



**CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS**

**MESTRADO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS**

**RAIMUNDO ANTONIO DE LIMA PRAXEDES NETO**

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA OSTEONECROSE INDUZIDA  
POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO EM RATOS**

**FORTALEZA**

**2020**

**RAIMUNDO ANTONIO DE LIMA PRAXEDES NETO**

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA OSTEONECROSE INDUZIDA  
POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO EM RATOS**

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado em Ciências Odontológicas do Centro Universitário Christus, como requisito parcial para obtenção do grau Mestre.

Orientadora: Ramille Araújo Lima

Co-orientador: Paulo Goberlânio de Barros Silva

**FORTALEZA**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Centro Universitário Christus - Unichristus  
Gerada automaticamente pelo Sistema de Elaboração de Ficha Catalográfica do  
Centro Universitário Christus - Unichristus, com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P919e Praxedes Neto, Raimundo Antônio de Lima.  
Efeito da terapia fotodinâmica na osteonecrose induzida por  
ácido zoledrônico em ratos / Raimundo Antônio de Lima Praxedes  
Neto. - 2020.  
43 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário Christus -  
Unichristus, Mestrado em Ciências Odontológicas, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Profa. Dra. Ramilye Araújo Lima.  
Coorientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva.

1. Osteonecrose da Arcada Osseodentária Associada a  
Difosfonatos. 2. Fotoquimioterapia. 3. Ácido Zoledrônico. I. Título.

CDD 617.6

2020

**PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS**  
**CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS – UNICHRISTUS**  
**BANCA EXAMINADORA**

**Aluno: Raimundo Antonio de Lima Praxedes Neto**

**Orientadora: Profa. Dra. Ramille Araújo Lima**

---

**Profa. Dra. Ramille Araújo Lima**

Professora do Curso de Odontologia do Centro Universitário Christus  
Orientadora

---

**Prof. Dr. Filipe Nobre Chaves**

Professor do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará- Campus Sobral  
Avaliador Externo

---

**Prof. Dr. Antônio Ernando Carlos Ferreira Júnior**

Professora do Curso de Odontologia da do Centro Universitário Christus  
Avaliador Interno

**DATA: 25 de fevereiro de 2021.**

## RESUMO

A Osteonecrose dos Maxilares associada à Bisfosfonatos (OMB) consiste na presença de osso exposto e necrosado na região maxilofacial que tenha persistência de mais de oito semanas em pacientes sem história de radioterapia em cabeça e pescoço e com tratamento prévio ou atual com bisfosfonatos orais ou endovenosos. Sua patogenia ainda não é claramente conhecida, não havendo, desta forma, um padrão ouro para seu tratamento. Todavia é certo que há microrganismos presentes na superfície do osso necrosado, e uma vez que a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PDT) já mostrou ter efeitos antimicrobianos, pode vir a representar uma terapia coadjuvante no tratamento da OMB. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito da PDT, utilizando o fotossensibilizador (FS) azul de metileno e laser de baixa potência, no osso alveolar de ratos submetidos a modelo de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico (AZ). Foram utilizados 60 ratos machos da espécie Wistar (*Rattus norvegicus*) divididos em seis grupos: um grupo tratado com solução salina sem PDT, um grupo tratado com solução salina com PDT, um grupo tratado com AZ sem PDT, um grupo tratado com ácido zoledrônico com PDT, um grupo tratado com AZ com laser vermelho e um grupo tratado com AZ com azul de metileno. A PDT foi realizada nos dias 42, 45, 49 e 54 após a administração da droga. Foram realizadas três administrações semanais consecutivas (Dias 0, 7 e 14) de AZ 0,20 mg/kg ou solução salina (grupo controle negativo). Após um mês da última administração (Dia 42) foi realizada a exodontia dos primeiros molares inferiores esquerdos. Na semana seguinte (Dia 49), foi administrada dose adicional do fármaco e um mês após a exodontia (Dia 70) os animais foram eutanasiados para obtenção de amostras de mandíbulas para análise imagiológica e microscópica. Os animais foram pesados semanalmente para avaliação da curva de massa corpórea. Os testes ANOVA/Bonferroni foram utilizados para análise estatística. O grupo AZ, tratado com PDT apresentou percentual de osteócitos apoptóticos significativamente inferior aos animais tratados com AZ apenas ( $p < 0,001$ ). Além disso, o grupo AZ co-tratado com corante ( $86,50 \pm 16,09$ ), luz ( $21,20 \pm 4,21$ ) e PDT ( $19,75 \pm 2,76$ ) apresentaram redução significativa do número de mononucleares em relação ao grupo tratado com AZ ( $p < 0,001$ ). Além disso, os grupos AZ+LUZ e AZ+PDT apresentaram redução significativa do número de células CD 68+ e CD3+, em relação ao grupo tratado apenas com AZ. O número de células expressando IL-2 tiveram não obteve diferença estatística em nenhum dos grupos tratados com AZ e seus co-tratamentos, no entanto, o número de células expressando INF- $\gamma$  obteve uma redução estatisticamente significativa nos grupos co-tratados com LUZ e PDT, quando comparados ao grupo AZ. Conclui-se que a PDT atenua o processo inflamatório crônico e sinais de apoptose, devido a uma redução da resposta por Linfócitos Th1, em alvéolos dentários de ratos submetidos a modelo de osteonecrose induzida por AZ.

**Palavras-chave:** Osteonecrose da Arcada Osseodentária Associada a Difosfonatos; Fotoquimioterapia; Ácido Zoledrônico.

## ABSTRACT

Osteonecrosis of the jaws associated with bisphosphonates consists of the presence of exposed and necrotic bone in the maxillofacial region that has persisted for more than eight weeks in patients with previous or current treatment of oral or intravenous bisphosphonate with no history of radiotherapy. Its pathogenesis is still unclear, thus there is no gold standard treatment. However, it is certain that there are microorganisms present on the surface of necrotic bone, and since Photodynamic Therapy has already been shown to have antimicrobial effects, it may come to represent an adjunctive therapy in the treatment of OMB. Therefore, the objective of this study is to evaluate the effect of photodynamic therapy, using the methylene blue photosensitizer and low power laser, on the alveolar bone of rats submitted to a model of osteonecrosis induced by zoledronic acid. 60 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used, divided into six groups: a group treated with saline solution without PDT, a group treated with saline solution with PDT, a group treated with zoledronic acid without PDT, a group treated with zoledronic acid with PDT, a group treated with zoledronic acid with red laser and a group treated with zoledronic acid with methylene blue. Three consecutive weekly administrations (Days 0, 7 and 14) of 0.20 mg / kg Zoledronic Acid or saline solution (negative control group) were performed. One month after the last administration (Day 42), the extraction of the first left lower molars was performed. In the following week (Day 49), an additional dose of the drug is administered and one month after extraction (Day 70) the animals were euthanized to obtain samples of the jaws for imaging and microscopic analysis. The animals were weighed weekly to assess the body mass curve. PDT was performed on days 42, 45, 49 and 54 after drug administration and microbiological collection was performed immediately after extraction of the lower molar from the animal model on day 42 and after applications of PDT. ANOVA / Bonferroni or Kruskal-Wallis / Dunn tests were used for statistical analysis. The AZ group, treated with PDT, presented a percentage of apoptotic osteocytes significantly lower than the animals treated with AZ only ( $p < 0.001$ ). In addition, the AZ group co-treated with dye ( $86.50 \pm 16.09$ ), light ( $21.20 \pm 4.21$ ) and PDT ( $19.75 \pm 2.76$ ) showed a significant reduction in the number of mononuclear cells in relation to the group treated with AZ ( $p < 0.001$ ). In addition, the AZ + LASER and AZ + PDT groups showed a reduction in the number of CD 68+ and CD3 + cells, compared to the group treated with AZ only. The number of cells expressing IL-2 had no statistical difference in any of the groups treated with AZ and its co-treatments, however, the number of cells expressing INF- $\gamma$  obtained a statistically significant reduction in the groups co-treated with LASER and PDT, when compared to the AZ group. It is concluded that a PDT attenuates the chronic inflammatory process and signs of apoptosis, due to a reduced response by Th1 lymphocytes, in dental alveoli of rats in an AZ-induced osteonecrosis model.

