laboratórios e contribuído com seus conhecimentos acadêmicos para a execução deste trabalho.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), que desde a graduação me acolheu e disponibilizou de seus ambientes, equipamentos e profissionais (mestres, técnicos administrativos e terceirizados), essenciais para a minha formação. Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), por dedicar-se em uma formação de excelência aos pós-graduandos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que acreditou e subsidiou este trabalho.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a execução deste trabalho.

*“Você tem que passar pela chuva se quiser ver
o arco-íris.”*

- Katy Perry

RESUMO

Objetivou-se avaliar se a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) repara a osteonecrose dos maxilares induzida por bifosfonatos (ONMB) por meio da modulação da via do fator nuclear – kappa B (NF-kB) em modelo murino. Os animais foram distribuídos em grupos: controle negativo (CN), controle positivo (CP), osteonecrose experimental (ONE) + fotossensitizador (PS), ONE + fotobiomodulação (PBM) e ONE+aPDT. Durante 8 semanas induziu-se ONE aplicando-se 250µg/kg de ácido zoledrônico nos animais, sendo a solução salina 0,9% injetada por via intraperitoneal no controle negativo. O fator desencadeante da ONE foi a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Realizou-se irradiação com laser no comprimento de onda vermelho (~660nm, potência 50mW, energia 2J, dose de energia 66,67J/cm² e tempo de 40s), durante 04 semanas. Utilizou-se Azul de Metileno (100µg/mL) como PS. Os animais foram eutanasiados e observados macroscopicamente quanto a presença/ausência de osso exposto e reparo epitelial, e microscopicamente por métodos histoquímico e imuno-histoquímico. Os dados da macroscopia e histomorfometria foram analisados por meio da análise de variância “one way” e pós-teste de *Tukey*, com nível de significância estatística de 5% (p<0.05) para estabelecer as diferenças encontradas entre os grupos. Nos grupos CN, ONE+PS, ONE+PBM e ONE+aPDT constatou-se reparo da mucosa, osteócitos preservados, e imunomarcação contra NF-kB na região de exodontia. O grupo CP não apresentou reparo da mucosa, apresentando osteócitos anucleados e imunomarcação multifocal contra NF-kB. Nos grupos ONE+PBM e ONE+aPDT houve maior deposição de matriz extracelular e menor quantidade de tecido ósseo necrótico. Conclui-se que o uso da PBM e aPDT no tratamento da ONMB mostrou-se eficaz para o reparo ósseo e epitelial, além de reduzir a inflamação. O uso da aPDT foi efetivo para os reparos ósseo e epitelial, e diminuição da inflamação mediada pela via do NF-kB nas regiões de irradiação.

Descritores: Osteonecrose; Bifosfonatos; Terapia com Luz de Baixa Intensidade; Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana; NF-kappaB.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate if antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) repairs bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) modulated by the nuclear factor - kappa B (NF- κ B) pathway in a murine model. The animals were divided into groups: negative control (NC), positive control (PC), experimental osteonecrosis (ONE) + photosensitizer (PS), ONE + photobiomodulation (PBM), and ONE + antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). Over 8 weeks, ONE was induced by administering 250 μ g/kg of zoledronic acid to the animals, with 0.9% saline solution being injected intraperitoneally in the NC group. The triggering factor for ONE was the extraction of the lower left first molar. Laser irradiation was performed under red light (wavelength $\sim$ 660 nm, power 50 mW, energy 2 J, energy dose 66.67 J /cm², and time 40 s) for 4 weeks. Methylene blue (100 μ g/mL) was used as the PS. The animals were euthanized and observed macroscopically for the presence/absence of exposed bone and epithelial repair and microscopically by histochemical and immunohistochemical methods. The macroscopic and histomorphometric data were analyzed by means of one-way analysis of variance and Tukey's post-test, with a statistical significance level of 5% ($p < 0.05$), to establish differences among the groups. In the NC, ONE+PS, ONE+PBM, and ONE+aPDT groups, mucosal repair, preserved osteocytes, and immunostaining against NF- κ B were observed in the extraction region. The PC group showed no mucosal repair, showing anucleated osteocytes and multifocal immunostaining against NF- κ B. In the ONE+PBM and ONE+aPDT groups, a greater deposition of extracellular matrix and lower amount of necrotic bone tissue was found. It is concluded that the use of PBM and aPDT in the treatment of BRONJ was effective for bone and epithelial repair in addition to reducing inflammation. The use of aPDT was effective for bone and epithelial repair and decreased inflammation mediated by the NF- κ B pathway in the irradiated regions.

Keywords: Osteonecrosis; Biphosphonates; Low-Level Light Therapy; Antimicrobial Photodynamic Therapy; NF-kappaB.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹ PS	Estado singlete fundamental
¹ PS*	Estado singlete de curta vida
3D	Tridimensional
³ PS*	Estado tripleto de longa vida
AAOMS	American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons
ADI	Área de interesse
aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
ATP	Trifosfato de adenosina
AZ	Ácido zoledrônico
BMP	Proteínas morfogênicas do osso
BP	Bifosfonato
CcO	Citocromo C oxidase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
c-fms	Receptor para o fator estimulante de colônias de macrófagos
CO ₂	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
CT	Calcitonina
CTR	Receptor de calcitonina
DMAb	Denosumab
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FPP	Farnesil-difosfato
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1
IGF-2	Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 2
IP	Via Intraperitoneal
J	Jaules
LANEX	Laboratório de Nutrição Experimental
LED	Diodo emissor de luz

M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
MMP-9	Metaloproteinase de matriz do tipo 9
mW	Miliwatts
não-N-BP	Bifosfonatos não nitrogenados
N-BP	Bifosfonatos nitrogenados
NF-κB	Fator nuclear kappa-B
NO	Óxido nítrico
ON	Osteonecrose
ONE	Osteonecrose experimental
ONMB	Osteonecrose dos maxilares induzida por bifosfonatos
ONMRM	Osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos
OPG	Osteoprotegerina
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBM	Fotobiomodulação
PDT	Terapia fotodinâmica
PFA	Paraformaldeído
PS	Fotossensitizador
PTH	Paratormônio
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa-B
RANKL	Proteína ativadora de receptores do fator nuclear kappa-B ligante
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VGEF	Fator de crescimento do endotélio vascular
W	Watts
μCT	Microtomografia Computadorizada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. ANATOMIA ÓSSEA.....	4
2.1.1. Histologia do Tecido Ósseo.....	5
2.1.2. Imunologia do Tecido Ósseo.....	7
2.1.3. Reparo do Tecido Ósseo	8
2.2. OSTEONECROSE DOS MAXILARES RELACIONADA À MEDICAMENTOS (ONMRM).....	10
2.2.1. Histórico, Estadiamento e Tratamento	10
2.2.2. Fatores de Risco, Sintomas e Diagnóstico Diferencial	12
2.2.3. Características histológicas da Osteonecrose	12
2.3. BIFOSFONATOS	12
2.3.1. Constituição, Tipos e Vias de Administração	13
2.3.2. Mecanismo de ação	13
2.4. FOTOBIMODULAÇÃO	14
2.4.1. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....	15
3. OBJETIVOS	18
3.1. Geral.....	18
3.2. Específicos.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1. Amostra	19
4.2. Indução da Osteonecrose	20
4.3. Terapia Fotodinâmica	21
4.4. Eutanásia.....	21
4.5. Exame Físico dos Animais.....	22
4.6. Análise da densidade óssea em μ CT	22
4.7. Processamento Histológico	23
4.8. Análise Histológica em Microscopia de Luz	25
4.9. Análise Imuno-histoquímica.....	25
4.10. Análise Histomorfométrica	25
4.11. Análise Estatística	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Avaliação macroscópica	27

5.2.	Descrição da densidade óssea em μ CT	28
5.3.	Avaliações Histológica e Histomorfométrica da Matriz Extracelular	29
5.4.	Avaliações Histológica e Histomorfométrica do Efeito da aPDT	32
5.4.	Avaliação Imuno-histoquímica para NF-kB	35
5.5.	Avaliação qualitativa das lesões em microscopia de luz	37
6.	DISCUSSÃO	38
7.	CONCLUSÃO.....	43
8.	REFERÊNCIAS*	44
9.	ANEXOS.....	51
	Anexo 1	51
	Anexo 2	52
	Anexo 3	53

1. INTRODUÇÃO

A Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicamentos (ONMRM) é descrita como qualquer lesão com osso aparente ou que possa ser sondado através de fístula intra ou extraoral na região maxilofacial, presente por mais de 8 semanas, em indivíduos que tenham sido expostos a medicamentos antirreabsortivos ou antiangiogênicos e que não tenham sido submetidos a radioterapia ou desenvolvido doença metastática nos maxilares (1). Este tipo de osteonecrose foi inicialmente chamado por Marx (2) de *Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bifosfonatos* (ONMB).

Dentre os medicamentos relacionados à ONMRM destaca-se a classe dos Bifosfonatos (BP), estes podem ser administrados na terapêutica da osteoporose, doença de *Paget* e carcinomas (3-5). Mais de 90% dos casos de ONMRM ocorre em indivíduos que fazem tratamento para câncer com medicamentos antirreabsortivos da classe dos bifosfonatos em altas doses (6). Estes fármacos apresentam afinidade por cristais de hidroxiapatita e depositam-se nos ossos. Na reabsorção óssea, os osteoclastos fagocitam a matriz óssea degradada juntamente com as moléculas do medicamento acumulado no osso e, dentro dessas células, os BP interferem no seu metabolismo ativando vias de apoptose (7).

Os ossos maxilares são mais acometidos que os demais ossos do corpo devido à grande concentração de hidroxiapatita, maior remodelamento ósseo, suprimento sanguíneo abundante, além de ser área de frequentes intervenções cirúrgicas com manipulação óssea. Tudo isso favorece maior precipitação dos BP e risco de contaminação microbiana (8-10).

A ONMB é caracterizada por exposição óssea (dolorosa ou não) da mandíbula, maxila ou em ambas, que não respondem ao tratamento cirúrgico e médico em pacientes com câncer que recebem tratamento com pamidronato ou zoledronato (2). Associada a infecção que pode atingir os tecidos moles da face e prejudicar a alimentação e fala, comprometendo a qualidade de vida dos pacientes acometidos (11). Esse quadro pode permanecer assintomático por longos períodos (semanas, meses ou anos) (6). Uma revisão sistemática relatou o percentual de fatores desencadeantes da ONMB: extração dentária (61,7%), ocorrência espontânea

(14,8%), cirurgia oral (7,2%), trauma protético (7,4%), periodontite (5,0%) e tratamento com implante dentário (3,9%) (12).

O tratamento da ONMB varia do uso de enxaguatórios bucais à base de clorexidina 0,12%, uso de antibióticos orais ou parenterais, debridamento até ressecção cirúrgica da área da lesão, de acordo com o estágio em que se encontra, além do uso de antimicrobianos. Frente a isso, novos métodos de tratamento são encorajados, sendo possível a investigação de métodos preventivos e curativos de lesões de ONMB que possam referenciar estudos clínicos (13).

Preocupações com o desenvolvimento de resistência microbiana, devido ao uso de antibióticos tem encorajado pesquisas por novas abordagens terapêuticas para o controle de infecções, tendo como opção viável, a terapia com moléculas fotoativáveis (fotoantimicrobianos) (14). Efeitos de fotoantimicrobianos são descritos na literatura desde 1900 quando Raab conseguiu inativar o *Paramecium caudatum* quando exposto aos corantes acridina e eosina e irradiados pela luz do sol (15). A terapia fotodinâmica (PDT) anticâncer é uma realidade em hospitais principalmente no tratamento de neoplasias de pele (14). Do mesmo modo, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) apresenta resultados positivos no combate a infecções (16).

A aPDT consiste na utilização de uma luz com comprimento de onda adequado (~630-904nm) para ativar um fotosensibilizador (PS) seletivo para células microbianas previamente absorvido pelas mesmas. Quando irradiado na presença de oxigênio, o PS pode gerar altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO são citotóxicas e inativam os microrganismos que absorveram o PS sem danos teciduais (13,16). Dentre os PS existentes, o azul de metileno e o azul de toluidina se destacam pelo seu amplo espectro de ação. O azul de metileno já é conhecido por seu uso sistêmico em ensaios clínicos antimalária na África em concentrações de 2000µmol/L, enquanto para a aPDT in vitro contra *Streptococcus aureus* e *Escherichia coli* são utilizados 20µmol/L no local da infecção (14).

Quando o laser de luz vermelha de baixa potência (30-100 mW) é utilizado como fonte de luz na aPDT, efeitos fotobiomoduladores como mediação da resposta inflamatória, angiogênese, proliferação, migração, diferenciação e

aumento da atividade celular são observados. Estes eventos são fundamentais no reparo tecidual (16-19).

A aPDT tem efeitos antimicrobianos e bioestimuladores, e a ONMRM tem estadiamento e tratamento amplamente descritos (14,18,19). No entanto, os mecanismos relacionados à inibição das células ósseas na ONMRM não estão totalmente elucidados (11). Deste modo, deve-se considerar que o tratamento conservador da ONMRM com uso de antimicrobianos tópicos, orais ou sistêmicos raramente causa a cura da doença (1,20), por esta razão surge o interesse pelo desenvolvimento de novas metodologias menos invasivas para o tratamento de lesões de ONMRM, como o uso da aPDT. Por fim, a hipótese deste estudo é que a aPDT tem efeito antimicrobiano e fotobiomodulador em lesões experimentais de osteonecrose dos maxilares relacionada a bifosfonatos em ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ANATOMIA ÓSSEA

O sistema esquelético é formado majoritariamente por tecido ósseo e oferece suporte para músculos e tecidos moles, permite a locomoção do indivíduo, suporta cargas, protege órgãos vitais e armazena íons cálcio e fosfato, participando da manutenção da homeostase do cálcio, além abrigar a medula óssea e células hematopoiéticas que formam o sangue e células imunes (21-23).

Macroscopicamente o tecido ósseo é dividido em cortical ou compacto e trabecular ou esponjoso. O osso cortical é um tecido compacto denso, penetrado por vasos sanguíneos e canalículos que circundam os osteócitos e seus prolongamentos, presente na superfície de ossos longos. O osso trabecular é formado por delgadas lâminas que formam um trabeculado de aspecto esponjoso com seus espaços preenchidos por medula óssea, presente nas extremidades de ossos longos, vértebras e em superfícies articulares (Figura 1). A níveis celular e molecular esses tecidos são similares, diferindo em função e propriedades mecânicas (23).

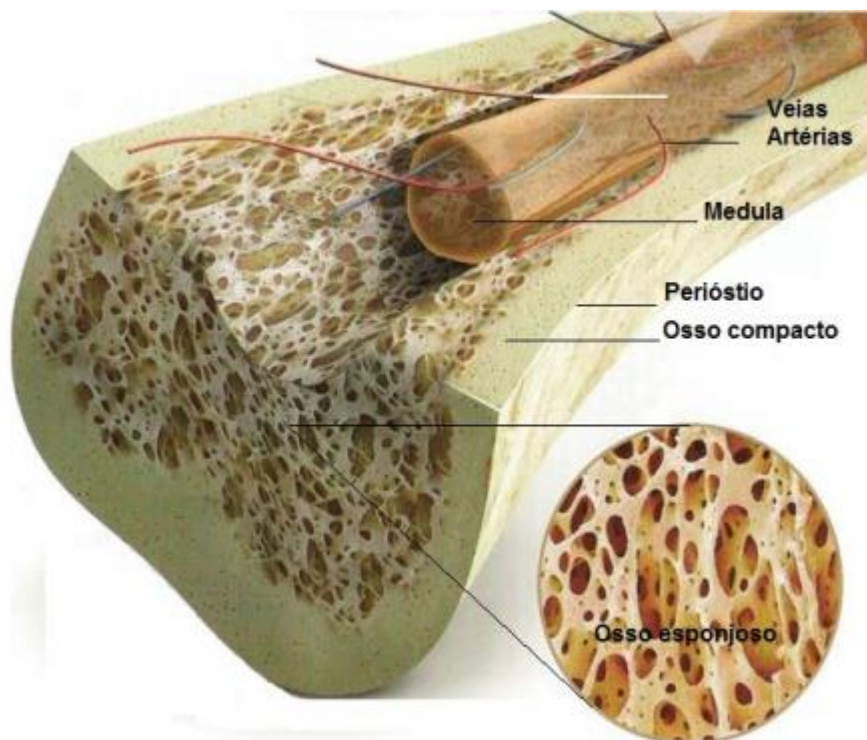


Figura 1. Tecido ósseo e suas estruturas. Fonte: KÖNIG; LIEBICH, 2016.