**Keywords:** Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw; Photochemotherapy; Zoledronic acid.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Imagem ilustrativa do protocolo experimental contendo os dias de administração de AZ, exodontia, aplicação da PDT.

**Figura 2:** Radiografias das mandíbulas mais representativas de cada grupo experimental. \* $p < 0,05$  versus salina e PDT; † $p < 0,05$  em relação ao grupo AZ (ANOVA/Bonferroni, média±EPM)

**Figura 3:** Influência da PDT no percentual de lacunas de osteócitos vazias do sítio pós exodontia em animais submetidos a modelo experimental de OMB em ratos.

\* $p < 0,05$  versus salina e PDT; † $p < 0,05$  em relação ao grupo AZ (ANOVA/Bonferroni, média±EPM).

**Figura 4:** Influência da PDT no perfil inflamatório do sítio pós exodontia em animais submetidos a modelo experimental de OMB em ratos.

\* $p < 0,05$  versus salina e PDT; † $p < 0,05$  em relação ao grupo AZ (ANOVA/Bonferroni, média±EPM).

**Figura 5:** Perfil celular do sítio pós exodontia em animais submetidos a modelo experimental de OMB em ratos (HE, 400x; linha horizontal = 50 $\mu$ m)

**Figura 6:** Influência da PDT na contagem de osteoclastos total e apoptóticos do sítio pós exodontia em animais submetidos a modelo experimental de OMB em ratos.

\* $p < 0,05$  versus salina e PDT; † $p < 0,05$  em relação ao grupo AZ (ANOVA/Bonferroni, média±EPM).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Medicamentos, nome comercial, geração, forma de administração e potência dos Bisfosfonatos

**Tabela 2:** Análise de variação de massa, dificuldade cirúrgica e área radiolúcida sugestiva de OMB em ratos tratados com AZ.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>OMB</b>	Osteonecrose dos Maxilares Induzidas por Bisfosfonatos
<b>PDT</b>	Photodynamic Therapy
<b>FS</b>	Fotosensibilizador
<b>AZ</b>	Ácido Zoledrônico
<b>AAOMS</b>	American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons
<b>mg</b>	Miligramas
<b>kg</b>	Quilogramas
<b>cm</b>	Centímetros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>µg</b>	Microgramas
<b>ml</b>	Militros
<b>LASERS</b>	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
1.1. Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bifosfonatos .....	10
1.2. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana .....	12
2. Justificativa .....	16
3. Objetivos .....	17
4. Material e Métodos .....	18
4.1. Animais e cálculo Amostral.....	18
4.2. Delineamento Experimental .....	18
4.3. Protocolo Experimental .....	19
4.4. Terapia Fotodinâmica .....	20
4.5. Análise Radiográfica .....	21
4.6. Avaliação Histológica .....	21
4.7. Confecção de bloco de Tissue Micro Array e reações de imuno-histoquímica	22
4.8. Análise Estatística .....	23
5. Resultados .....	24
6. Discussão .....	30
7. Conclusão .....	34
Referências.....	35

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bifosfonatos (OMB).

A Osteonecrose foi descrita pela primeira vez em 2003 por Robert Marx em um artigo publicado com a descrição de 36 casos de uma exposição óssea dolorosa na mandíbula, maxila ou em ambos que não respondia a quaisquer tratamentos, quer cirúrgico ou medicamentoso. Àquela época, era uma patologia então desconhecida, e para o autor representava um sério efeito adverso do uso de bisfosfonatos, já que esta era a medicação comum a todos os 36 pacientes (MARX, 2003).

Os Bisfosfonatos são similares sintéticos do pirofosfato endógeno, que se trata de um regulador fisiológico da calcificação e da reabsorção óssea. Tem capacidade de induzir direta ou indiretamente a apoptose dos osteoclastos ou até mesmo inativá-los, inibindo assim sua função de reabsorção, causando redução da densidade óssea (DE CAMARGO MORAES et al., 2015; EL-RABBANY et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018). Quando administrados, os bisfosfonatos se ligam à matriz óssea, devido a sua alta afinidade por hidroxapatita e se acumulam ao longo do tempo, podendo ser encontrado mesmo após a interrupção do tratamento. (HEGGENDORN et al., 2016).

Diante desta capacidade, são usados no tratamento de osteoporose, doença de Paget, mieloma múltiplo, metástases ósseas de tumores malignos como cânceres de mama, próstata, rim e pulmão, visando a diminuição da atividade celular no tecido ósseo (ADLER et al., 2016; OTTO et al., 2018). Além disso, é levado em consideração a forma de administração, geração e a potência do bisfosfonato utilizado (Tabela1), que influenciam no acometimento da OMB (KUŽNIK et al., 2020). Os Bisfosfonatos aminados são uma classe de potentes supressores de osteoclastos, como o pamidronato e o zolendronato, sendo a causa predominante de OMB, especialmente se forem administrados por via intravenosa. Nas metástases ósseas, eles são a principal escolha, tendo como mecanismo de ação a inibição irreversível dos osteoclastos, causando toxicidade direta que os leva à morte celular (ADLER et al., 2016; BLACK; ROSEN, 2016; MÜCKE et al., 2016; OTTO et al., 2018).

**Tabela 1:** Medicamentos, nome comercial, geração, forma de administração e potência dos Bisfosfonatos (KUŹNIK et al., 2020).

Medicamentos	Nome Comercial	Geração	Administração	Potência
Etidronato	Didronel	1 <sup>a</sup>	VO	1X
Clodronato	Bonefos, Loron	2 <sup>a</sup>	VO	10X
Tiludronato	Skelid	2 <sup>a</sup>	Oral, IV	10X
Pamidronato	Aredia	2 <sup>a</sup>	IV	100X
Alendronato	Fosamax Alendil Recalfe Endrox	3 <sup>a</sup>	VO	500X
	Cleveron Osteoral Osteoform			
	Osteonan Osteotrat Bonalen			
	Endronax Minusorb			
Ibandronato	Bondronati, Bonviva	3 <sup>a</sup>	VO	1000X
Residronato	Risedross, Actonel	3 <sup>a</sup>	VO	2000X
Ácido Zoledrônico	Zometa	3 <sup>a</sup>	IV	10000X

O ácido zoledrônico (AZ) é um bisfosfonato de terceira geração, de grande potência (se comparado ao Etidronato, é 10.000 vezes mais potente), nitrogenado e administrado por via endovenosa. É, por estas razões, o principal associado à Osteonecrose dos Maxilares induzida por Bisfosfonatos (OMB) (BETH-TASDOGAN et al., 2017; HEGGENDORN et al., 2016; KUŹNIK et al., 2020)

Em 2009, a *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* (AAOMS) definiu a OMB como sendo a presença de osso exposto e necrosado na região maxilofacial que tenha persistência de mais de oito semanas em pacientes sem história de radioterapia em cabeça e pescoço e com tratamento prévio ou atual com bisfosfonatos orais ou endovenosos (HEGGENDORN et al., 2016; KOTH et al., 2016; SARDELLA et al., 2011). Os achados clínicos mais comuns são a presença de dor, exposição óssea, edema em tecido mole, infecção, parestesia, halitose, mobilidade dentária e secreção purulenta (HEGGENDORN et al., 2016; KOTH et al., 2016).

A patogenia exata da OMB ainda não é claramente conhecida, apesar de muitos estudos sobre o tema desde seu primeiro relato. Algumas teorias tem sido

propostas para explicá-la, como por exemplo que seria induzida pelo sucessivo acúmulo dos bisfosfonatos nos ossos, o que levaria a total inibição da função osteoclástica. Também poderia ser resposta a alguma infecção – os bisfosfonatos agem na modulação da resposta imune a diferentes tipos celulares, e isto poderia facilitar uma reação a patógenos presentes no biofilme. Não obstante, as espécies do gênero *Actinomyces* são encontradas em muitos dos casos de OMB, o que corrobora para esta teoria. Uma outra possibilidade teria a OMB como resultado de uma isquemia provocada pelo efeito antiangiogênico dos bisfosfonatos. Além destas, é possível que o acúmulo e toxicidade dos bisfosfonatos poderiam, quando combinados com medicações antineoplásicas, levar a danos na mucosa que causariam exposição óssea e consequente OMB (DE BARROS SILVA et al., 2015; HEGGENDORN et al., 2016)

O principal fator de risco da OMB é o trauma cirúrgico advindo de procedimentos odontológicos cruentos. A maioria dos casos relatados da patologia ocorre após exodontias, que elevam seu risco em até dezessete vezes. Outro fator de risco é a doença periodontal que pode aumentar a quantidade de bisfosfonato liberado, e eleva o risco em mais de doze vezes (BETH-TASDOGAN et al., 2017; DE BARROS SILVA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2018). Pode-se, desta forma, pensar num cenário em que o trauma aos tecidos moles da boca representariam o evento inicial de OMB e a liberação de bisfosfonato da camada óssea subjacente para a mucosa ao redor resultaria em uma inibição local da cura da ferida, com subsequente envolvimento ósseo (ZANDI et al., 2017).

Como não há uma clareza na patogênese da OMB, ainda não existe um padrão ouro para seu tratamento. Há sugestões de protocolos que tem sido aceitas (ERVOLINO et al., 2019; HEGGENDORN et al., 2016; KOTH et al., 2016). Nem mesmo a interrupção do uso do bisfosfonato parece trazer resultado, já que ele se acumula no tecido ósseo, tendo uma meia-vida longa (APARECIDA CARIOLATTO et al., 2018). Pacientes tratados com antibioticoterapia local ou sistêmica, oxigenação hiperbárica ou mesmo debridamento cirúrgico não tem tido sucesso a ponto de evoluir para a cura da patologia, o que a torna uma condição ainda mais complexa para o paciente, porque a exposição óssea aumenta a chance de instalação de infecção local, que por sua vez não cede ao uso de antibióticos, especialmente em pacientes oncológicos que já possuem imunidade comprometida (DE BARROS SILVA et al., 2015).

Pesquisas e tratamentos com novas terapias têm sido realizados, como a aplicação de baixas doses de hormônio paratireoidiano em pacientes portadores de osteoporose e que desenvolveram OMB (LEIZAOLA-CARDESA et al., 2016). O uso de plasma rico em plaquetas na cavidade formada após a realização de ressecção do osso necrótico, é apresentada como um relevante tratamento, obtendo um reparo adequado do tecido ósseo (CANO-DURÁN et al., 2017). OMB também obteve boa resposta ao tratamento complementar a intervenção cirúrgica, como a PDT seguida de aplicação tópica de plasma rico em fibrina (CANO-DURÁN et al., 2017). Relatos sobre o uso de ozonioterapia com aplicações ao redor da lesão de necrose e também no conduto do elemento dentário que estava sob tratamento, fazendo-se uso das propriedades bactericidas e regenerativas do ozônio, com regressão da lesão e recuperação de densidade óssea (BETH-TASDOGAN et al., 2017).

## **1.2. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana**

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PDT) surge como um tratamento alternativo ao uso de agentes antimicrobianos tradicionais. Nesta terapia, componentes celulares fotossensíveis passam para um estado excitado quando expostos a uma luz de comprimento de onda complementar que é caracterizado pela passagem dos elétrons para níveis de energia superiores. Neste estado excitado, o fotossensibilizador (FS) pode interagir com o oxigênio molecular iniciando a formação de oxigênio singleto altamente reativo (fotoprocesso Tipo II) ou interagir com outras moléculas como aceptores de elétrons resultando na produção de hidroxilas e outros radicais orgânicos (fotoprocessos do Tipo I). Os produtos dessas reações fotoquímicas podem então danificar componentes essenciais das células ou alterar as atividades metabólicas de maneira irreversível resultando na morte bacteriana (CHILAKAMARTHI; GIRIBABU, 2017).

Como a maioria das espécies bacterianas não apresenta componentes fotossensíveis, a utilização de um agente cromóforo que atraia para si a luz e inicie a formação de radicais livres é importante para a efetividade da PDT. No que diz respeito a interação entre FS e bactéria, a efetividade da terapia está relacionada a três principais aspectos: (1) capacidade do FS em interagir com a membrana bacteriana (2) capacidade

do FS em penetrar e agir dentro da célula e (3) formação de oxigênio singlete ao redor da célula bacteriana (KWIATKOWSKI et al., 2018; LAN et al., 2019). Assim, células desprovidas de componentes fotossensíveis endógenos podem se tornar sensíveis à luz se forem coradas com FS exógenos como derivados das porfirinas, azul de orto-toluidina ou compostos de cloro conjugado (CIEPLIK et al., 2018; TABENSKI et al., 2017).

A capacidade de um componente para absorver uma luz incidente não significa necessariamente que o mesmo pode funcionar como um FS. Um FS ideal deve ser não-tóxico, deve exibir toxicidade local apenas após ativação por iluminação. Além disso, o FS deve ser um composto puro, com uma composição constante e estável, idealmente ser solúvel em água, capaz de gerar oxigênio singlete, e estar disponível comercialmente (LAN et al., 2019).

O azul de metileno (MBO) é um corante orgânico redox fenotiazínico descoberto por Heinrich Claro (1876), que inicialmente ganhou prestígio como corante citológico e como indicador de óxido-redução. Devido às suas propriedades fotoquímicas, têm sido desenvolvidos estudos visando sua aplicação na inativação de bactérias (SCOTTI et al., 2006). MBO ( $C_{16}H_{18}ClN_3S$ ) é um FS que teve sua primeira ação fotodinâmica por volta de 1930, e vem sendo utilizado desde então por ser efetivo contra organismos patogênicos (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001). Estudos prévios mostraram que o MBO, quando utilizado como FS, apresenta efeito significativo na redução da viabilidade de *S. mutans* (LEAL et al., 2017; NEMEZIO et al., 2017; TERRA GARCIA et al., 2018; TOKUBO et al., 2018). Além de demonstrar eficácia na redução da ação de *Actynomices*, que possuem relação com a etiologia da OMB (HUANG et al., 2019).

Com relação à fonte de luz utilizada, vários estudos sobre o efeito antimicrobiano da PDT utilizam LASERS (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) de baixa potência com diversos meios ativos e comprimentos de onda, chegando à conclusão que a combinação do mesmo com um FS tem eficácia na PDT. (AKRAM et al., 2020; AZIZI et al., 2019; ESTEBAN FLOREZ et al., 2018; HAFNER et al., 2016; JOSEPH et al., 2017; NEMEZIO et al., 2017). O LASER apresenta vantagens quando utilizado na PDT, por ser uma luz colimada e coerente e possuir mais de 90% de eficiência (FEEHAN et al., 2018).

Entre as vantagens da PDT em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais, temos primeiramente que a morte da célula bacteriana pode ser rápida, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo como ocorre com os agentes anti-sépticos e antibióticos. Além disso, a morte celular mediada pela liberação de radicais livres torna o desenvolvimento de resistência pelos microrganismos improvável (JIAO et al., 2019). Resultados promissores mostram que a PDT antimicrobiana foi efetiva contra microrganismos antibiótico-resistentes, e repetidas aplicações não resultam em “seleção bacteriana” (DA COLLINA et al., 2017). Finalmente, o uso do FS ou da luz sozinhos não apresentam efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias, de modo que a terapia pode ser confinada à área da lesão pela aplicação tópica cuidadosa do corante e restrição da irradiação por meio do uso de fibra ótica (JIAO et al., 2019).

O uso desta terapia como coadjuvante no tratamento ou na prevenção da osteonecrose induzida por medicamentos, já foi relatado na literatura científica, demonstrando que a PDT reverte o atraso no reparo ósseo alveolar causado pelo uso de bisfosfonatos (ERVOLINO et al., 2019; MAGALHÃES et al., 2020; POLI et al., 2019; SARKARAT et al., 2019). Baseado nessas evidências, esse estudo se propõe a analisar a eficácia da PDT como uma terapia adjuvante no processo de reparo ósseo após exodontia de animais submetidos ao modelo de osteonecrose induzida por bisfosfonatos.