2.1.1. Histologia do Tecido Ósseo

O tecido ósseo é composto por células e matriz extracelular e é dividido em matriz orgânica e inorgânica. A matriz orgânica é composta por aproximadamente 95% de colágeno do tipo I, os demais componentes são outros tipos de colágeno, proteoglicanos e proteínas não colagenosas. A matriz inorgânica é predominantemente composta por íons cálcio e fosfato na forma de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) imersos na matriz orgânica. Essa composição confere rigidez e elasticidade necessárias ao tecido (21).

As células deste tecido originam-se de células mesenquimais pluripotentes que sobre a regulação do fator de transcrição *Sox9* diferenciam-se em células osteocondrogenitoras, podendo diferenciar-se em condroblastos ou osteoblastos. Quando estas células sofrem a ação do fator de transcrição *Runx2* elas são diferenciadas em osteoblastos, estes então originam os osteócitos que vão ser incorporados à matriz óssea ou células de revestimento da superfície óssea (Figura 2) (21,23).

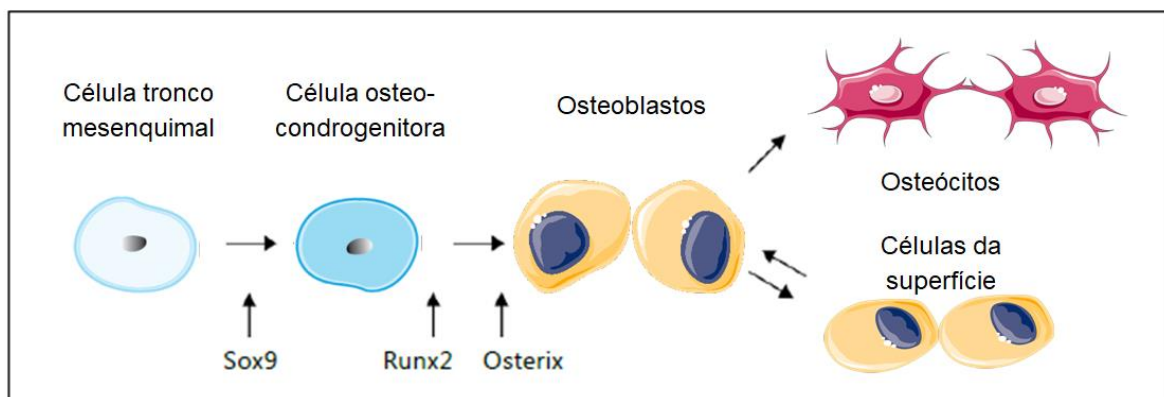


Figura 2. Diferenciação dos osteoblastos.

Os osteoblastos surgem de uma célula precursora pluripotente de origem mesenquimal (célula-tronco mesenquimal). Uma célula osteocondrogenitora capaz de formar condrócitos e osteoblastos surge sob o controle do fator de transcrição *Sox9*. O *Runx2* é o regulador chave da diferenciação dos osteoblastos e é expresso constitutivamente nos osteoblastos em todos os estágios de diferenciação. Um segundo fator de transcrição, *Osterix*, atua juntamente ao *Runx2* na diferenciação dos osteoblastos. Os osteoblastos podem ainda se diferenciar em osteócitos que ficam presos na matriz óssea (osteócitos) ou em células de revestimento nas superfícies ósseas (23). Fonte: Adaptado de GRABOWSKI, 2015.

A principal função dos osteoblastos é secretar matriz mineralizada, que enquanto não se torna calcificada é chamada de matriz osteóide, rica em proteoglicanos e glicoproteínas. O processo de mineralização é mediado principalmente pela vitamina D e paratormônio (PTH). O osso ainda expressa

fosfatase alcalina, sialoproteína óssea (osteopontina), osteocalcina, fatores de crescimento semelhantes à insulina -1 e -2 (IGF-1 e IGF-2) e proteínas morfogênicas do osso (BMP) que pertencem a família do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (21,23,25). Quando os osteoblastos são cercados por matriz óssea, eles tornam-se osteócitos que ficam presos em lacunas e estendem-se em prolongamentos por canálculos na matriz óssea, sendo responsáveis pela manutenção do tecido (21). As células de revestimento da superfície óssea são derivadas de osteoblastos inativos, que pararam de secretar matriz óssea e o conhecimento sobre sua diferenciação é pouco descrito (23).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas provenientes de células hematopoiéticas da linhagem dos macrófagos e são as únicas capazes de degradar matriz mineralizada (21). Os precursores dos osteoclastos expressam o receptor para o fator estimulante de colônias de macrófagos (c-fms) que, quando ativado, por meio do fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) expresso pelos osteoblastos, expressa o receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK), molécula da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), que se liga ao RANK-ligante (RANKL) nos osteoblastos e caracteriza o processo de diferenciação dos osteoclastos (Figura 3) (23).

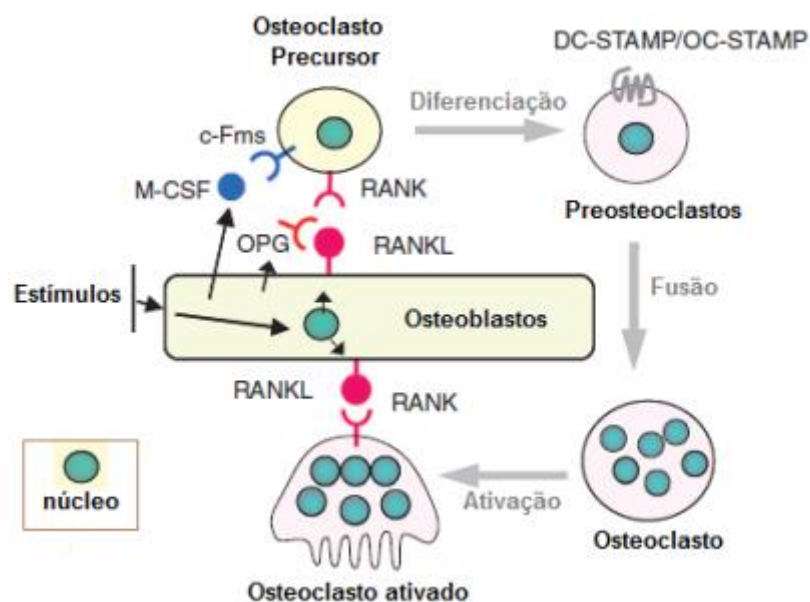


Figura 3. Ação do osteoblasto ativado na diferenciação dos osteoclastos (26). Fonte: TAKAHASHI, 2014.

2.1.2. Imunologia do Tecido Ósseo

O tecido ósseo e o sistema imune têm em comum algumas moléculas regulatórias como citocinas, quimiocinas, receptores e fatores de transcrição que exercem influência mútua umas sobre as outras (22). A interação de células do sistema imune com a medula óssea atribui ao sistema esquelético funções de hematopoiese e controle do metabolismo mineral (27), a essa interação dá-se o nome de “Osteoimunologia” (28).

Dentre as diversas moléculas envolvidas na imunomodulação óssea, destaca-se o RANK, proteína transmembrana do tipo I expressa em células precursoras dos osteoclastos (27). Nos osteoblastos, é expresso o RANKL e a partir de sua ligação com o RANK ocorre a diferenciação (formação e fusão) dos precursores de osteoclastos em células gigantes multinucleadas chamadas de osteoclastos (21,23).

A ligação do RANKL ao RANK pode ser bloqueada pela ação de uma proteína secretada por pré-osteoblastos e células estromais, chamada osteoprotegerina (OPG) que tem função protetora sobre o osso, inibindo sua reabsorção. A inibição ocorre porque a OPG atua como um receptor chamariz para o RANK, ligando-se a ele e impedindo a ligação do RANKL que é a chave para a osteoclastogênese (Figura 4). Quando ocorre a inibição da reabsorção óssea, é possível o desenvolvimento de osteopetrose (doença caracterizada pelo aumento da densidade óssea) (21).

O balanço entre as concentrações de RANKL e OPG regula a ativação do RANK. A ativação do RANK inicia vias intracelulares essenciais para a atividade dos osteoclastos maduros como a via do fator nuclear-kappa B (NF- κ B) (23). Os osteoclastos passam a expressar os marcadores específicos fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K, receptor de calcitonina (CTR) e receptores de integrina (21).

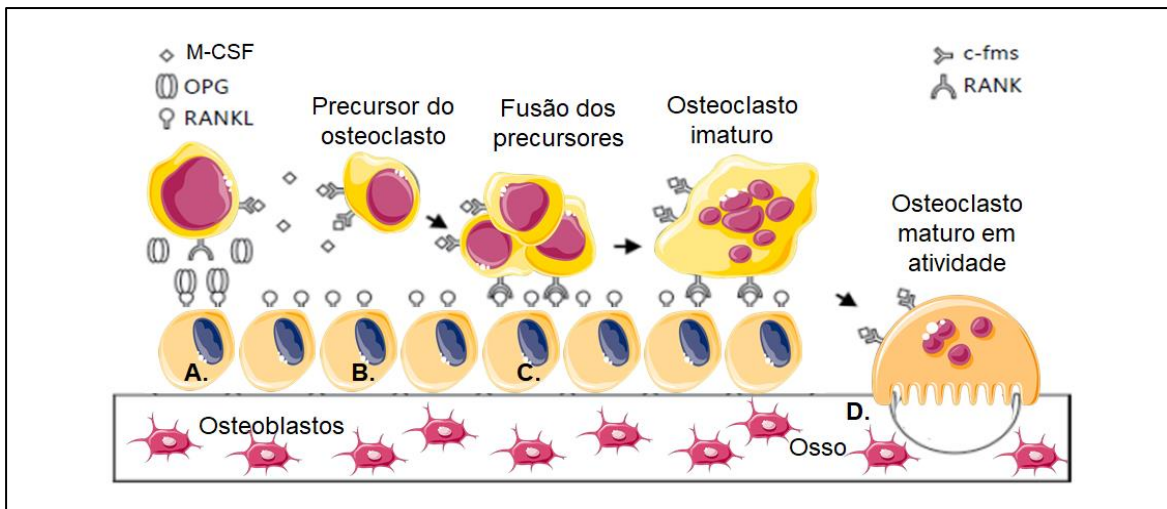


Figura 4. Osteoclastogênese.

Os osteoclastos surgem de células hematopoiéticas da linhagem dos macrófagos (precursores dos osteoclastos) que expressam c-fms. **A.** OPG inibe a ligação do RANKL ao RANK. **B.** O M-CSF expresso nos osteoblastos estimula a produção do RANK nos precursores dos osteoclastos. **C.** Os osteoblastos expressam RANKL que se liga ao RANK estimulando a fusão dos precursores dos osteoclastos formando células multinucleadas (osteoclastos). **D.** Os osteoclastos maduros formam uma zona de selamento com o osso por meio de sua superfície rugosa, por onde secretam enzimas que degradam matriz óssea e formam uma lacuna de reabsorção. O RANKL atua nos osteoclastos em toda sua maturação. A osteoclastogênese é regulada por osteoblastos por meio do balanço entre RANKL e OPG (proteína que compete com o RANKL para ligar-se ao RANK, inibindo a interação RANKL-RANK e consequentemente a osteoclastogênese) (23). Fonte: Adaptado de GRABOWSKI, 2015.

2.1.3. Reparo do Tecido Ósseo

O equilíbrio entre formação e reabsorção óssea depende da comunicação entre todas as células do tecido ósseo (osteoblastos, osteócitos, osteoblastos de superfície e osteoclastos) que fisiologicamente mantêm a densidade e a resistência óssea ideais e ainda regulam as concentrações de íons cálcio e fosfato no organismo. Estes processos ocorrem durante toda a vida do indivíduo, promovendo a substituição de tecido antigo por tecido novo no mesmo local, o que chamamos de remodelamento ósseo. Este processo é adaptativo aos estímulos mecânicos e fisiológicos sobre os ossos (29,30).

O remodelamento ósseo é controlado por fatores locais e sistêmicos. Os níveis séricos de cálcio são regulados principalmente por calcitonina (CT), PTH e vitamina D (1,25-di-hidroxivitamina D - 1,25(OH)₂D). O PTH é um hormônio sintetizado e secretado pela paratireoide que estimula a liberação de cálcio e fosfato dos ossos para a circulação quando os níveis séricos circulantes desses íons estão baixos, por meio da estimulação da expressão de RANKL e inibição da OPG pelos osteoblastos e consequente ativação dos osteoclastos por interação RANKL-

RANK. O PTH ainda estimula a expressão de IGF-1 que aumenta a proliferação e diferenciação de osteoblastos e indiretamente estimula a atividade osteoclástica (23,29).

O PTH também aumenta a reabsorção renal de cálcio e a produção renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (forma ativa da vitamina D, chamada também de calcitriol). O calcitriol (CT) atua no intestino aumentando a absorção de cálcio para o organismo. O hormônio CT é produzido pela tireoide e, ao ligar-se a seus receptores nos osteoclastos, promove a perda da superfície enrugada das células multinucleadas, inibindo a reabsorção óssea. O equilíbrio entre PTH e CT é essencial para o controle da reabsorção óssea promovida pelo PTH (23,29).

O processo de remodelamento ósseo começa por meio de integrinas que aderem o osteoclasto ao tecido ósseo criando uma lacuna isolada de reabsorção (lacuna de Howship) onde a célula gigante multinucleada libera enzimas ácidas e proteolíticas que degradam matriz óssea. A superfície de contato da célula torna-se enrugada e seu toque com o osso dá origem a uma zona de selamento. É neste local que ocorre a liberação de ácido hidrocloreídrico (HCl) e enzimas como a TRAP, catepsina K e metaloproteinases de matriz 9 (MMP-9) degradando colágeno e matriz óssea (Figura 5) (21,23,25,30). Na zona de selamento as BMP, IGF-1 e IGF-2, insolúveis em ácido, atuam como citocinas ativas (fatores de crescimento e diferenciação) ligando-se às membranas de células-tronco locais e circulantes, estimulando a diferenciação em osteoblastos para que seja secretada nova matriz óssea (25).

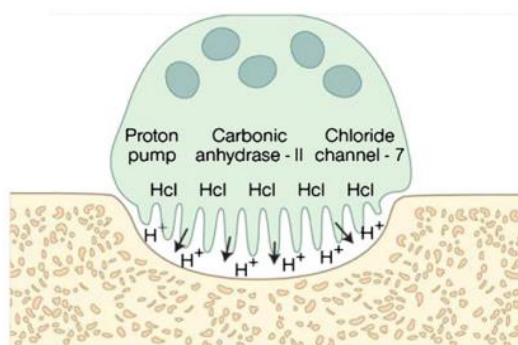


Figura 5. Ação do osteoclasto no osso. Os osteoclastos degradam o osso pela liberação de HCl e enzimas na zona de selamento por bombas de prótons, anidrase carbônica II e canais de cloreto-7 (25). Fonte: MARX, 2007.