## 2. JUSTIFICATIVA

Sobre o desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares induzida por bifosfonatos (OMB), ainda não é totalmente claro se a necrose precede ou se vem após o processo infeccioso, mas é certo que há a presença de microrganismos do biofilme na superfície do osso necrosado. Assim sendo, uma vez que várias pesquisas tem demonstrado os efeitos antimicrobianos da terapia fotodinâmica (PDT) (ERVOLINO et al., 2019; ESTEBAN FLOREZ et al., 2018; JIAO et al., 2019; MAGALHÃES et al., 2020), esta pode representar uma terapia adjuvante no tratamento da osteonecrose. Entretanto, a evidência científica atual sobre o uso desta terapia na OMB resume-se a poucos estudos, portanto, mais estudos e com análises mais profundas são necessários a fim de comprovar o efeito da PDT na osteonecrose induzida por medicamentos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PDT), utilizando o fotossensibilizador (FS) azul de metileno e laser de baixa potência, no osso alveolar de ratos submetidos a modelo de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico (AZ).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar, imaginologicamente, o efeito da PDT no osso alveolar de ratos submetidos a modelo de osteonecrose induzida por AZ;
- Avaliar, histológica e histomorfometricamente, o efeito da PDT no osso alveolar de ratos submetidos a modelo de osteonecrose induzida por AZ;
- Avaliar, através de análises de imuno-histoquímica, o efeito da PDT no osso alveolar de ratos submetidos a modelo de osteonecrose induzida por AZ;
- Analisar a toxicidade da PDT em modelo animal através da análise de variação de massa corpórea, e da pesagem.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais e cálculo amostral

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Centro Universitários Christus, e foi aprovado com protocolo número 02/18 (ANEXO I). O cálculo amostral foi baseado no estudo de Garcia et al., (2014) que observou que ratos submetidos a modelo de reabsorção por ligadura apresentaram menor perda óssea quando tratados com Terapia Fotodinâmica (PDT) com 10mg/mL de azul de metileno (MBO) ( $1,50 \pm 0,27 \text{ mm}^2$ ) em relação a animais não tratados ( $2,17 \pm 0,54 \text{ mm}^2$ ) estima-se necessário avaliar um total de 09 ratos por grupo de estudo a fim de obter uma amostra que represente com 90% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa deste trabalho. Tendo em vista a possibilidade de perda de amostra, acresceu-se 10% sobre a amostra calculada totalizando 10 ratos por grupo de estudo.

Foram utilizados 10 ratos machos por grupo, de acordo com cálculo amostral apresentado, da espécie Wistar (*Rattus norvegicus*) com massa corpórea entre 180 e 220 gramas procedentes do Biotério do Centro Universitários Christus. Os animais foram mantidos no Biotério em gaiolas apropriadas de polipropileno medindo 49x34x16cm, em número de 5 animais por caixa, e numerados individualmente através de marcação no rabo refeitas quando necessário. Os animais receberam ração comercial balanceada própria e água *ad libitum*, foram mantidos em ciclos de luz-escuro de 12 horas e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante todo o experimento. O peso dos animais foi avaliado semanalmente até a eutanásia.

### 4.2. Delineamento experimental

Os 60 animais foram divididos em seis grupos experimentais como descrito adiante. Tendo em vista que a utilização do laser de baixa potência já vem sendo utilizada como co-adjuvante nos casos de osteonecrose, devido aos seus conhecidos efeitos benéficos nos processos de cicatrização, biomodulação celular e redução de edema, surge a necessidade da realização de um grupo de animais tratados com a droga (ácido zolendrônico, AZ) e laser vermelho, sem a utilização do Fotossensibilizador (FS) azul de metileno (MBO), para fins de controle de experimento.

Da mesma forma, para fins de controle do experimento, a necessidade de um grupo de animais tratados apenas com AZ e MBO, sem a ação do laser, se faz presente.

Os seguintes grupos foram realizados no presente experimento:

- Grupo 1: Animais tratados com solução salina sem PDT.
- Grupo 2: Animais tratados com solução salina com PDT.
- Grupo 3: Animais tratados com AZ 0,20 mg/kg sem PDT.
- Grupo 4: Animais tratados com AZ 0,20 mg/kg com PDT.
- Grupo 5: Animais tratados com AZ 0,20 mg/kg com laser vermelho.
- Grupo 6: Animais tratados com AZ 0,20 mg/kg com MBO.

### **4.3. Protocolo Experimental**

Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo experimental adaptado de de Barros Silva et al., 2016. Foram realizadas três administrações semanais consecutivas (Dias 0, 7 e 14) de AZ 0,20 mg/kg (ZA) ou solução salina (grupo controle negativo). Após 28 dias da última administração (Dia 42) foi realizada a exodontia dos primeiros molares inferiores esquerdos. Na semana seguinte (Dia 49), foi administrada dose adicional do fármaco e, 28 dias após a exodontia (Dia 70), os animais foram eutanasiados para obtenção de amostras de mandíbulas para análise imaginológica e microscópica e, fígado, baço, rins e estômagos para análise de toxicidade órgão-específica. Os animais foram pesados semanalmente para avaliação da curva de massa corpórea.

Após anestesia (ketamina: 80mg/kg e xilazina: 20mg/kg) por via intraperitoneal) foi realizada sindesmotomia do 1º molar inferior esquerdo (com auxílio de sonda exploradora), luxação com uso de espátula Hollembach 3S e extração com uso de espátula Lecron-Zalle em movimento de alavanca (DE BARROS SILVA et al., 2016). Todos os procedimentos foram realizados cegamente por um mesmo operador previamente treinado e os animais foram aleatorizados e pesados semanalmente a partir do início do protocolo. Foi cronometrado o tempo de cada procedimento cirúrgico e os dentes foram secos em papel absorvente e pesados em balança de precisão.

Adicionalmente, um operador contará, também cegamente, o número de fraturas radiculares (DE BARROS SILVA et al., 2016).

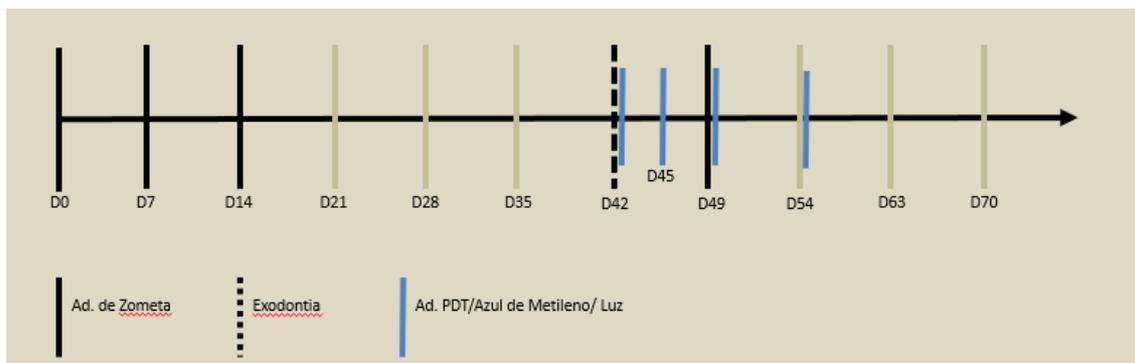
#### 4.4 Terapia Fotodinâmica (PDT)

O FS utilizado foi o MBO ( $C_{16}H_{18}ClN_3$ ), na concentração de  $100\mu\text{g/mL}$ , estocado em frasco âmbar ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A fonte de luz utilizada foi um Laser Diodo de Arsenato de Gálio Alumínio (AsGaAl) (Therapy XT-ESTM, DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil) com comprimento de onda predominante de 660 nm. A potência de luz Laser foi de 100 mW e o diâmetro da ponteira é  $0,028\text{ cm}^2$ . O FS apresenta pico de absorção máxima a 660 nm (luz vermelha). Para calcular a densidade de energia, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$DE = \frac{P \cdot t}{A}$$

Onde a potência é calculada em Watts, o tempo em segundos e a área em  $\text{cm}^2$ . Para fins de cálculo da densidade, foi considerada a área do diâmetro da ponteira ( $0,028\text{ cm}^2$ ), área esta semelhante à área do local irradiado (o alvéolo do animal, que possui área aproximada de  $0,032\text{ cm}^2$ ). A irradiação foi realizada em um único ponto. O tempo de irradiação foi 60 segundos e a distância entre a fonte de luz e o local da irradiação foi 2 mm. Dessa forma, a densidade de energia utilizada foi  $214,28\text{ J/ cm}^2$ . O tempo de pré-irradiação utilizado foi de 5 minutos e a concentração do azul de metileno foi de  $100\mu\text{g/ml}$  (Adaptado de MAGALHÃES et al., 2020).

A PDT foi realizada nos dias 42, 45, 49 e 54 após a administração da droga (AZ), conforme visualizado na figura esquemática abaixo.



**Figura 1:** Imagem ilustrativa do protocolo experimental contendo os dias de administração de AZ, exodontia, aplicação da PDT.

Os animais foram eutanasiados no dia 70, por sobredose de xilazina (20 mg/kg) e quetamina (80 mg/kg), para coleta de hemimandíbulas, para análise imaginológica e microscópica.

#### 4.5 Avaliação radiográfica

Após 24h da eutanásia e remoção das hemimandíbulas cirurgicamente, estas foram posicionadas paralelamente ao filme radiográfico e o posicionador com localizador perpendicular ao filme, distando 10 cm deste. Para as tomadas radiográficas foi utilizado um aparelho de raios-X convencional (DabiAtlante®; 63Kvp, 8mA) com um tempo de exposição de 0.18 segundos em função para radiografia digital periapical de bateria dentária anterior superior (13-23).

As radiografias analógicas após o escaneamento, foram exportadas para o formato de imagem .jpeg e posteriormente analisadas quantitativamente por meio do software de análise de imagem ImageJ. Após aleatorização, um operador, de forma cega, mensurou em triplicata a área radiolúcida sugestiva de OMB através do comando de seleção de área livre (Freehand selections) e considerou como unidade amostral a média aritmética das três medidas (BARROS SILVA et al., 2015).

#### 4.6 Avaliação Histológica

Após realização de radiografia digital, as hemimandíbulas foram descalcificadas (suspensão) em solução 10% EDTA (pH 7.3; NaOH, PA) (DE BARROS SILVA et al., 2016) durante 30 dias para confecção de lâminas histológicas

(Hematoxilina-eosina, 3  $\mu\text{m}$ ) e análise qualitativa por microscopia de luz convencional. Após análise descritiva, as lâminas histológicas foram fotografadas em 10 (dez) campos microscópicos de grande aumento (400x) no sítio referente à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo para análise histomorfométrica. Como os osteócitos são as principais células associadas a manutenção da vitalidade óssea foram contados os números de lacunas de osteócitos vazias e com células viáveis. O número de osteoclastos com vitalidade e com sinais histológicos de apoptose (hipo ou hipercromatismo nuclear e presença de múltiplos vacúolos intracitoplasmáticos) também foi mensurado (DE BARROS SILVA et al., 2016). Número de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares também foi considerado. O somatório dos campos de cada lâmina foi considerado como unidade amostral para avaliação quantitativa.

#### **4.7. Confeção de bloco de Tissue Micro Array (TMA) e reações de imuno-histoquímica**

Um microcampo de 2 mm de cada uma dessas áreas foi selecionado e marcado nas lâminas histológicas para posterior pareamento com o bloco e remoção da amostra usando o dispositivo Tissue Micro Arrayer®. Após isso, um bloco receptor contendo 70 poços de mesmo diâmetro receberam as amostras de tecido parafinado, organizadas e mapeadas.

Após a colocação de todas as amostras no bloco receptor, o mesmo foi incubado por três minutos sobre uma lâmina de vidro em estufa a 65°C e retirado em movimento rotacional com a finalidade de unir as amostras de tecido ao bloco receptor. Após resfriamento do bloco receptor em temperatura ambiente, cortes de 3 $\mu\text{m}$  foram realizados e dispostos em lâminas silanizadas para reação de imuno-histoquímica e ensaio de apoptose.

As lâminas silanizadas foram desparafinizadas em estufa por uma hora a 65°C, imersas em xilol, reidratadas em solução decrescente de álcool, lavadas em água corrente e submetidas a recuperação antigênica com solução 0,1M Tris-EDTA pH 9,0 ou 0,1M citrato pH 6,0, a depender do anticorpo, em banho maria a 95°C por 40 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente os cortes foram lavados em solução tampão de fosfato 0,1M pH7,3 (PBS) em dois banhos de cinco minutos cada e foi realizado o

bloqueio da peroxidase endógena com solução 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) diluída em PBS por 30 minutos.

Após dois banhos de cinco minutos em PBS, as lâminas foram incubadas com solução 1% de albumina para bloqueio de proteínas inespecíficas por uma hora. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em PBS (dois banhos de cinco minutos) e então incubadas overnight com os seguintes anticorpos: anti-CD68 (pronto-para-uso, m0876, Dako®), anti-CD3 (1:300, ab1669, Abcam®), anti-IL8 (1:300, ab7747, Abcam®), anti-MCP1 (1:300, ab25124, Abcam®), anti-INF $\gamma$  (1:200, ab9657, Abcam®), anti-IL2 (1:200, ab180780, Abcam®).

No dia seguinte, após resfriamento em temperatura ambiente, os cortes foram lavados com dois banhos de cinco minutos de PBS e incubados com polímero anti-coelho/anti-rato Dako Envision Dual Link System HRP (Dako®) por uma hora. Após nova lavagem com dois banhos de cinco minutos de PBS, as lâminas foram incubadas com 3,3-diamino-benzidina (DAB) por 5 minutos. A reação foi então “parada” com água destilada. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris 7% por 10 segundos, lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com Enthellam®. Os controles positivos consistiram em tonsilas e linfonodos humanos e nos controles negativos foi suprimido os anticorpos primários.

Para análise histomorfométrica do sítio de exodontia foram fotografados 10 campos em um aumento de 400x no sítio referente ao primeiro molar inferior esquerdo. Foram contadas as com positividade membranar para o receptor do marcador específico e com positividade citoplasmática para os marcadores inflamatórios. O somatório dos campos de cada lâmina foi considerado como unidade amostral para avaliação quantitativa.

#### **4.8. Análise estatística**

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e expressos por meio de média e erro padrão da média. Os dados foram comparados por meio do teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni, uma vez que se tratava de dados paramétricos. O nível de significância estabelecido foi de 5% ( $p < 0,05$ ) e intervalo de confiança de 95%. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 5.0.