2.2. OSTEONECROSE DOS MAXILARES RELACIONADA À MEDICAMENTOS (ONMRM)

A ONMRM foi definida pela *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* (AAOMS) como lesões de osso aparente ou que possa ser sondado por meio de fístula intra ou extraoral na mandíbula ou na maxila, presentes por mais de 8 semanas, em indivíduos que tenham sido tratados com medicamentos antirreabsortivos ou antiangiogênicos e que não tenham sido submetidos a radioterapia ou desenvolvido doença metastática nos ossos maxilares (1).

2.2.1. Histórico, Estadiamento e Tratamento

A primeira publicação descrevendo este tipo de lesão foi realizada por Marx em 2003, que identificou 36 indivíduos apresentando exposição óssea dolorosa na mandíbula, na maxila ou concomitante nos dois ossos que não respondiam a tratamentos cirúrgicos e terapias medicamentosas. Foi constatado que todos os indivíduos tinham utilizado pamidronato ou zoledronato como terapia para osteoporose ou hipercalcemia relacionada à cânceres. Estes medicamentos, da classe dos bifosfonatos (BP), eram utilizados como mediadores inibitórios da reabsorção óssea, mas o seu mecanismo de ação sobre os osteoclastos era inconclusivo. As lesões surgiram após exodontias e até espontaneamente, então Marx discorreu sobre suas preocupações e alertou as comunidades odontológica e médica sobre os possíveis riscos envolvidos para o desenvolvimento destas lesões e incentivou o delineamento de estudos que elucidassem a patogênese da então denominada Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bifosfonatos (ONMB) (2).

Estudos relataram a similaridade das lesões de ONMB com lesões de necrose da mandíbula por fósforo em trabalhadores expostos ao fósforo branco no final do século XIX e início do século XX, suportando a hipótese de que as lesões descritas por Marx estivessem diretamente relacionadas aos BP (31-33). A partir disso, a AAOMS publicou diretrizes para o diagnóstico, estadiamento e tratamento da ONMB em 2006, as quais foram atualizadas em 2009 e em 2014 (1,34,35).

Em 2014, devido ao crescente número de casos de osteonecrose dos maxilares associados a outros antirreabsortivos (denosumab/DMAb) e antiangiogênicos, a AAOMS modificou o termo ONMB para ONMRM, definiu um estadiamento para as

lesões de ONMRM e propôs um tratamento para cada estágio da doença (Quadro 1) (1).

Quadro 1. Estadiamento e tratamento proposto (1)	
Estadiamento de ONMRM	Tratamento
<i>Em risco</i> - sem osso necrótico aparente em pacientes que foram tratados com bifosfonatos orais ou intravenosos.	Nenhum tratamento indicado; Educar o indivíduo.
<i>Estágio 0</i> - nenhuma evidência clínica de osso necrótico, mas achados clínicos inespecíficos, alterações radiográficas e sintomas.	Tratamento sistêmico incluindo o uso de analgésicos e antibióticos.
<i>Estágio 1</i> - osso necrótico exposto ou que possa ser sondado por fístulas em indivíduos assintomáticos e sem evidência de infecção.	Enxaguatório bucal antibacteriano; Acompanhamento clínico trimestral; Educação do indivíduo e revisão das indicações para continuação terapia com BP.
<i>Estágio 2</i> - osso necrótico exposto ou que possa ser sondado por fístulas associado à infecção, com dor e eritema na região da lesão com ou sem drenagem purulenta.	Tratamento sistêmico com antibióticos orais; Enxaguatório bucal antibacteriano; Controle da dor com analgésicos; Desbridamento para promover irritação de tecidos moles e controle de infecção.
<i>Estágio 3</i> - osso necrótico exposto ou que possa ser sondado por fístulas em indivíduos com dor, infecção e 1 dos seguintes sinais: osso exposto e necrótico que se estende além da região do osso alveolar (ou seja, borda inferior e ramo na mandíbula, seio maxilar e zigoma na maxila) resultando em fratura, fístula extraoral, comunicação oral-antral ou -nasal ou osteólise estendendo-se até a borda inferior da mandíbula ou assoalho do seio nasal.	Enxaguatório bucal antibacteriano; Antibioticoterapia e controle da dor; Desbridamento cirúrgico ou ressecção como paliativo para infecção e dor a longo prazo.

2.2.2. Fatores de Risco, Sintomas e Diagnóstico Diferencial

Pacientes oncológicos ou com osteoporose são mais sujeitos aos fatores de risco associados ao desenvolvimento da ONMRM. Os principais fatores de risco são: uso de BP intravenoso ou oral (tanto a dose quanto o tempo de exposição influenciam no aparecimento da osteonecrose); uso de DMAb; extração dentária; quimioterapia; doença periodontal; supuração local; terapia com corticoides; diabetes; uso de dentadura; terapia com eritropoietina; uso do tabaco; hipertireoidismo; hemodiálise; terapia com ciclofosfamida; e aumento da idade (6).

Áreas de osso necrótico exposto podem permanecer assintomáticas por períodos prolongados de semanas, meses ou até anos. Estas lesões tornam-se mais frequentemente sintomáticas com a inflamação dos tecidos circundantes. Os sinais e sintomas podem ocorrer antes do desenvolvimento da osteonecrose clinicamente detectável e incluem dor, mobilidade dentária, edema, eritema e ulceração da mucosa. Sensibilidade alterada na área afetada pode ser relatada devido a compressão do feixe vasculo-nervoso pela inflamação (6).

Os diagnósticos diferenciais para as lesões de ONMR podem incluir osteíte alveolar, sinusite, gengivite, doença periodontal, doenças periapicais e algumas formas de displasia cemento-ósseas que apresentam sequestro secundário. Inflamação e infecção óssea geralmente estão presentes em pacientes com ONMRM avançada e parecem ser eventos secundários (6).

2.2.3. Características histológicas da Osteonecrose

A morte dos constituintes celulares do tecido ósseo de etiologia não infecciosa é a principal característica da osteonecrose. O diagnóstico histopatológico da doença é dado quando se observa ausência dos osteócitos na matriz inorgânica (36) e presença de cinco (37,38) ou dez (39,40) lacunas de osteoclastos vazias.

2.3. BIFOSFONATOS

Os BP são utilizados para tratar algumas doenças caracterizadas pela reabsorção osteoclástica excessiva de osso como hipercalcemia relacionada à

malignidade, osteoporose e doença de Paget. Essa classe de medicamentos tem propriedades gerais antirreabsortivas e antiangiogênicas (41).

2.3.1. Constituição, Tipos e Vias de Administração

Os BP são estáveis e não hidrolisáveis com estrutura química (P-C-P) semelhante à do pirofosfato (P-O-P). Estes medicamentos podem ter nitrogênio em sua composição (N-BP) ou apresentar estrutura simples, sem moléculas de nitrogênio (não-N-BP). Essa diferença estrutural relaciona-se com o mecanismo de ação e potência do medicamento, sendo os N-BP de 100 a 10.000 vezes mais potentes que os não-N-BP. No quadro 2 estão apresentados os principais BP, suas respectivas potências e vias de administração (41).

Quadro 2. Bifosfonatos, potências e vias de administração

Bifosfonato	Potência	Via de Administração
Etidronato	1	Oral
Clodronato	10	Oral
Pamidronato	100	Intravenoso
Alendronato	100 – 1.000	Oral
Ibandronato	1.000 – 10.000	Oral
Risendronato	1.000 – 10.000	Oral
Zoledranato	>10.000	Intravenoso

Traduzido e adaptado de Hamadeh, 2015 (42).

2.3.2. Mecanismo de ação

A molécula de carbono na estrutura química dos BP confere resistência a degradação por enzimas osteolíticas secretadas pelos osteoclastos durante a reabsorção. Sua similaridade com o pirofosfato dá ao BP a capacidade de se ligar à hidroxiapatita, permitindo que seja rapidamente diminuído da concentração plasmática e até 60% de sua dose de deposite nos ossos (42).

Durante o processo de reabsorção óssea, o ambiente ácido criado no osso favorece a liberação dos BP da hidroxiapatita e os osteoclastos vizinhos à esta região fagocitam estas moléculas. Os não-N-BP são metabolizados em análogos citotóxicos intracelulares e não hidrolisáveis de ATP, que se acumulam nos

osteoclastos e desencadeiam apoptose destas células. Já os N-BP inibem a função dos osteoclastos agindo como inibidores potentes da enzima farnesil-difosfato (FPP) sintase na via biossintética do colesterol/mevalonato. Essa inibição é responsável por uma diminuição da atividade de GTPases (enzimas que hidroxilam os nucleotídeos trifosfato de guanosina [GTP] em difosfato de guanosina [GDP]) no rearranjo citoesquelético e no tráfego vesicular nos osteoclastos (41,42).

2.4. FOTOBIMODULAÇÃO

A fotobiomodulação (PBM) consiste no uso de luz (proveniente de lasers de baixa potência ou diodos emissores de luz/LED) em comprimentos de onda adequados para estimular respostas celulares (43). O laser é chamado de baixa potência em comparação a outros lasers que são utilizados para ablação, corte e cauterização (44). A irradiação de luz por meio da PBM é capaz de interagir com células sem danos térmicos e promover reparo tecidual, diminuição de inflamação ou indução de analgesia (45). Microrganismos podem sofrer morte por apoptose ou necrose por meio da PBM, pois a irradiação é capaz de formar espécies reativas de oxigênio que atingem os microrganismos e poupam as células dos tecidos (46).

As fontes de luz utilizadas na PBM têm comprimentos de onda que variam entre 600-1000nm (luz vermelha visível a infravermelho), potência de 1mW a 10W e irradiação de 5mW/cm² a 5W/cm² com feixe de luz pulsante ou contínuo. O tempo de irradiação, geralmente de 30s a 60s por ponto, é um fator chave para obtenção de efeitos bioestimuladores. A energia aplicada é calculada como potência (W) x tempo (s) = energia (J). A profundidade de penetração está relacionada ao comprimento de onda de espectro vermelho ou infravermelho utilizado, idealmente entre 670-900nm, permitindo uma potência de luz de até 5mW em 5cm de profundidade (45).

Os efeitos da irradiação com luz sobre as células podem ser explicados pela capacidade de absorção de luz das mitocôndrias. Estas são organelas que, em condições normais, produzem ATP. Em tecidos sob estresse ou isquemia, as mitocôndrias sintetizam óxido nítrico (NO), que compete com o oxigênio impedindo sua ligação à enzima terminal na cadeia de transporte de elétrons necessária para

formação de energia, a citocromo C oxidase (CcO), diminuindo a síntese de ATP e aumentando o estresse oxidativo, promovendo inflamação pela ativação do fator de transcrição inflamatório NF- κ B (45).

Dependendo do tipo celular sob estresse ou hipóxia a PBM promove a liberação do NO da CcO, o que aumenta a síntese de ATP e diminui o estresse oxidativo, estimulando componentes do citosol, da membrana e do núcleo que controlam a transcrição de genes e regulam respostas celulares como proliferação, migração, necrose e resposta inflamatória. A segurança no uso de lasers de baixa potência é significativamente alta em comparação aos lasers de maior potência utilizados em cirurgias. A aplicação desta terapia não tem efeitos colaterais conhecidos, e os riscos à saúde são mínimos, com atenção aos danos oculares que devem ser prevenidos com uso de óculos de proteção apropriado ao comprimento de onda utilizado (45).

2.4.1. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) consiste em um processo de foto-oxidação na presença de um agente fotosensibilizador (PS), oxigênio molecular e irradiação com luz gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) que promovem a morte de microrganismos (46). Sob irradiação apropriada, o PS muda seu estado de energia inicial (estado singleto fundamental, ^1PS) para um estado singleto de curta vida ($^1\text{PS}^*$) o qual pode ser convertido para um estado tripleto de longa vida ($^3\text{PS}^*$). Na presença de oxigênio molecular, o $^3\text{PS}^*$ pode gerar altos níveis de ERO por dois mecanismos (Figura 6):

- **Tipo I:** via transferência de elétrons, formando ERO (principalmente superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila);
- **Tipo II:** via transferência de energia para o oxigênio tripleto fundamental produzindo oxigênio singleto reativo (13,47).

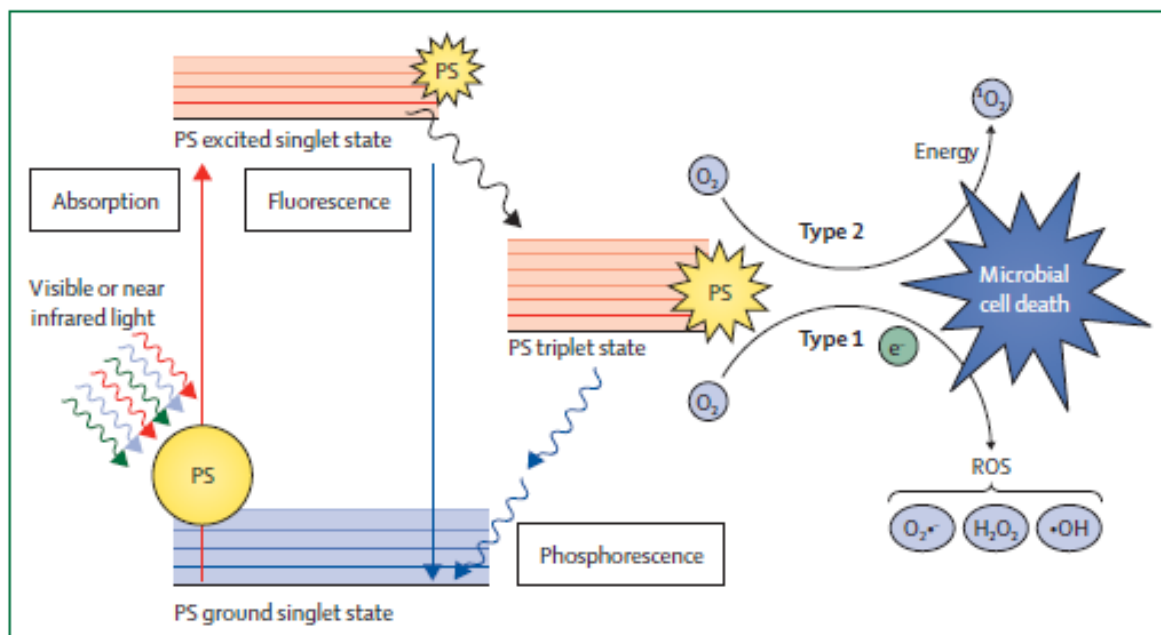


Figura 6. Mecanismo de ação fotoantimicrobiana.

A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode seguir duas vias alternativas após a ativação da luz por um determinado fotosensibilizador (PS). O PS em seu estado fundamental pode absorver um fóton, formando o estado singlete excitado (curta vida). Este estado pode sofrer cruzamento intersistema para um estado tripleto de longa vida que pode interagir com o oxigênio por dois mecanismos: no **tipo 1**, a formação de O_2^- , H_2O_2 e OH por transferência de elétrons do PS excitado; no **tipo 2**, o estado tripleto do PS pode sofrer diretamente a troca de energia com o oxigênio tripleto fundamental, levando à formação de 1O_2 . As ERO formadas reagem rapidamente com seu ambiente, dependendo da localização do PS excitado - por exemplo, paredes celulares de microrganismos, membranas lipídicas, peptídeos e ácidos nucleicos. O PS retorna ao seu estado inicial após este ciclo, pronto para absorver um novo fóton e gerar ROS adicionais. O_2^- = ânions superóxido; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; OH = radicais hidroxila; 1O_2 = oxigênio singlete; e^- = elétrons (14). Fonte: WAINWRIGHT, 2016.

Os altos níveis de ERO têm grande espectro de atividade e, em células que absorveram o PS, podem destruir vários alvos microbianos como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, diminuindo a probabilidade de desenvolvimento de resistência microbiana (14). O uso do laser de baixa potência como fonte de luz na aPDT difunde e espalha o feixe para áreas periféricas à infecção e promove efeitos fotobiomoduladores como modulação da resposta inflamatória, angiogênese, proliferação, migração, diferenciação e atividade celular, que são eventos essenciais para o processo de reparação de tecidos (13).

Os PS são moléculas orgânicas insaturadas altamente conjugadas com coeficiente de absorção de luz nos espectros vermelho e infravermelho, o que garante uma boa penetração da luz nos tecidos. A capacidade de absorção do PS pelas células microbianas tem influência na eficiência da aPDT, visto que o PS deve ser absorvido pela membrana citoplasmática dos microrganismos para que a aPDT promova seus efeitos citotóxicos (47). Os pontos positivos dos PS são:

- O curto tempo de absorção (poucos minutos) do PS sobre o local da infecção limita a localização do PS sobre ou dentro dos microrganismos e limita a penetração e absorção do PS nos tecidos do hospedeiro (o que pode levar horas);
- A alta biocompatibilidade por terem natureza química geralmente de sais de fenotiazina, porfirinas e ftalocianinas;
- Simples ativação por laser de baixa potência, luzes de LED ou halógenas (que podem ter feixe direcionado por fibra óptica, localizando ainda mais a irradiação) (14);
- Baixa toxicidade na ausência de luz;
- Eliminação rápida pelo corpo, maior seletividade e baixa agregação em soluções aquosas ou biológicas (48).

Vários PS têm propriedades fotoantimicrobianas que foram descritas em ensaios clínicos. Os principais são: azul de metileno, azul de toluidina, cúrcuma, riboflavina e indocianina verde (14). Dentre estes, o azul de metileno, um fenotiazínico composto por dois anéis de benzeno ligados a um átomo de nitrogênio e um átomo de enxofre ($C_{16}H_{18}N_3HSCl$) (Figura 7), com absorção de luz ente 630-680nm e produz 1O_2 (oxigênio singleto reativo) (48).

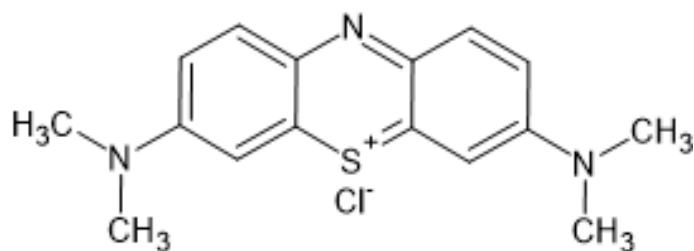


Figura 7. Estrutura molecular do azul de metileno.

A ação fotoantimicrobiana dos fenotiazínicos acontece na parede celular bacteriana ou membrana citoplasmática e relaciona-se com a natureza hidrofóbica e lipofílica destes compostos, promovendo maior distribuição celular e capacidade de permear células sanguíneas, justificando sua aplicação e eficácia nos protocolos de aPDT (48).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar a imunomodulação e eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no tratamento da Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Bifosfonatos em modelo murino.

3.2. Específicos

- Avaliar macroscopicamente e descrever a efetividade do protocolo de indução experimental da osteonecrose com Ácido Zoledrônico em ratos;
- Avaliar macroscopicamente o efeito reparador da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em lesões experimentais de osteonecrose induzidas por Ácido Zoledrônico em ratos;
- Descrever a densidade óssea da doença e do tratamento proposto, por meio de Microtomografia Computadorizada (μ CT);
- Realizar análise Histoquímica para os corantes: Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Mason e Ácido Periódico de Schiff (PAS);
- Realizar análise Imuno-histoquímica para a presença do marcador celular anti-NF-kB.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostra

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) sob protocolo nº 5164120121 (ID 001279) e está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) (Anexos 1 e 2).

A amostra foi composta por ratos (machos da linhagem Wistar – *Rattus Norvegicus*) com 30 dias de idade e média de peso de 300g (n=30) obtidos e alocados no Biotério do Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX), no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Nas duas semanas antecedentes ao início do experimento os animais passaram pelo período de aclimação, em temperatura média de $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12h/12h, com acesso à água potável e ração adequada. Os mesmos foram alocados em caixas de polipropileno com tampa zincada (gaiolas) (n=10), cada uma contendo 3 animais. Para o estudo, cinco grupos experimentais foram definidos: controle negativo (CN), controle positivo (CP), osteonecrose experimental (ONE) + fotossensibilizador (PS), ONE + fotobiomodulação (PBM) e ONE+aPDT (Quadro 3).

Quadro3. Distribuição dos grupos da pesquisa

Grupo	Descrição	N
Controle Negativo	Ratos sadios	06
Controle Positivo	Ratos com osteonecrose experimental (ONE)	06
ONE+PS	Ratos com ONE infiltrados por azul de metileno	06
ONE+PBM	Ratos com ONE tratados com fotobiomodulação	06
ONE+aPDT	Ratos com ONE tratados com aPDT	06
Total		30

Com base no estudo de Ervolino (13), estimou-se uma variabilidade populacional (desvio padrão) de ± 2 e uma diferença mínima a ser detectada entre os grupos experimentais de 1,8 (médias) para o principal parâmetro experimental. Ao utilizar o teste T não pareado na comparação entre os grupos e valores de alfa

(erro tipo I – 5%) e beta (erro tipo II – 80%), definiu-se n=05 animais por grupo. Levando em conta uma mortalidade de 30% ou perdas por problemas de procedimento, foram solicitados um n=06 animais por grupo, totalizando n=30 ratos Wistar.

4.2. Indução da Osteonecrose

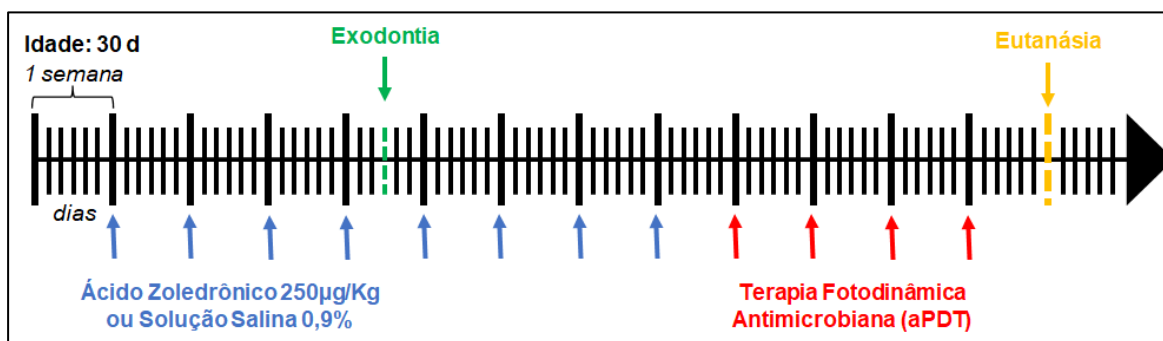


Figura 8. Linha do tempo esquemática para os grupos controle e AZ (ratos tratados com solução salina 0,9% e ácido Zoledrônico 250µg/Kg), iniciando 4 semanas antes da exodontia.

- *Administração do bifosfonato*

Adaptando a metodologia de indução da osteonecrose experimental em ratos proposta por Bigueti (49), nos grupos controle positivo, ONE+PS, ONE+PBM e ONE+aPDT foram administrados 250µg/kg de Ácido Zoledrônico (AZ) 4mg/5mL, totalizando 100µl por via intraperitoneal (IP) e no grupo controle negativo foram administrados 100µl de solução salina estéril 0,9% IP. Os ratos receberam injeções IP de AZ e solução salina estéril 0,9% uma vez por semana, durante 4 semanas antes da extração do primeiro molar inferior esquerdo, e continuaram recebendo a mesma posologia até o final do período de indução da osteonecrose experimental de 8 semanas (Figura 8). Não foram administrados antibióticos ou antiinflamatórios após a extração do molar, para evitar interferências nas vias inflamatórias (49).

- *Exodontia*

Após 4 semanas de administração do medicamento, todos os animais foram submetidos à extração do primeiro molar inferior esquerdo no Laboratório de Patologia do Departamento de Fisiologia e Patologia, CCS/UFPB. Considerando a Resolução Normativa Nº 25, de 29 de setembro de 2015, no item 3.4 "Prevenção da dor e do distresse potencial" (50), os animais foram anestesiados com uma

associação de Cetamina (75mg/Kg – 0,75mL) + Xilazina (10mg/Kg – 0,5mL) + 0,75mL de água para anestesia IP (0,2mL/100g) garantindo imobilização e anestesia geral entre 30 a 45 min (51). Uma vez sedados e anestesiados, a luxação do elemento dentário foi realizada com sonda exploradora nº 5, e depois removido delicadamente com o auxílio de pinça clínica. A administração do bifosfonato continuou até a oitava semana (Figura 8).

4.3. Terapia Fotodinâmica

Passado o período de indução da osteonecrose (final da 8ª semana), foi iniciada a irradiação com laser de baixa potência. Utilizou-se o equipamento TF Premier Plus (MM Optics, São Paulo, Brasil) em colaboração com o Professor André Ulisses Dantas Batista, Departamento de Odontologia Restauradora, CCS/UFPB. A irradiação seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante do laser para o reparo de tecidos periodontais e foi realizada com luz vermelha visível com comprimento de onda 660nm, potência 50mW, energia 2J, densidade energética 66,67J/cm² e tempo de 40s em cada ponto. A ponta do laser foi posicionada em contato íntimo com o centro da lesão para que o feixe ficasse direcionado paralelamente ao longo eixo do alvéolo dentário do dente extraído. O Azul de Metileno (100µg/ml) foi empregado como PS nos grupos ONE+PS e ONE+aPDT, aplicando-se 20µL diretamente no sítio da lesão de ON durante 60s antes da irradiação (13). As irradiações com laser foram realizadas uma vez por semana, durante 4 semanas em todos os grupos experimentais (Figura 8). Para a aplicação do laser, foi executado o mesmo protocolo anestésico da exodontia.

4.4. Eutanásia

Ao término da irradiação com laser (final da 12ª semana), os animais foram eutanasiados segundo as orientações que constam na “Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal” (50). Para isso, foi utilizado o mesmo protocolo anestésico da exodontia seguindo a eutanásia por meio do método do deslocamento cervical. Em seguida, o exame clínico (físico) e registro fotográfico de cada roedor foram realizados por um único operador, feitos um animal por vez.

4.5. Exame Físico dos Animais

O exame físico foi realizado em sala com iluminação apropriada (foco de luz), por meio de observação direta com auxílio de pinça clínica e sonda exploradora nº 5. As mandíbulas dos animais foram dissecadas, e os tecidos moles foram divulsionados com o auxílio de pinça clínica e tesoura de metzembaum. Foram realizados registros fotográficos oclusais. Seguindo os parâmetros clínicos avaliados por Ervolino (13), foram registradas e comparadas as seguintes características clínicas:

1. Ausência de osso exposto e membrana mucosa totalmente reparada;
2. Ausência de osso exposto e membrana mucosa parcialmente reparada;
3. Lesões semelhantes a ONMB - local de extração com pequena área de osso exposto (menos da metade do espaço alveolar) e comprometimento do reparo da membrana mucosa;
4. Lesões semelhantes a ONMB - local de extração com grande área de osso exposto (mais da metade do espaço alveolar) e comprometimento do reparo da membrana mucosa.

Os animais eutanasiados foram acondicionados em sacos plásticos sob refrigeração a -20° C. O recolhimento foi realizado por empresa especializada no descarte de material biológico.

4.6. Análise da densidade óssea em μ CT

A fim de descrever a densidade óssea entre os grupos, uma hemimandíbula representativa de cada grupo foi escaneada pelo Skyscan 1172 System (Skyscan, Kontich, Bélgica) a 50 kV, 800 μ A, com filtro de alumínio de 0,5 mm, 180 graus de rotação e faixa de exposição de 1 grau e resolução de tamanho de pixel de 14 μ m (49).

O equipamento está alocado no Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica (LAMIB) em colaboração com o Professor Frederico Sousa, Departamento de Morfologia, CCS/UFPB. As imagens foram reconstruídas usando o software NRecon (Skyscan, Kontich, Bélgica), após a reconstrução tridimensional (3D) das imagens usando CTVox, e os parâmetros quantitativos foram avaliados usando o software CTAn (Skyscan, Kontich, Bélgica) (49).

Os parâmetros quantitativos para avaliação da reconstrução 3D do osso trabecular foram: fração de volume ósseo (BV/TV - %), número de trabéculas (Tb.N

- mm), espessura trabecular (Tb.Th - mm) e separação trabecular (Tb.Sp - mm). (52). Não foram avaliados parâmetros de osso cortical. Uma área de interesse (ADI) foi estabelecida para calcular a fração de volume ósseo, compreendida de forma cilíndrica na região do alvéolo acometido com comprimento coroa-ápice de 3mm e diâmetro de 1mm (Figura 9) (49).

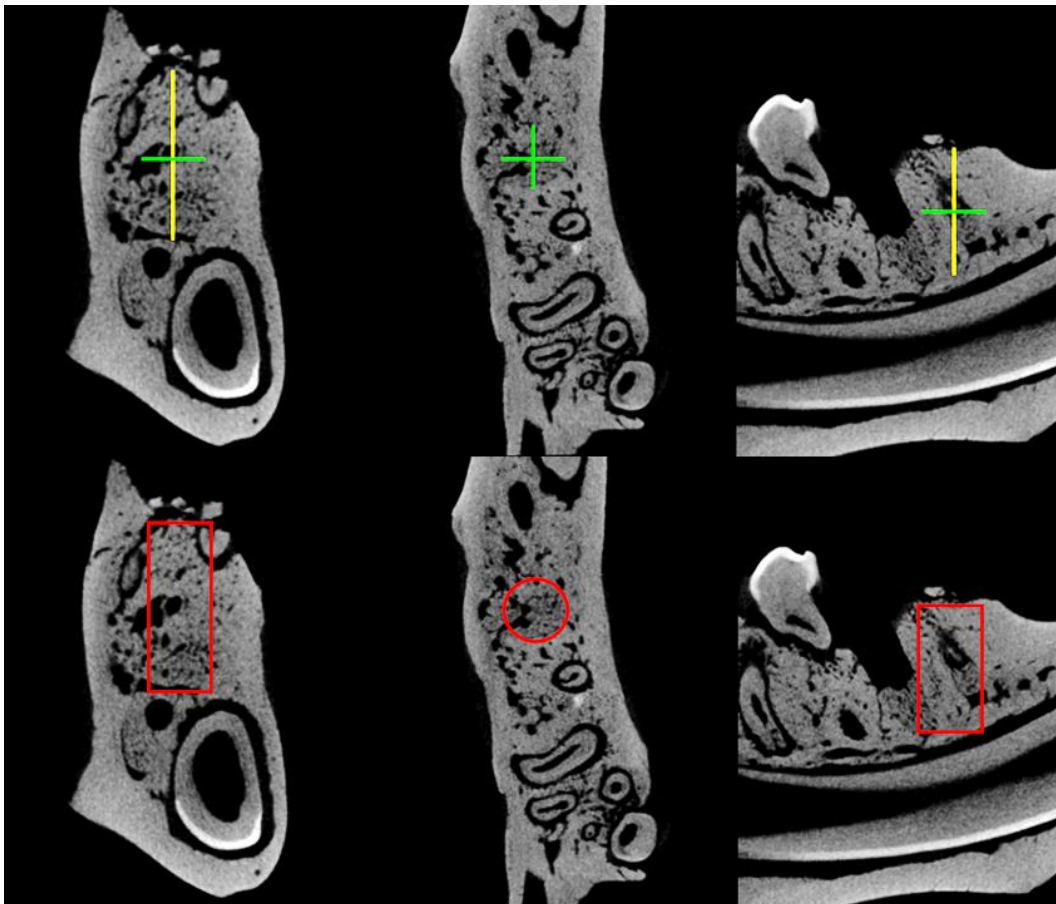


Figura 9. Representação gráfica da ADI nos planos coronal, axial e sagital. Em amarelo comprimento coroa-ápice (3mm), em verde diâmetro (1mm) e em vermelho delimitação do cilindro.