## 5. RESULTADOS

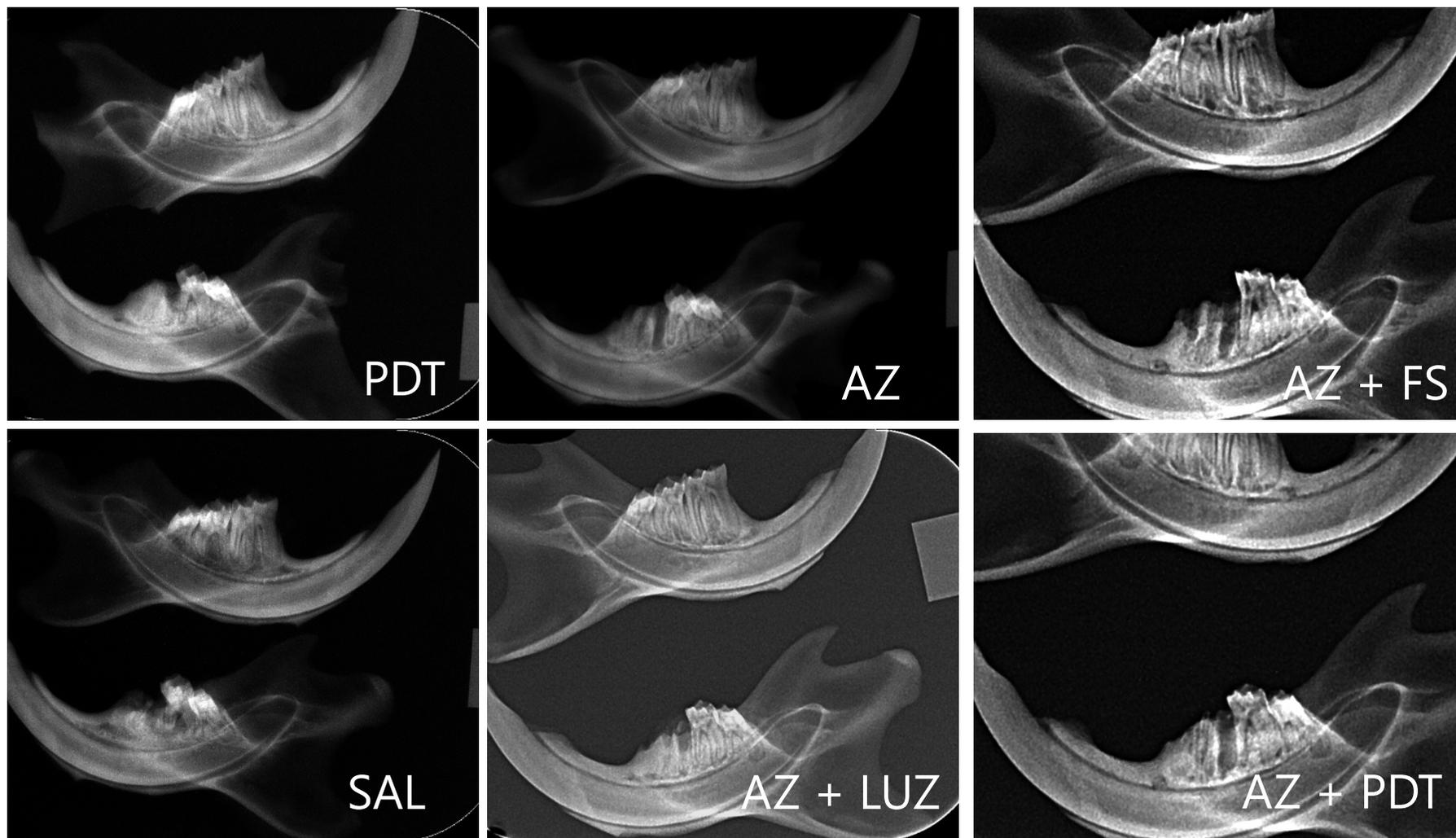
### 5.1. Terapia fotodinâmica não interfere na dificuldade cirúrgica, perda de peso e área radiolúcida sugestiva de osteonecrose

Não houve diferença significativa no tempo cirúrgico ( $p=0,634$ ), número de fraturas radiculares ( $p=0,952$ ), peso do dente ( $p=0,871$ ) entre os seis grupos experimentais. Ao longo do curso temporal, todos os animais ganharam peso, sem diferença significativa do início ao fim do experimento ( $p=0,944$ ) e houve aumento significativo na área radiolúcida nos grupos tratados com AZ em relação aos grupos tratados somente com Salina ( $p=0,007$ ) (Figura 2) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Análise de variação de massa, dificuldade cirúrgica e área radiolúcida sugestiva de OMB em ratos tratados com AZ.

			AZ (0,2 mg/kg)				p-Valor
	Sal	PDT	Sal	Corante	Luz	PDT	
Varição de massa (g) (D70-D0)	50,17±13,03	41,00±16,52	46,75±8,65	40,75±8,92	39,00±10,07	42,00±12,62	0,944
Tempo cirúrgico (seg)	112,40±12,83	90,67±18,49	109,80±13,29	102,30±24,71	91,33±13,42	84,80±8,95	0,634
Número de fraturas (n)	0,50±0,22	0,33±0,21	0,33±0,21	0,43±0,20	0,30±0,15	0,50±0,22	0,952
Peso do dente (mg)	18,88±1,14	18,18±0,94	17,88±1,37	20,31±1,41	19,33±1,24	17,97±1,07	0,871
Área radiolúcida (mm <sup>2</sup> )	58,96±5,93	58,21±10,64	89,88±6,09*	93,47±3,73*	85,77±7,11*	93,12±5,71*	<b>0,007</b>

\* $p<0,05$  versus salina e PDT; † $p<0,05$  em relação ao grupo AZ (ANOVA/Bonferroni, média±EPM)



**Figura 2:** Radiografias das mandíbulas mais representativas de cada grupo experimental, demonstrando o efeito da indução à Osteonecrose, com o aumento da área radiolúcida no local das exodontias dos grupos tratados com AZ.

## ***5.2. Terapia fotodinâmica atenua processo inflamatório crônico e sinais de necrose em alvéolos dentários de ratos submetidos a modelo de osteonecrose induzida por AZ***

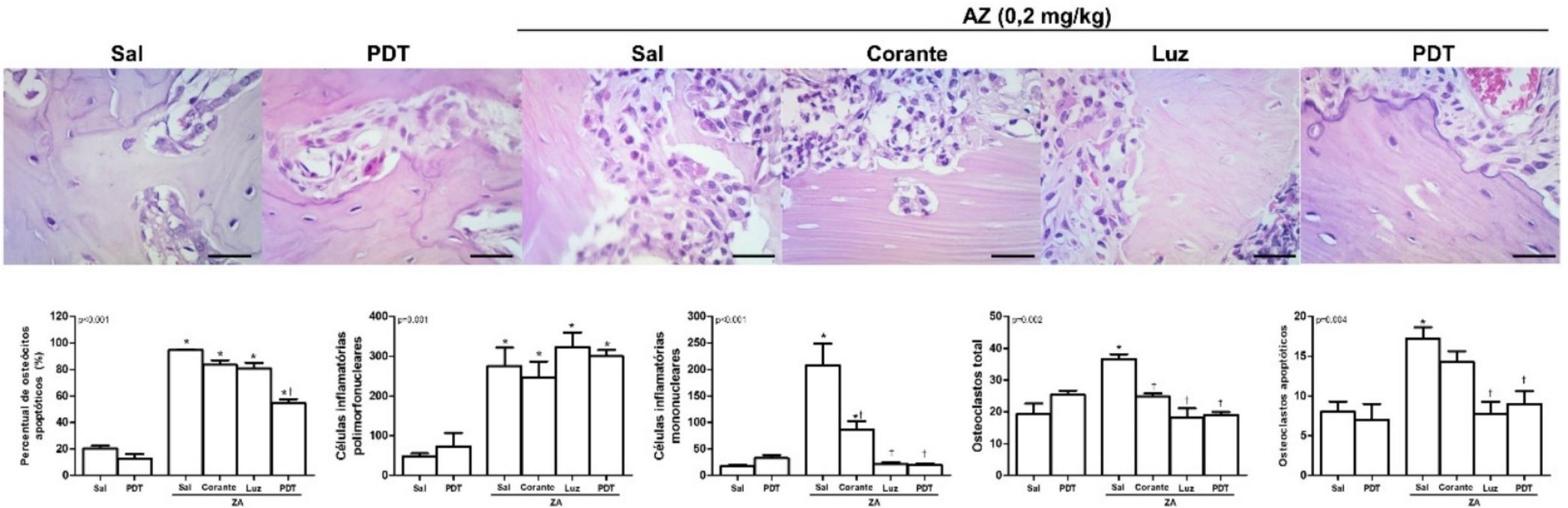
O percentual de osteócitos apoptóticos do grupo salina ( $20,25 \pm 2,24\%$ ) não diferiu significativamente do grupo PDT ( $12,96 \pm 3,27\%$ ). Ambos os grupos mostraram percentual de osteócitos apoptóticos significativamente inferiores aos animais tratados com AZ ( $94,65 \pm 0,61\%$ ) e co-tratados com corante ( $82,51 \pm 3,56\%$ ), com luz ( $80,77 \pm 4,33\%$ ) ou com PDT ( $54,64 \pm 2,98\%$ ). O grupo AZ + PDT apresentou percentual de osteócitos apoptóticos significativamente inferior aos animais tratados com AZ apenas ( $p < 0,001$ ) (Figura 3).

Com relação ao número de células inflamatórias polimorfonucleares do grupo salina ( $47,50 \pm 7,95$ ) não diferiu significativamente do grupo tratado com PDT ( $72,33 \pm 34,93$ ). No entanto, ambos os grupos apresentaram valores significativamente inferiores em relação ao grupo tratado com AZ ( $275,20 \pm 46,34$ ) e co-tratados com corante ( $246,10 \pm 40,78$ ), luz ( $322,30 \pm 37,64$ ) ou PDT ( $299,80 \pm 15,94$ ) ( $p = 0,001$ ) (Figura 3).

O número de células inflamatórias mononucleares não diferiu significativamente entre os grupos salina ( $17,00 \pm 3,19$ ) e PDT ( $32,67 \pm 6,21$ ), mas ambos os grupos apresentaram valores significativamente menores que o grupo tratado com AZ ( $207,50 \pm 41,28$ ). O grupo AZ co-tratado com corante ( $86,50 \pm 16,09$ ), luz ( $21,20 \pm 4,21$ ) e PDT ( $19,75 \pm 2,76$ ) apresentaram redução significativa do número de mononucleares em relação ao grupo tratado com AZ ( $p < 0,001$ ) (Figura 3).

O número de osteoclastos total do grupo salina ( $19,33 \pm 3,26$ ) não diferiu significativamente do grupo tratado com PDT ( $25,40 \pm 1,29$ ). Ambos os grupos apresentaram menor número que o grupo tratado com AZ ( $36,67 \pm 1,52$ ) e os grupos co-tratados com corante ( $24,83 \pm 1,01$ ), luz ( $18,20 \pm 2,90$ ) ou PDT ( $19,00 \pm 0,97$ ) apresentaram menor número de osteoclastos em comparação ao grupo AZ ( $p = 0,002$ ) (Figura 3).

O número de osteoclastos com sinais de apoptose do grupo salina ( $8,00 \pm 1,30$ ) não diferiu significante do grupo PDT ( $7,00 \pm 2,00$ ), mas ambos os grupos mostraram valores significativamente inferiores ao grupo tratado com AZ ( $17,20 \pm 1,46$ ). Os grupos co-tratados com luz ( $7,75 \pm 1,55$ ) e PDT ( $9,00 \pm 1,60$ ) apresentaram redução significativa do número de osteoclastos com sinais de apoptose em relação ao grupo tratado com AZ ( $p = 0,004$ ) (Figura 3).



**Figura 3:** Perfil celular do sítio pós exodontia em animais submetidos a modelo experimental de OMB em ratos (HE, 400x; linha horizontal = 50µm)

### ***5.3. Terapia fotodinâmica reduz resposta imune Th1 em alvéolos dentários de ratos submetidos a modelo de osteonecrose induzida por AZ***

O número de células CD3<sup>+</sup> no grupo salina (394,00±51,52) não diferiu significante do grupo PDT (303,60±57,57), mas ambos os grupos mostraram valores significativamente inferiores ao grupo tratado com AZ (692,50±39,44). Os grupos co-tratados com luz (373,8±56,58) e PDT (398,40±50,92) apresentaram redução do número de células CD3<sup>+</sup> em relação ao grupo tratado com AZ (p=0,002) (Figura 4).

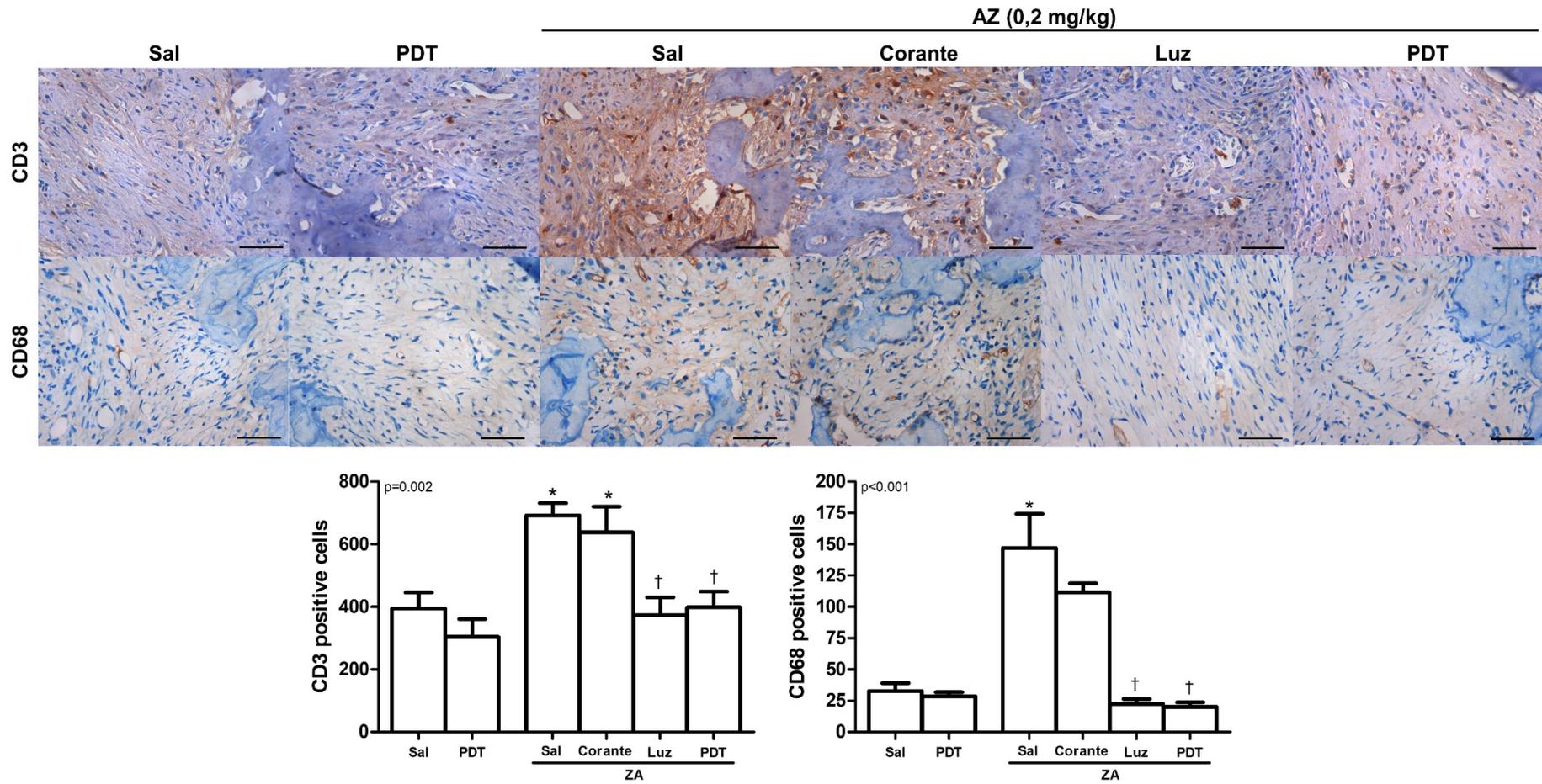
O número de células CD68<sup>+</sup> no grupo salina (32,67±6,47) não diferiu significante do grupo PDT (28,57±3,14), mas ambos os grupos mostraram valores significativamente inferiores ao grupo tratado com AZ (147,00±27,26). Os grupos co-tratados com luz (22,33±4,01) e PDT (20,00±3,78) apresentaram redução significativa do número de células CD68<sup>+</sup> em relação ao grupo tratado com AZ (p<0,001) (Figura 4).