4.7. Processamento Histológico

- *Fixação dos tecidos*

Imediatamente após a eutanásia e exame físico, cada mandíbula foi acondicionada em um pote plástico com capacidade de 50mL identificado pelo grupo e código do animal correspondente. A amostra ficou imersa em 40mL de solução fixadora – Paraformaldeído tamponado 10% (PFA 10%) com pH 7,4 e molaridade 0,1Molar (0,1M) – tampão fosfato. Os potes foram tampados e

mantidos em temperatura ambiente, deixando as amostras em solução fixadora por 72 horas (49).

- *Descalcificação*

As hemimandíbulas já fixadas foram imersas em solução desmineralizadora de ácido nítrico em paraformaldeído 37% e água destilada (proporções 1:1:8 – ácido nítrico 10%) trocada a cada 02 dias durante 07 dias, em tubos Falcon de 50mL identificados com os grupos e códigos dos respectivos animais. A confirmação da desmineralização foi confirmada quando os espécimes estiverem com consistência borrachoide e pouca resistência à flexão, assim como por meio da inserção de uma agulha através da peça (a agulha atravessará facilmente após a completa desmineralização). Após isso, as áreas dos alvéolos dos primeiros molares inferiores esquerdos foram clivadas na mesial e distal e colocadas em cassetes histológicos identificados com o grupo e código do respectivo animal. Os cassetes foram colocados em um béquer para lavagem, com tampão fosfato-salino 0,01M (PBS 1x) pH 7,4 durante três dias, com troca diária da solução.

Após a lavagem, as amostras passaram por processamento histológico com desidratação em banhos de soluções com concentrações ascendentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e absoluto), clarificadas em xilol, impregnadas em banhos de parafina a uma temperatura máxima de 60°C e incluídas em parafina em moldes para inclusão.

Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo em cortes coronais de espessura 4µm (micrômetros). Após isso, o seguinte método histoquímico foi utilizado (Quadro 4):

Quadro 4. Corantes histoquímicos utilizados e suas principais aplicações

Corante	Objetivo
Hematoxilina-Eosina	Observar células e componentes estruturais
Tricrômico de Mason	Observar matriz extracelular e fibras
Ácido Periódico de Schiff	Observar açúcares neutros, dentre eles: proteoglicanos e glicosaminoglicanos

4.8. Análise Histológica em Microscopia de Luz

Os cortes foram observados e analisados em microscópio de luz modelo Eclipse Ci-L (Nikon, Tóquio, Japão). Foram realizadas avaliação e registro fotográfico por meio da microcâmera DS-Ri2 (Nikon, Tóquio, Japão) e do software NIS-elements D (Nikon, Tóquio, Japão). Os cortes foram avaliados qualitativamente de acordo com os escores de Statkievicz (19), que tem como resultado o escore que obteve mais amostras referidas a ele, em cada parâmetro avaliado (Anexo 3).

4.9. Análise Imuno-histoquímica

As amostras submetidas à reação imuno-histoquímica foram reativadas com solução Trilogy em panela pressurizada Pascal (DakoCytomation, Dinamarca), seguido do bloqueio da peroxidase endógena por 30 minutos. Após isso, foi realizado o bloqueio de proteínas específicas e posto o anticorpo monoclonal para o antígeno NF- κ B (1:100, CLOUDE-ONE, USA). A seguir, adicionou-se o anticorpo secundário biotilado (anticorpo biotilado de cabra anti-coelho e anti-camundongo na diluição de 1/100 (DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase – K0675)). A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzidina (DAB) a 0,024% e contra-corada em hematoxilina de Harris.

4.10. Análise Histomorfométrica

Os cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (H&E) ou pelo tricrômico de Masson foram visualizados em objetiva de 40X e digitalizadas 20 imagens aleatórias por meio do mesmo microscópio e microcâmera, perfazendo uma área total de 281.872 μm^2 de parênquima ósseo, analisados em cada tipo de reação.

Para o cálculo da área de necrose óssea, um corte histológico corado pela H&E de cada caso foi visualizado através da objetiva de 40X do microscópio para a digitalização de 20 áreas aleatórias através da microcâmera. Todo o interstício foi excluído da análise utilizando ferramentas do programa. Todos os tipos de pixels das lesões envolvidas foram selecionados para a criação de uma imagem binária e cálculo da área em μm^2 .

A área da matriz extracelular foi calculada por meio de algoritmos construídos no software. Em cada imagem foram selecionados todos os pixels com tons de azul (tricroômico de Masson) para a criação de uma imagem binária, processamento digital e cálculo da área em μm^2 .

4.11. Análise Estatística

Os dados obtidos estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e, foram analisados com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc, Califórnia, EUA). Inicialmente foi realizada uma estatística descritiva dos dados, sendo calculados os valores máximos e mínimos, a amplitude, além da média e o desvio padrão.

Os dados das análises macroscópica e histomorfométrica foram tabulados e analisados por meio da análise de variância (ANOVA) “one way” e pós-teste de *Tukey*, com nível de significância estatística de 5% ($p < 0.05$) para estabelecer as diferenças encontradas entre os grupos experimentais.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação macroscópica

Os animais do grupo controle negativo (A), apresentaram após exodontia a presença de tecido claro, liso e homogêneo sobre a superfície da região de exodontia, compatível com gengiva saudável (seta amarela). No entanto, os animais do grupo controle positivo (B), apresentaram ausência de revestimento epitelial na região de extração dentária. Tendo nessa região a presença de uma área macroscopicamente amarelada compatível com osso exposto (seta azul). Já os animais pertencentes aos demais grupos experimentais, ONE+PS (C), ONE+PBM (D) e ONE+aPDT (E), apresentaram o mesmo padrão macroscópico do grupo controle negativo, a presença de um tecido liso, claro e homogêneo sobre a superfície lesionada, compatível à gengiva saudável (seta amarela) (Figura 10).

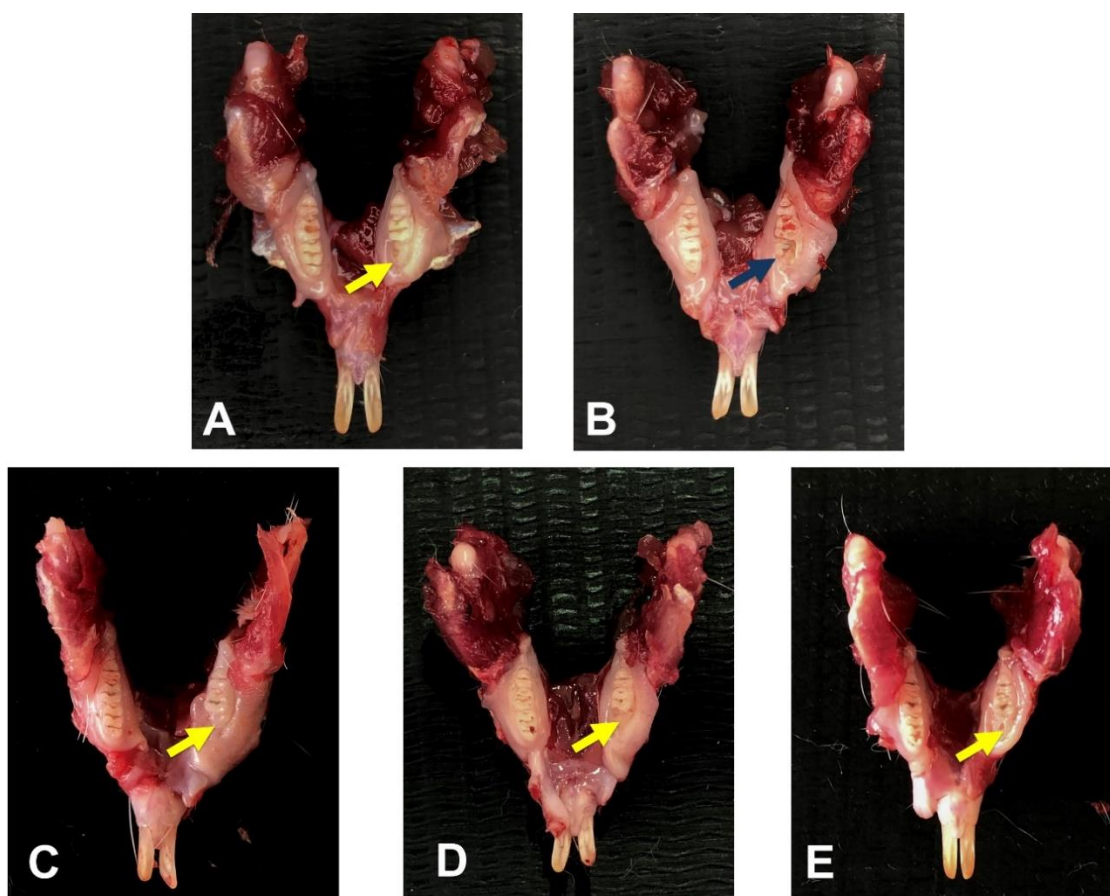


Figura 10. Macroscopia representativa das mandíbulas dissecadas dos animais por grupo. Seta amarela, região com tecido gengival revestindo a região alveolar. Seta azul, região de osso exposto. A. Controle negativo. B. Controle Positivo. C. ONE+PS. D. ONE+PBM. E. ONE+aPDT.

5.2. Descrição da densidade óssea em μ CT

O grupo CP apresentou o menor valor de BV/TV em comparação aos demais grupos. Enquanto que os grupos experimentais ONE+PS, ONE+PBM e ONE+aPDT apresentaram valores de BV/TV maiores que o grupo CN, destacando o grupo ONE+PBM que teve o maior percentual de BV/TV entre os grupos. O grupo CN apresentou maior valor de Tb.N e menor valor de Tb.Th em comparação aos demais grupos. Quanto à Tb.Sp, o grupo que apresentou o menor valor foi o ONE+PBM (Tabela 1 e Figura 11).

Tabela 1. Descrição dos valores de fração de volume ósseo, número, espessura e separação de trabéculas entre os grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos				
	CP	CN	ONE+PS	ONE+PBM	ONE+aPDT
BV/TV %	64,47725	71,49150	75,00740	88,00202	73,82791
Tb.N mm	2,77179	3,28502	2,41746	3,05122	2,51081
Tb.Th mm	0,23262	0,21763	0,31027	0,28842	0,29404
Tb.Sp mm	0,33161	0,20676	0,23819	0,11211	0,22704

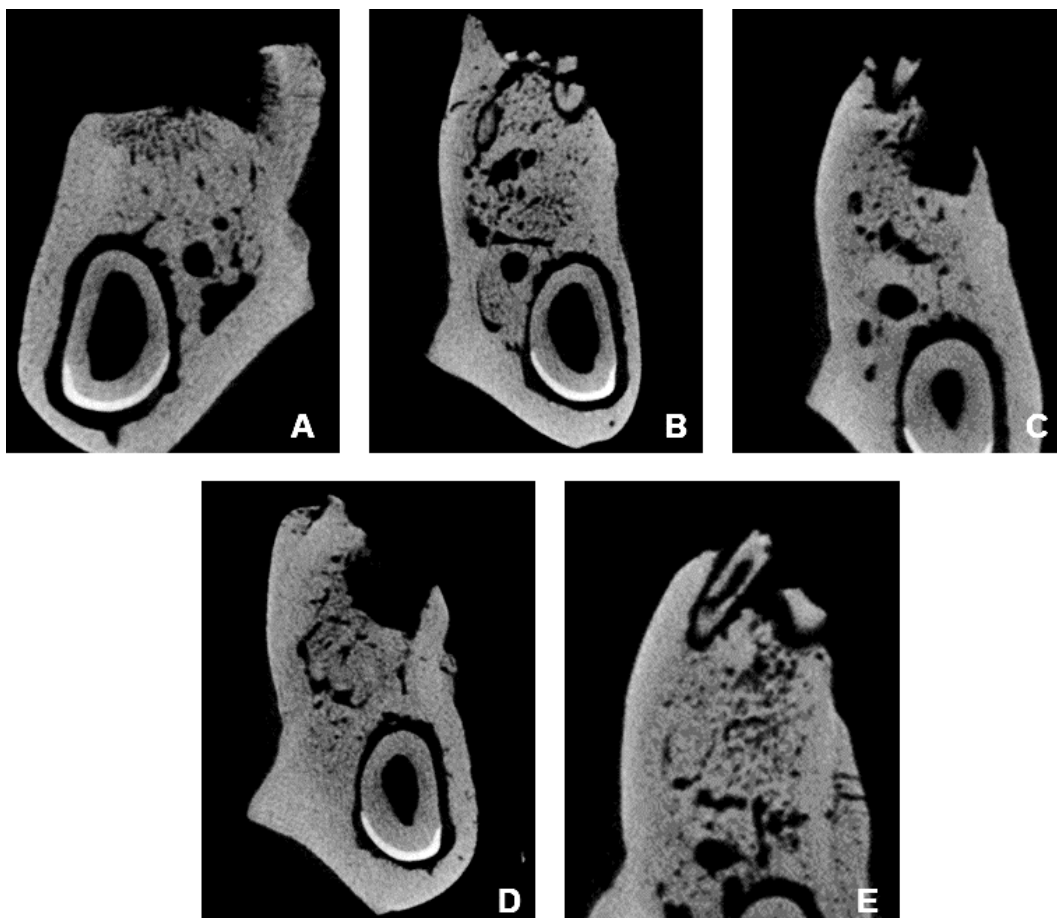


Figura 11. Corte coronal das mandíbulas apresentando ADI dos alvéolos tratados em todas as condições experimentais. A. CN. B. CP. C. ONE+PS. D. ONE+PBM. E. ONE+aPDT.

5.3. Avaliações Histológica e Histomorfométrica da Matriz Extracelular

Os animais do grupo controle negativo (A), apresentaram histologicamente presença de tecido conjuntivo, em especial fibras colágenas, evidenciado em azul, pela coloração do Tricrômico de Masson, exibindo fibras de aspecto homogêneo e de distribuição difusa (seta preta). Entretanto, os animais do grupo controle positivo (B), evidenciaram fibras de aspecto heterogêneo e de distribuição focal (seta vermelha). Já os animais dos grupos ONE+PS (C), ONE+PBM (D) ou ONE+aPDT, apresentaram fibras de aspecto semelhantes aos animais do grupo controle negativo (setas pretas) (Figura 12).

Os animais do grupo controle negativo (A), apresentaram histologicamente presença de proteoglicanos com glicosaminoglicanos sulfatados, evidenciado pela reação histoquímica pelo ácido periódico de *Schiff* - PAS, exibindo componentes em aspecto de linha enegrecida próximo dos osteócitos mais jovens com distribuição difusa (seta preta). Entretanto, os animais do grupo controle positivo (B), evidenciaram componentes em aspecto de linha enegrecida próximo dos osteócitos mais jovens com distribuição pontual e focal (seta vermelha). Já os animais dos grupos ONE+PS (C), ONE+PBM (D) ou ONE+aPDT (E) apresentaram esses componentes em aspecto e distribuição semelhantes aos animais do grupo controle negativo (setas pretas) (Figura 13).

A área de marcação observada na reação histoquímica pelo tricrômio de Masson foi avaliada e documentada na figura 14 que representa a análise morfométrica através do uso deste corante em todas as condições experimentais.

Os animais do grupo controle negativo, apresentam grandes regiões de intensa deposição de matriz extracelular colanogênica. No entanto os animais do grupo controle positivo apresentam poucas regiões de deposição de matriz extracelular. Já os animais submetidos as demais condições experimentais ONE+PS, ONE+PBM ou ONE+aPDT apresentam aumento da deposição de matriz extracelular quando comparada aos animais do grupo controle positivo (Figura 14).

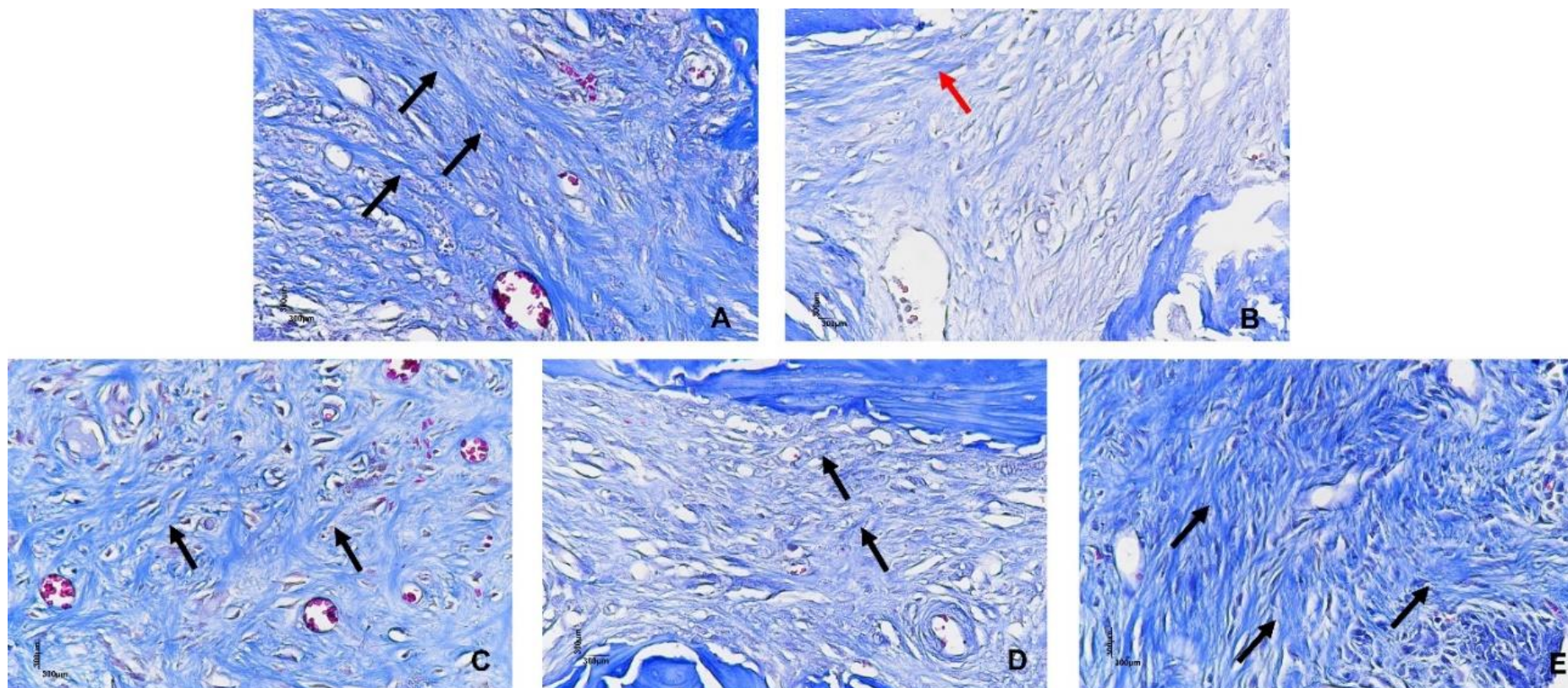


Figura 12. Corte histológico de mandíbulas coradas em Tricrômico de Masson, evidenciado o tecido de granulação. A. CN. B. CP. C. ONE+PS. D. ONE+PDT. E. ONE+aPDT. Seta preta: matriz extracelular com fibras de aspecto homogêneo e distribuição difusa. Seta vermelha: matriz extracelular com fibras de aspecto heterogêneo e de distribuição focal. Magnificação: 40x; Escala: 300µm.

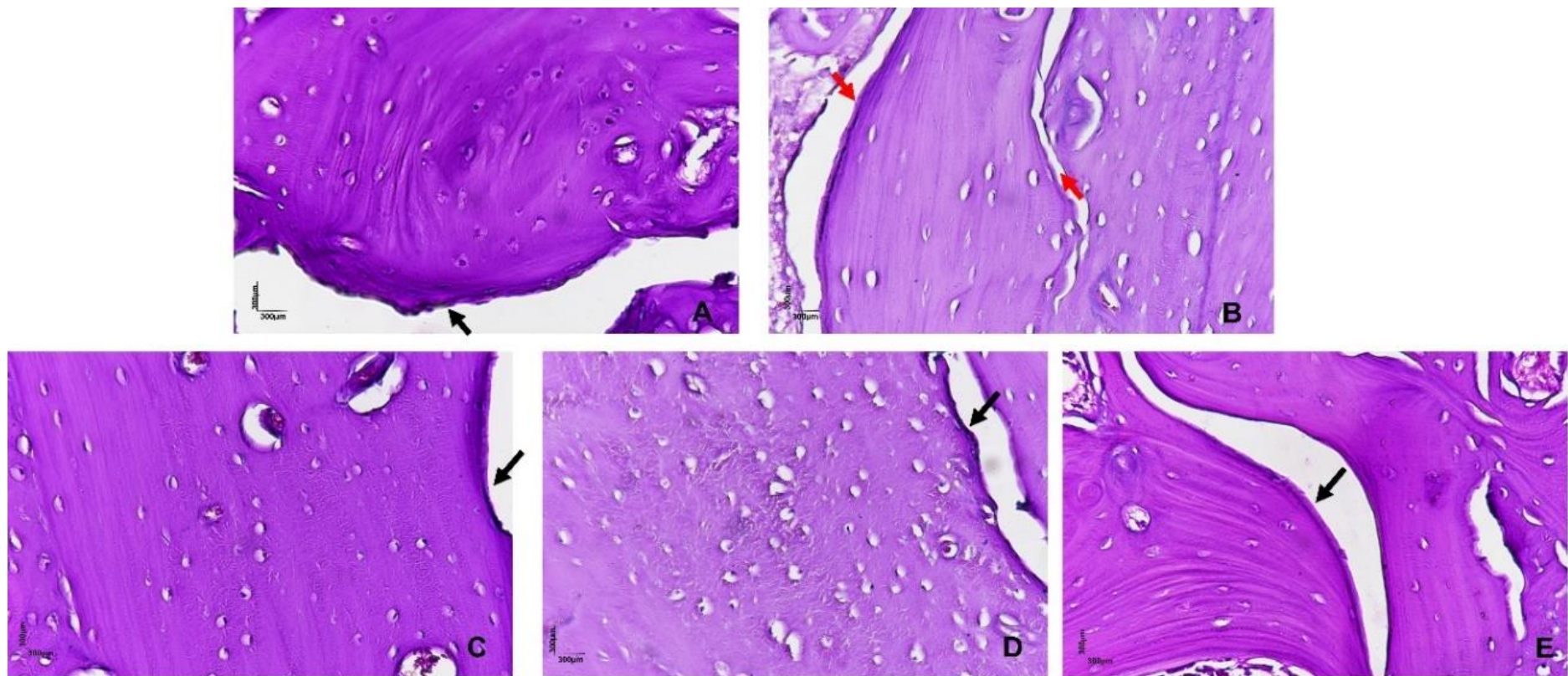


Figura 13. Corte histológico de mandíbulas coradas pelo ácido periódico de Schiff - PAS, evidenciado proteoglicanos com glicosaminoglicanos sulfatados. A. CN. B. CP. C. ONE+PS. D. ONE+PBM. E. ONE+aPDT. Seta preta: proteoglicanos e glicosaminoglicanos sulfatados em aspecto linha enegrecida próximo dos osteócitos mais jovens com de distribuição difusa. Seta vermelha: proteoglicanos e glicosaminoglicanos sulfatados em aspecto linha enegrecida próximo dos osteócitos mais jovens com de distribuição pontual e focal. Magnificação: 40x; Escala: 300µm.

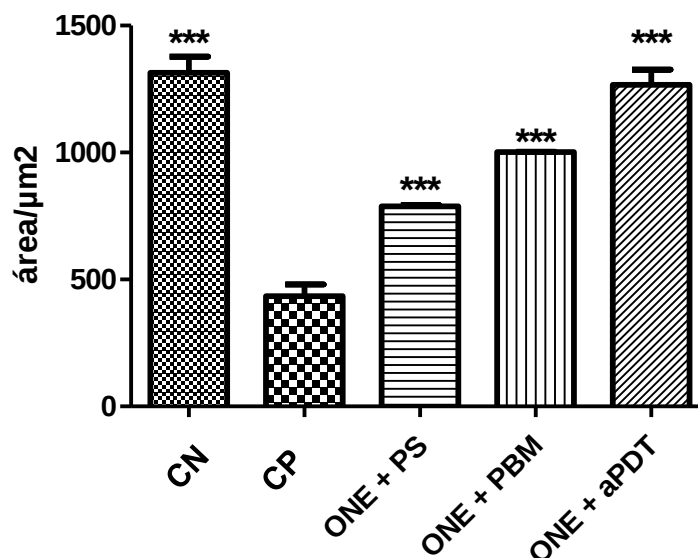


Figura 14. Análise morfométrica da área de deposição de matriz extracelular nas diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média $\pm$ erro padrão da média, com n de 5 animais para cada grupo. ***p<0,001 quando comparado ao grupo controle positivo. ANOVA “one-way” seguido do teste de *Tukey*.

5.4. Avaliações Histológica e Histomorfométrica do Efeito da aPDT

Os efeitos da terapia fotodinâmica foram analisados no tecido ósseo, onde foi observado que os animais do grupo controle negativo (A) tiveram os osteócitos preservados, nucleados (seta amarela) com tamanhos e formas homogêneos. Já os animais do grupo controle positivo (B), tiveram osteócitos anucleados (seta vermelha), de aspecto tumefeitos e por vezes granulosos (B). No entanto, os animais dos grupos ONE+PS (C) tiveram tanto osteócitos necróticos (anucleados), representados pelas setas vermelhas, quanto osteócitos preservados (seta amarela). Por fim, os animais dos grupos ONE+PBM (D) e ONE+aPDT (E) tiveram osteócitos em conformidade histológica compatível com os do grupo controle negativo (Figura 15).

A fim de correlacionar o achado qualitativo feito no escore, em especial, a área de necrose tecidual (osteonecrose), a qual se faz como o principal achado histológico característico desse modelo experimental, realizou-se a medição da área de osteonecrose por grupo. A figura 16 representa a análise morfométrica de

osteonecrose por condição experimental. Os animais do grupo controle negativo, não apresentam regiões de osteonecrose. No entanto os animais do grupo controle positivo apresentam extensas regiões de osteonecrose. Já os animais do grupo ONE+PS, ONE+PBM ou ONE+aPDT apresentam uma redução da região de osteonecrose quando comparada aos animais do grupo controle positivo.

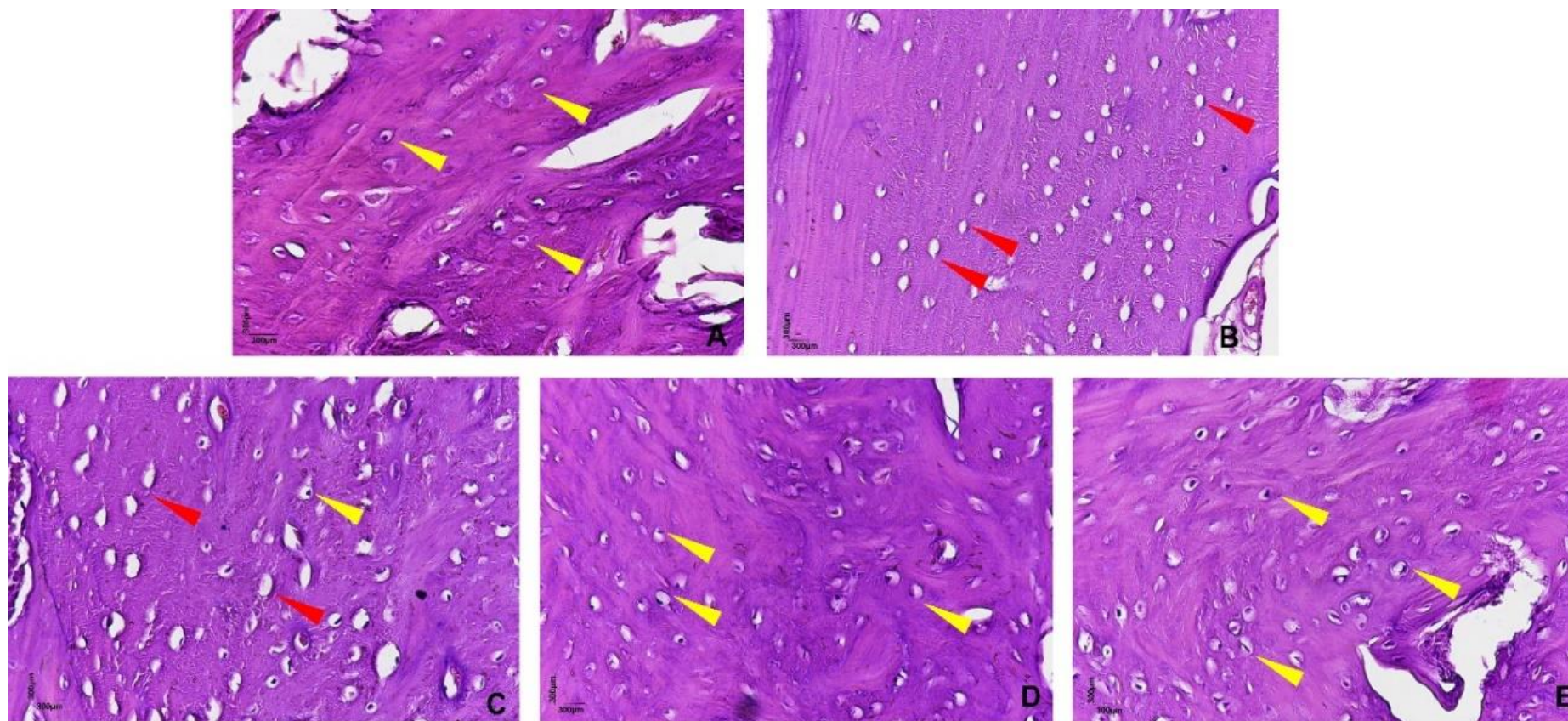


Figura 15. Corte histológico de mandíbulas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE), evidenciando o tecido ósseo. A. CN. B. CP. C. ONE+PS. D. ONE+PBM. E. ONE+aPDT. Seta amarela: osteócito nucleado. Seta vermelha: osteócito anucleado. Magnificação: 40x; Escala: 300µm.

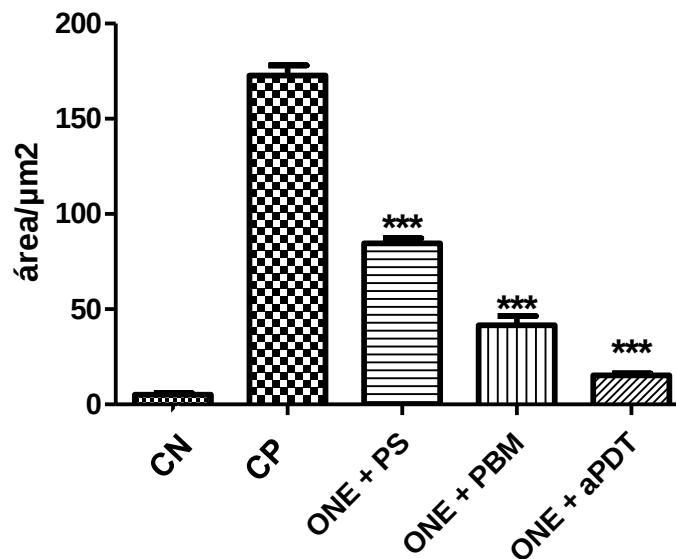


Figura 16. Análise morfométrica da área de osteonecrose nas diferentes condições experimentais. Os resultados são exibidos como média $\pm$ erro padrão da média, com n de 5 animais para cada grupo. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle positivo. ANOVA “one-way” seguido do teste de *Tukey*.

5.4. Avaliação Imuno-histoquímica para NF-kB

Os animais de todos os grupos experimentais, apresentaram histologicamente presença de tecido conjuntivo com região de tecido ósseo com marcações marrom-acastanhadas que significam a positividade da reação imuno-histoquímica contra o NF-kB.

Os animais do grupo controle negativo, tiveram uma marcação focal apenas em células e tecido de granulação (cabeça de seta preta). No entanto, os animais do grupo controle positivo, tiveram marcações multifocais e em múltiplas regiões do tecido, em especial em regiões ricas em tecido de granulação (cabeça de seta vermelha). Já os animais pertencentes aos grupos ONE+PS (C) e ONE+PBM (D) tiveram marcações imuno-histoquímicas semelhantes às do grupo controle negativo. Os animais do grupo ONE+aPDT (E), tiveram marcações multifocais em regiões ricas em tecido de granulação (cabeça da seta verde) (Figura 17).

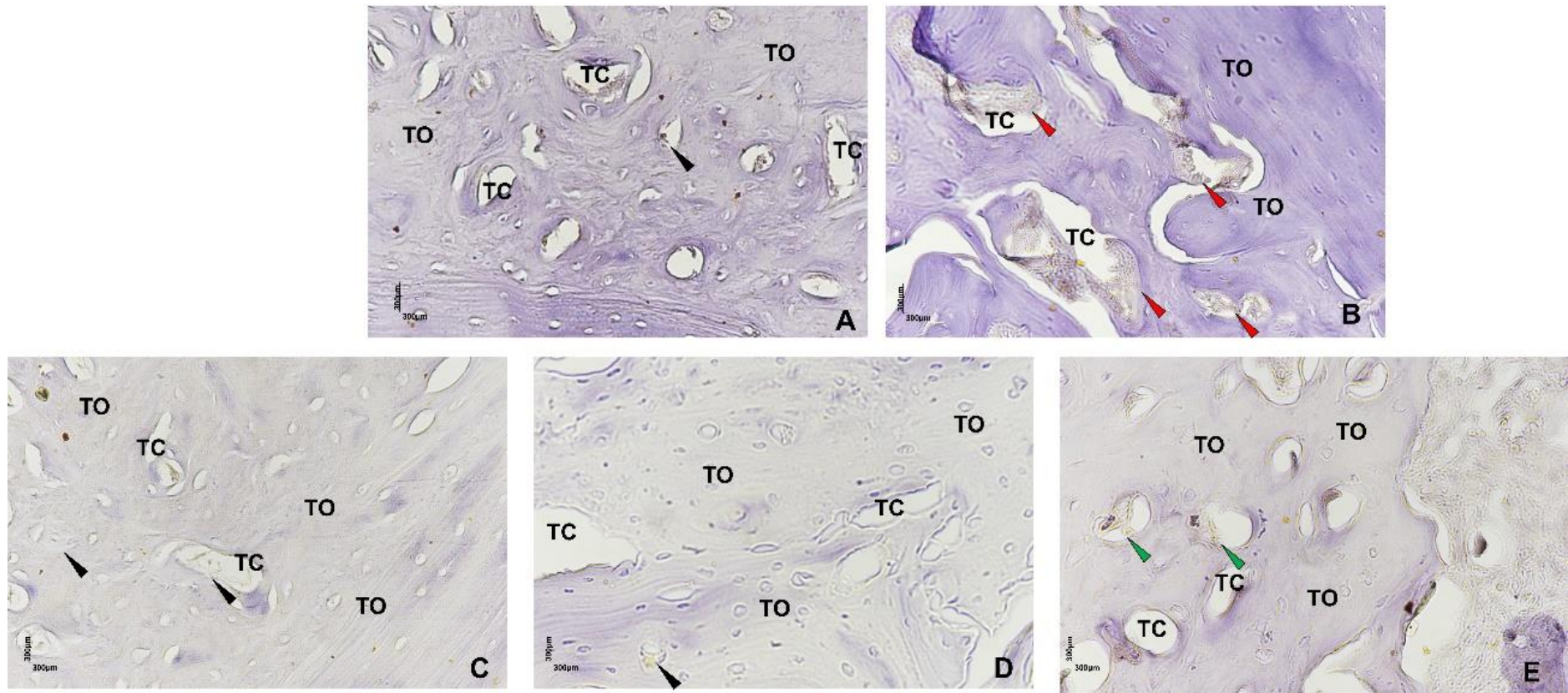


Figura 17. Corte histológico de mandíbulas em reação imuno-histoquímica contra NF-kB contra coradas em Hematoxilina. A. CN. B. CP. C. ONE+PS. D. ONE+PBM. E. ONE + aPDT. TC. Tecido conjuntivo. TO. Tecido ósseo. Cabeça de seta vermelha: marcação positiva para o NF-kB nas lacunas de conjuntivo. Cabeça de seta preta: marcação positiva para o NF-kB no Tecido Conjuntivo. Cabeça de seta verde: marcação positiva para o NF-kB no Tecido Conjuntivo. Magnificação: 40x; Escala: 300µm.

5.5. Avaliação qualitativa das lesões em microscopia de luz

As alterações histológicas foram agrupadas de acordo com o parâmetro histopatológico evidenciado, como mostrado abaixo:

Tabela 2. Análise histopatológica de cada parâmetro por grupo experimental

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA					
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	NÚMERO DE ESPÉCIMES				
	GRUPOS EXPERIMENTAIS				
	CN	CP	ONE+PS	ONE + PBM	ONE + aPDT
INTENSIDADE DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL					
(1) ausência de inflamação	4	-	2	4	4
(2) discreta quantidade de células inflamatórias	1	-	2	1	1
(3) moderada quantidade de células inflamatórias	-	1	1	-	-
(4) severa/intensa quantidade de células inflamatórias	-	4	-	-	-
Media:	1†	4	1†	1†	1†
EXTENSÃO DA INFLAMAÇÃO					
(1) ausência de inflamação	5	-	-	4	4
(2) extensão parcial do tecido conjuntivo	-	-	5	1	1
(3) extensão total do tecido conjuntivo, sem atingir o tecido ósseo	-	-	-	-	-
(4) extensão total do tecido conjuntivo e tecido ósseo	-	5	-	-	-
Media:	1†	4	2†	1†	1†
PADRÃO CELULAR E ESTRUTURA DO TECIDO CONJUNTIVO					
(1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade fibras colágenas	5	-	-	5	5
(2) moderada quantidade de fibroblastos e fibras colágenas	-	-	3	-	-
(3) pequena quantidade de fibroblastos e fibras colágenas	-	-	2	-	-
(4) severa desorganização tecidual com áreas de necrose	-	5	-	-	-
Media:	1†	4	3	1†	1†
PADRÃO CELULAR E ESTRUTURA DO TECIDO ÓSSEO					
(1) osso vivo, com padrão funcional trabecular	5	-	-	5	5
(2) presença de áreas focais de osteonecrose	-	-	4	-	-
(3) presença de áreas multifocais de osteonecrose	-	-	1	-	-
(4) presença de osteonecrose difusa e intensa	-	5	-	-	-
Media:	1†	4	2†	1†	1†

Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao C+.

6. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a efetividade da aPDT no tratamento da ONMRM em modelo murino. Para isso, foi adaptado o modelo experimental de indução de ON em ratos proposto por Bigueti et al (49), que induziu lesões de ON em animais da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) quando expostos ao AZ 250µg/Kg durante 07 semanas (49). Observou-se que a aPDT minimiza os efeitos negativos do AZ nos tecidos mole e duro do local da exodontia modulando o reparo tecidual e enquadrando-se como potencial tratamento da ONMB.

Diferentes métodos morfológicos são utilizados para auxiliar na avaliação do reparo ósseo, como a histomorfometria e análises morfométricas em µCT por meio de reconstruções tridimensionais, com imagens em alta resolução. O µCT pode ser utilizado apenas na área de interesse para o estudo, focando em regiões específicas (alvéolo) de grandes estruturas (mandíbula de um rato). Por meio desta análise obtém-se dados quantitativos de parâmetros ósseos como fração de volume ósseo, número, espessura e separação das trabéculas ósseas (BV/TV, Tb.N, Tb.Th e Tb.Sp respectivamente) (53).

A avaliação dos valores absolutos destes parâmetros mostrou diminuição nos valores de BV/TV e Tb.N, e aumento dos valores de Tb.Th e Tb.Sp do grupo CP em comparação ao grupo CN. A diminuição da fração de volume ósseo representa diminuição da deposição deste tecido na estrutura avaliada, assim como a diminuição do número e o aumento da espessura e separação das trabéculas sugere redução da remodelação e maturação do osso (53). O que pode ser justificado pelo uso do AZ, que promove osteosclerose e o osso passa a apresentar estrutura menos complexa com trabéculas mais espessas, mais conectadas e espaços medulares reduzidos (54).

Nas três condições experimentais houve aumento da BV/TV e o grupo ONE+PBM foi o que apresentou maior valor absoluto. O grupo ONE+PBM apresentou maior Tb.N e menor Tb.Th e Tb.Sp entre os grupos experimentais. Isso demonstra que o tratamento da ON com a PBM promove o reparo e a deposição de novo tecido ósseo nos locais da exodontia assim como descrito no estudo de

Alves (53), indicando possível aumento da remodelação e maturação do osso nos sítios tratados.

A avaliação física das lesões apresentou completo revestimento epitelial sobre o alvéolo nos grupos controle negativo, ONE+PS, ONE+PBM e ONE+aPDT, nos quais as fibras da MEC apresentaram aspecto homogêneo e distribuição difusa. Já no grupo controle positivo o osso permaneceu exposto clinicamente e as fibras da MEC apresentaram aspecto heterogêneo com distribuição focal. Além disso, a área de deposição de MEC foi significativamente maior nos grupos experimentais e controle negativo em comparação ao controle positivo. Isso se deu, pois a exposição ao AZ está relacionada com diminuição da migração e proliferação de células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, e prejudica a expressão de fator de crescimento do endotélio vascular (VGEF) diminuindo a vascularização (55). Neste caso a homeostase dos tecidos lesionados foi comprometida, dificultando o reparo de feridas por diminuição da vascularização e inflamação, favorecendo a progressão da ON (55-57).

Alterações na distribuição de proteoglicanos e glicosaminoglicanos sulfatados foram observadas entre os grupos. No controle positivo a distribuição foi pontual e focal o que pode justificar a diminuição da migração e proliferação celular. Nos demais grupos a distribuição dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos foi difusa, sendo um aspecto positivo para o reparo das feridas, visto que a presença destes carboidratos está relacionada com o aumento da atividade metabólica (58).

A presença de 05 a 10 lacunas de osteócitos vazias e grande área de necrose no grupo controle positivo podem ser justificadas pela falta ou diminuição da ativação de fatores de crescimento e diferenciação BMP, IGF-1 e -2 que estimulam a diferenciação de osteoblastos e a secreção de matriz óssea. Esses fatores são expressos por ação dos osteoclastos em contato com o osso no processo de remodelamento. No entanto, estas células são comprometidas pelo uso do AZ, o qual impede a expressão do RANK pelas células precursoras dos osteoclastos e inibe a ligação ao RANKL expresso pelos osteoblastos, necessária para a osteoclastogênese e regulação do remodelamento ósseo (59,60). Estes eventos

moleculares ocasionam a diminuição da deposição de nova matriz óssea, impedindo o reparo e manutenção deste tecido (25).

O uso crônico do AZ também aumenta o número de células inflamatórias e a produção de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β), que são associados à progressão da ONMB (61). Estas citocinas atuam na quimiotaxia de neutrófilos, aumentando sua quantidade e provocando maior dano local por meio da produção de ERO (61). A depender da dose do AZ, pode ocorrer a morte dos neutrófilos, o que também libera ERO que vão contribuir no aumento do estresse oxidativo (62). Por meio do aumento do estresse oxidativo é ativada a via inflamatória do NF-kB (45).

Na análise imuno-histoquímica observou-se maior distribuição e marcação contra o NF-kB no grupo controle positivo em comparação aos demais grupos experimentais, confirmando a presença de um processo inflamatório ativo mediado por esta proteína. O NF-kB regula a expressão de genes relacionados à inflamação crônica como o TNF- α , IL-1 β e interleucina-6 (IL-6), sendo os dois primeiros responsáveis pela cronicidade da inflamação, pois recrutam e ativam neutrófilos, e promovem a expressão de mais NF-kB, retroalimentando a transcrição de citocinas inflamatórias por esta via (63). A diminuição da marcação contra NF-kB para as demais condições experimentais e a presença de osteócitos nucleados, especialmente nos grupos ONE+PBM e ONE+aPDT, deu-se pelo uso da aPDT, que diminuiu o estresse oxidativo promovido pelos neutrófilos e o processo inflamatório nas lesões experimentais de ON, reparando-as.

Nos grupos ONE+PBM e ONE+aPDT foi observada reepitelização dos alvéolos, que pode ser justificada pelo estágio inicial da ONMRM nos animais, o que favoreceu a bioestimulação dos tecidos. Ainda houve diminuição da área de osso necrótico, aumento da deposição de matriz extracelular e preservação de osteócitos nucleados em comparação ao grupo controle positivo. Esse resultado foi possível pela utilização da PBM, que sobre alvéolos que passaram por exodontia em indivíduos saudáveis aumenta a atividade de osteoblastos, acelerando a

deposição de nova matriz óssea e promove melhor cicatrização do epitélio (64). Estes efeitos também são descritos sobre lesões de ON (46,65).

O grupo ONE+aPDT apresentou a menor área de necrose óssea em comparação ao grupo controle positivo e a maior área de deposição de matriz extracelular, com fibras de aspecto homogêneo e distribuição difusa, e padrão celular semelhante ao controle negativo. Estes resultados estão de acordo com os efeitos esperados da aPDT, que une a PBM com uma ação antimicrobiana promovida pelo uso de um PS seletivo para células microbianas e sensível ao comprimento de onda de luz utilizado na irradiação. Esta terapêutica é apresentada como eficaz no tratamento de lesões de ON pois diminui ou previne a infecção, media a resposta inflamatória e estimula angiogênese, proliferação, migração e diferenciação celulares (13,46,66).

De acordo com os parâmetros histopatológicos avaliados: intensidade da resposta inflamatória local, extensão da inflamação, padrão celular e estrutura do tecido conjuntivo e padrão celular e estrutura do tecido ósseo, os grupos ONE+PBM e ONE+aPDT não apresentaram diferenças do grupo controle negativo. No entanto o grupo ONE+PS diferiu no padrão celular e estrutura do tecido conjuntivo, e ainda apresentou áreas focais e multifocais de ON no tecido ósseo. Este resultado mostra que o PS sozinho não influencia no reparo ósseo, sendo necessária sua irradiação com luz no comprimento de onda adequado, mesmo tendo apresentado reepitelização clínica do alvéolo e ausência ou diminuição da inflamação no tecido conjuntivo.

A PBM e aPDT são descritas separadamente como possibilidade terapêutica para lesões de ONMB (13,46,65,66) sendo escassos estudos comparando as duas propostas. Neste trabalho observou-se que os dois tratamentos apresentaram efeitos positivos sobre os sítios das exodontias, como a diminuição da área de necrose óssea, aumento da área de matriz extracelular e diminuição da inflamação representada pela baixa marcação do NF- κ B nos grupos ONE+PBM e ONE+aPDT. Essas características confirmam que a PBM e aPDT são efetivas para o tratamento das lesões de ON. Deve-se destacar o uso da aPDT por ser o grupo que mais

diminuiu a área de necrose óssea e teve maior aumento na produção de matriz extracelular, influenciado pelo uso do Azul de Metileno como PS.

7. CONCLUSÃO

O uso da PBM e aPDT no tratamento de lesões experimentais de ONMB foi efetivo para os reparos ósseo e epitelial, sendo a aPDT responsável pela maior redução da ON, aumento de matriz extracelular e diminuição da inflamação mediada pela via do NF-kB nas regiões de irradiação.

8. REFERÊNCIAS*

1. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O'Ryan F; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Oct;72(10):1938-56.
2. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(9):1115-1117.
3. Corral-Gudino L, Tan AJ, Del Pino-Montes J, Ralston SH. Bisphosphonates for Paget's disease of bone in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Dec 1;12(12):CD004956.
4. O'Carrigan B, Wong MH, Willson ML, Stockler MR, Pavlakis N, Goodwin A. Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Oct 30;10(10):CD003474.
5. Poli PP, Souza FÁ, Maiorana C. Adjunctive use of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaws: A case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Sep;23:99-101.
6. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res*. 2015;30(1):3-23.
7. Coxon FP, Thompson K, Roelofs AJ, Ebetino FH, Rogers MJ. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone*. 2008;42(5):848-860.
8. da Silva Santos PS, Oliveira MA, Felix VB. BISPHOSPHONATE-INDUCED MAXILLOFACIAL OSTEONECROSIS IN OSTEOPOROTIC INDIVIDUALS. *Rev Bras Ortop*. 2011;46(5):495-499.
9. Wen D, Qing L, Harrison G, Golub E, Akintoye SO. Anatomic site variability in rat skeletal uptake and desorption of fluorescently labeled bisphosphonate. *Oral Dis*. 2011;17(4):427-432.
10. Cremers S, Drake MT, Ebetino FH, Bilezikian JP, Russell RGG. Pharmacology of bisphosphonates. *Br J Clin Pharmacol*. 2019;85(6):1052-1062.

11. Anesi A, Generali L, Sandoni L, Pozzi S, Grande A. From Osteoclast Differentiation to Osteonecrosis of the Jaw: Molecular and Clinical Insights. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):4925.
12. Fliefel R, Tröltzsch M, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(5):568-585.
13. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone.* 2019;120:101-113.
14. Wainwright M, Maisch T, Nonell S, et al. Photoantimicrobials-are we afraid of the light?. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(2):e49-e55.
15. Raab O. Über die Wirkung fluoreszcierender Stoffe aus Infusorien. *Z Biol.* 1900;39:524.
16. Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Phys.* 2016;26(12):123001.
17. Arany PR. Craniofacial Wound Healing with Photobiomodulation Therapy: New Insights and Current Challenges. *J Dent Res.* 2016;95(9):977-984.
18. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2016;22(3):7000417.
19. Statkiewicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2018;184:7-17.
20. Rupel K, Ottaviani G, Gobbo M, et al. A systematic review of therapeutical approaches in bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Oncol.* 2014;50(11):1049-1057.
21. Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;143(1):31-48.

22. Nakashima T, Takayanagi H. Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems. *J Clin Immunol*. 2009;29(5):555-567.
23. Grabowski P. Physiology of Bone. *Endocr Dev*. 2015;28:33-55.
24. König HE, Liebich, HG. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. 6. ed. Porto Alegre:Artmed;2016.
25. Marx RE. Bone and bone graft healing. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2007;19(4):455-v.
26. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. Vitamin D endocrine system and osteoclasts [published correction appears in *Bonekey Rep*. 2014;3:522. Udagawa, Naoyuki [corrected to Udagawa, Nobuyuki]]. *Bonekey Rep*. 2014;3:495. Published 2014 Feb 5.
27. Okamoto K, Takayanagi H. Osteoimmunology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(1):a031245.
28. Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature*. 2000;408(6812):535-536.
29. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)*. 2016;31(3):233-245.
30. Dar HY, Azam Z, Anupam R, Mondal RK, Srivastava RK. Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018;23:464-492.
31. Donoghue AM. Bisphosphonates and osteonecrosis: analogy to phossy jaw. *Medical Journal of Australia*. 2005;183(3):163–164.
32. Hellstein JW, Fielding C. Bisphosphonate Osteochemonecrosis: Clinical Findings and Treatment Theories May Relate to a Possible Analogy with “Phossy” Jaw. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2005;100(2):189–190.
33. Hellstein JW, Marek CL. Bisphosphonate Osteochemonecrosis (Bis-Phossy Jaw): Is This Phossy Jaw of the 21st Century? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2005;63(5):682–689.

34. Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(4):433-441.
35. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. *Aust Endod J.* 2009;35(3):119-130.
36. Brasileiro Filho G. Bogliolo, Patologia. 9 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan;2016.
37. Aghaloo TL, Cheong S, Bezouglaia O, et al. RANKL inhibitors induce osteonecrosis of the jaw in mice with periapical disease. *J Bone Miner Res.* 2014;29(4):843-854.
38. Williams DW, Lee C, Kim T, et al. Impaired bone resorption and woven bone formation are associated with development of osteonecrosis of the jaw-like lesions by bisphosphonate and anti-receptor activator of NF- κ B ligand antibody in mice. *Am J Pathol.* 2014;184(11):3084-3093.
39. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014;42(6):744-750.
40. Martelli SJR, Damian MF, Gomes APN, Schinestsck AR, Silva AER, Vasconcelos ACU. Comparison of effects of zoledronic acid and clodronate on the bone structure: imaginological and histomorphometrical study in vivo. *J Oral Pathol Med.* 2017;46(8):632-636.
41. Lombard T, Neirinckx V, Rogister B, Gilon Y, Wislet S. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: New Insights into Molecular Mechanisms and Cellular Therapeutic Approaches. *Stem Cells Int.* 2016;2016:8768162.
42. Hamadeh IS, Ngwa BA, Gong Y. Drug induced osteonecrosis of the jaw. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(5):455-464.
43. Kalhori KAM, Vahdatinia F, Jamalpour MR, et al. Photobiomodulation in Oral Medicine. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2019;37(12):837-861.
44. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(2):516-533.

45. Carroll JD, Milward MR, Cooper PR, Hadis M, Palin WM. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. *Dent Mater.* 2014;30(5):465-475.
46. Tartaroti NC, Marques MM, Naclério-Homem MDG, Migliorati CA, Zindel Deboni MC. Antimicrobial photodynamic and photobiomodulation adjuvant therapies for prevention and treatment of medication-related osteonecrosis of the jaws: Case series and long-term follow-up. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;29:101651.
47. Hu X, Huang YY, Wang Y, Wang X, Hamblin MR. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. *Front Microbiol.* 2018;9:1299.
48. Boltes Cecatto R, Siqueira de Magalhães L, Fernanda Setúbal Destro Rodrigues M, et al. Methylene blue mediated antimicrobial photodynamic therapy in clinical human studies: The state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;31:101828.
49. Bigueti CC, De Oliva AH, Healy K, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senescent female mice treated with zoledronic acid: Microtomographic, histological and immunohistochemical characterization. *PLoS One.* 2019;14(6):e0214173.
50. Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA. Resolução Normativa Nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/4030569/do1-2018-02-22-resolucao-normativa-n-37-de-15-de-fevereiro-de-2018-4030565 Acesso em: 16 mai. 2020.
51. Flecknell P. Laboratory animal anaesthesia. 3rd ed. United Kingdom:Academic Press;2009.
52. Buxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1468-86.
53. Alves FAM, Marques MM, Cavalcanti SCSXB, Pedroni ACF, Ferraz EP, Miniello TG, Moreira MS, Jerônimo T, Deboni MCZ, Lascale CA. Photobiomodulation as

- adjunctive therapy for guided bone regeneration. A microCT study in osteoporotic rat model. *J Photochem Photobiol B*. 2020 Dec;213:112053.
54. Soares MQS, Van Dessel J, Jacobs R, da Silva Santos PS, Cestari TM, Garlet GP, Duarte MAH, Imada TSN, Lambrechts I, Rubira-Bullen IRF. Zoledronic Acid Induces Site-Specific Structural Changes and Decreases Vascular Area in the Alveolar Bone. *J Oral Maxillofac Surg*. 2018 Sep;76(9):1893-1901.
 55. Alsalih A, Dam A, Lindberg P, Truedsson A. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws Initiated by Zoledronic Acid and Potential Pathophysiology. *Dent J (Basel)*. 2021;9(8):85.
 56. Kozutsumi R, Kuroshima S, Kaneko H, Sasaki M, Ishisaki A, Sawase T. Zoledronic Acid Deteriorates Soft and Hard Tissue Healing of Murine Tooth Extraction Sockets in a Dose-Dependent Manner [published online ahead of print, 2021 Aug 7]. *Calcif Tissue Int*. 2021;10.1007/s00223-021-00890-9.
 57. Wang RJ, Zhao QT, Yu YJ, Zhou YQ, Wang SY. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2021;56(7):679-686.
 58. de Campos Pessoa AL, de Oliveira Araújo VHV, Rosa Nascimento AL, Elias N, de Carvalho JJ. Phosphodiesterase-5 inhibition improves bone regeneration at the early stages of ischemic osteonecrosis of the femoral head in rats. *J Orthop Res*. 2021 Oct;39(10):2077-2082.
 59. Huang XL, Huang LY, Cheng YT, Li F, Zhou Q, Wu C, Shi QH, Guan ZZ, Liao J, Hong W. Zoledronic acid inhibits osteoclast differentiation and function through the regulation of NF- κ B and JNK signalling pathways. *Int J Mol Med*. 2019 Aug;44(2):582-592.
 60. He J, Zhou Q, Jia X, Zhou P, Chen L. Immune-related expression profiles of bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma. *Pharmazie*. 2021 Apr 1;76(4):159-164.
 61. de Barros Silva PG, Ferreira Junior AEC, de Oliveira CC, Brizeno LAC, Wong DVT, Lima Júnior RCP, Sousa FB, Mota MRL, Alves APNN. Chronic treatment with zoledronic acid increases inflammatory markers in periodontium of rats. *J Oral Pathol Med*. 2017 Nov;46(10):1046-1053.

62. Kuiper JW, Forster C, Sun C, Peel S, Glogauer M. Zoledronate and pamidronate depress neutrophil functions and survival in mice. *Br J Pharmacol.* 2012 Jan;165(2):532-9.
63. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: the pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997 Apr 10;336(15):1066-71. Koogan;2016.
64. Nica DF, Heredea ER, Todea DCM. Alveolus soft and bone tissue regeneration after laser biomodulation - a histological study. *Rom J Morphol Embryol.* 2019;60(4):1269-1273.
65. Vescovi P, Giovannacci I, Merigo E, et al. Tooth extractions in high-risk patients under bisphosphonate therapy and previously affected with osteonecrosis of the jaws: surgical protocol supported by low-level laser therapy. *J Craniofac Surg.* 2015;26(3):696-699.
66. Almeida MVDC, Moura AC, Santos L, Gominho L, Cavalcanti UDNT, Romeiro K. Photodynamic Therapy as an adjunct in the Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Case Report. *J Lasers Med Sci.* 2021;12:e12.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

9. ANEXOS

Anexo 1



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO DA OSTEONECROSE EM MODELO MURINO", protocolada sob o CEUA nº 5164120121 (ID 001279), sob a responsabilidade de **Adriano Francisco Alves e equipe; Jannerson Cesar Xavier de Pontes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 19/02/2021.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFICACY OF ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY IN THE TREATMENT OF OSTEONECROSIS IN A MURINE MODEL", utilizing 30 Heterogenics rats (30 females), protocol number CEUA 5164120121 (ID 001279), under the responsibility of **Adriano Francisco Alves and team; Jannerson Cesar Xavier de Pontes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 02/19/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2021** a **01/2022**

Área: **Fisiologia E Patologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **30 a 40 dias**

N: **30**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **180 a 200 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) e no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (LAFECC).

João Pessoa, 30 de setembro de 2021

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivã Carmem Talieri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Anexo 2



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



João Pessoa, 10 de dezembro de 2021
CEUA N 5164120121

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Adriano Francisco Alves
Área: Fisiologia E Patologia

Título da proposta: "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO DA OSTEONECROSE EM MODELO MURINO".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFPB (ID 000610)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Notificação (versão de 03/dezembro/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O projeto trata-se do desenvolvimento de osteonecrose em RATAS, no entanto, a unidade de produção animal IPEFARM passa por algumas dificuldades com as instalações e infra-estrutura. Inicialmente o projeto foi aprovado com o uso de ratas, no entanto, existem ratos disponíveis para o uso em tempo mais hábil que a obtenção das ratas. Pelo fato de não ter mudanças metodológicas quanto a mudança de sexo dos animais, solicito a mudança de sexo de ratas para ratos. ".

Comentário da CEUA: "PARECER CONSUBSTANCIADO DA NOTIFICAÇÃO PROTOCOLO Nº 5164120121 O pesquisador solicita uma alteração ao que se refere ao sexo do animal a ser utilizado. Inicialmente, o projeto aprovado foi para a utilização de ratas Wistar fêmeas e a solicitação é que possam ser utilizados ratos Wistar machos. Tendo em vista que a referida mudança não interferirá no protocolo já aprovado por esta Comissão, somos de parecer favorável a utilização de ratos Wistar machos. Gostaríamos de ressaltar que, caso seja necessário alterar a origem dos animais ao longo da execução do projeto, o pesquisador deve informar previamente a esta Comissão para deliberação. A Comissão".

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivia Carmem Talieri
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Anexo 3

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA					
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	NÚMERO DE ESPÉCIMES				
	GRUPOS EXPERIMENTAIS				
	C-	C+	ONE+PS	ONE + PBM	ONE + aPDT
INTENSIDADE DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL					
(1) ausência de inflamação					
(2) discreta quantidade de células inflamatórias					
(3) moderada quantidade de células inflamatórias					
(4) severa/intensa quantidade de células inflamatórias					
Media:					
EXTENSÃO DA INFLAMAÇÃO					
(1) ausência de inflamação					
(2) extensão parcial do tecido conjuntivo					
(3) extensão total do tecido conjuntivo, sem atingir o tecido ósseo					
(4) extensão total do tecido conjuntivo e tecido ósseo					
Media:					
PADRÃO CELULAR E ESTRUTURA DO TECIDO CONJUNTIVO					
(1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade fibras colágenas					
(2) moderada quantidade de fibroblastos e fibras colágenas					
(3) pequena quantidade de fibroblastos e fibras colágenas					
(4) severa desorganização tecidual com áreas de necrose					
Media:					
PADRÃO CELULAR E ESTRUTURA DO TECIDO ÓSSEO					
(1) osso vivo, com padrão funcional trabecular					
(2) presença de áreas focais de osteonecrose					
(3) presença de áreas multifocais de osteonecrose					
(4) presença de osteonecrose difusa e intensa					
Media:					

Traduzido e adaptado de Statkievcz e colaboradores, 2018.