O número de células expressando IL-2 no grupo salina (445,60±44,60) não diferiu significante do grupo PDT (589,40±37,51), mas ambos os grupos mostraram valores significativamente inferiores ao grupo tratado com AZ (921,20±82,51). Os tratamentos com luz, corante ou PDT não reduziram esses valores (p<0,001) (Figura 5).

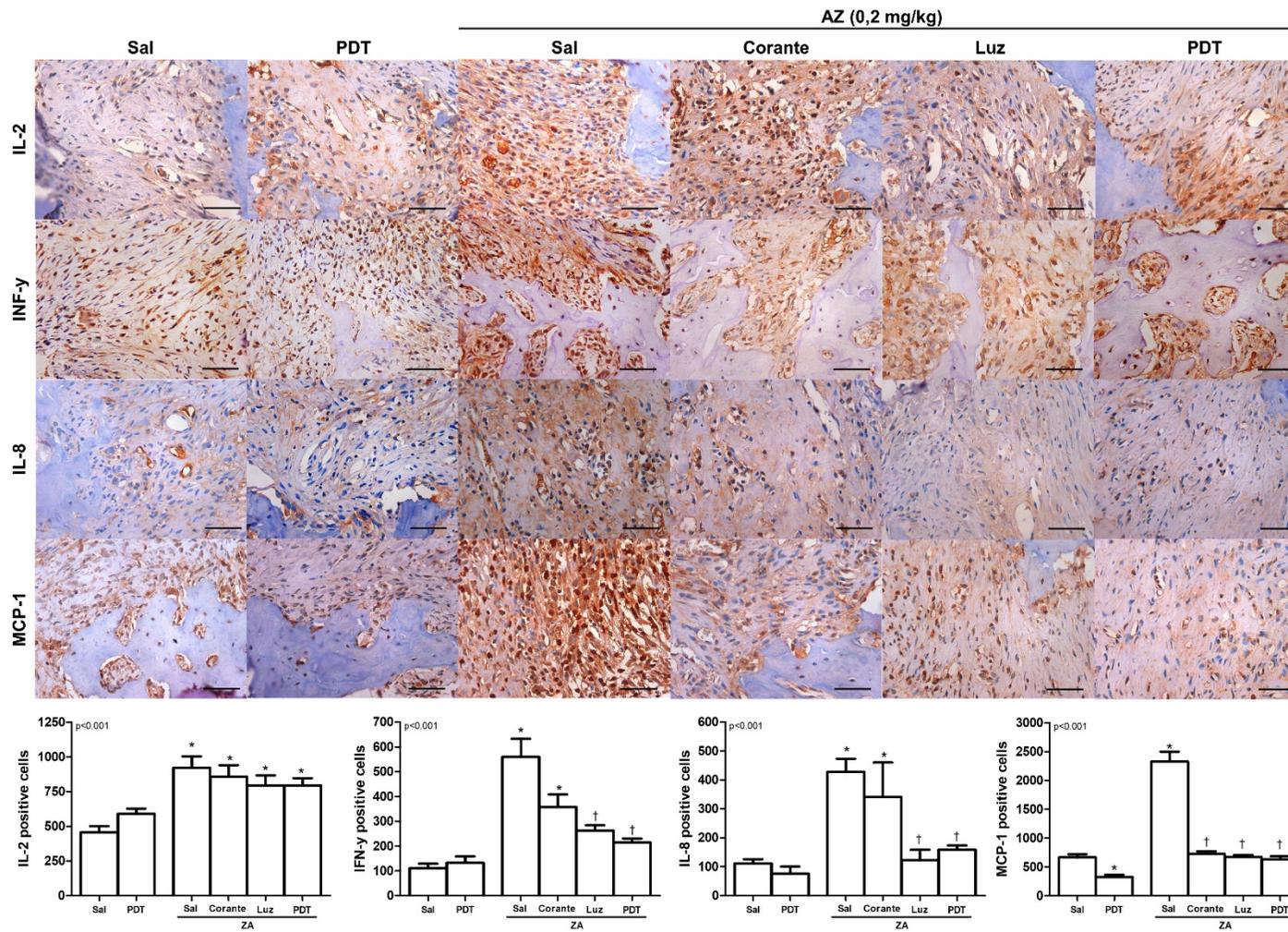
O número de células expressando INF- $\gamma$  no grupo salina (110,50±18,31) não diferiu significante do grupo PDT (132,00±26,24), mas ambos os grupos mostraram valores significativamente inferiores ao grupo tratado com AZ (560,20±72,32). Os grupos co-tratados com luz (262,40±22,20) e PDT (213,80±16,38) apresentaram redução significativa do número de células INF- $\gamma$  comparado ao grupo AZ (p<0,001) (Figura 5).

O número de células expressando IL-8 no grupo salina (111,80±14,57) não diferiu significante do grupo PDT (75,83±24,77), mas ambos os grupos mostraram valores significativamente inferiores ao grupo tratado com AZ (427,60±45,61). Os grupos co-tratados com luz (123,20±35,59) e PDT (158,90±15,06) apresentaram redução do número de células expressando IL-8 em relação ao grupo AZ (p<0,001) (Figura 5).

O número de células expressando MCP-1 no grupo salina (665,00±56,86) não diferiu do grupo PDT (325,90±37,46), mas ambos mostraram valores significativamente inferiores ao grupo tratado com AZ (2329,00±169,10). Os grupos co-tratados com corante (726,40±46,67), luz (627,70±33,35) e PDT (635,80±50,23) apresentaram redução do número de células MCP-1<sup>+</sup> em relação ao grupo AZ (p<0,001) (Figura 5).



**Figura 4:** Perfil celular do sítio pós exodontia em animais submetidos a modelo experimental de OMB em ratos (DAB-Hematoxilina, 400x; linha horizontal = 50  $\mu$ m).



**Figura 5:** Perfil de citocinas do sítio pós exodontia em animais submetidos a modelo experimental de OMB em ratos (DAB-Hematoxilina, 400x; linha horizontal = 50 µm).

## 7. DISCUSSÃO

O entendimento dos mecanismos fisiopatológicos de uma condição, como a Osteonecrose Induzida por Bifosfonatos (OMB), realizados em modelo animal, tem uma importante relevância para o desenvolvimento de opções de tratamento (DE BARROS SILVA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017; ZANDI et al., 2017). Ressalta-se ainda que não existe um tratamento padrão-ouro para a OMB e, portanto, opções terapêuticas devem ser buscadas (BETH-TASDOGAN et al., 2017; DE SOUZA TOLENTINO et al., 2019; LOPEZ-JORNET et al., 2016; WEBER; CAMILOTTI; PONTE, 2016).

Nesse estudo, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PDT) apresentou uma diminuição do processo inflamatório crônico e dos sinais de necrose nos alvéolos dentários dos ratos submetidos ao modelo de osteonecrose induzido por ácido zoledrônico (AZ). O grupo AZ tratado com PDT apresentou percentual de osteócitos apoptóticos significativamente inferior aos animais tratados com AZ apenas ( $p < 0,001$ ).

As áreas de radiolucidez foram maiores nos grupos tratados com AZ ( $p = 0,007$ ). Esses achados confirmam o acometimento da osteonecrose causada por bisfosfonatos, após um procedimento cirúrgico, nos animais tratados com AZ (DE BARROS SILVA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2018; ZANDI et al., 2017). Entretanto, o efeito da luz e da PDT não demonstraram alterações nos seus respectivos grupos de tratamento. O impacto do tratamento realizado não foi perceptível na análise radiográfica, não demonstrando diferença significativa entre os grupos tratados com PDT, luz ou corante.

Uma das recomendações para prevenção da OMB é a da realização de cirurgia minimamente invasiva. Esse conceito se aplica na redução de tempo cirúrgico e no mínimo trauma possível nos tecidos adjacentes ao local da exodontia (FLIEFEL et al., 2015; WEBER; CAMILOTTI; PONTE, 2016). Esses parâmetros foram levados em consideração no presente estudo, onde o tempo de cirurgia foi cronometrado ( $p = 0,634$ ), o peso do dente ( $p = 0,871$ ) e a quantidade de fraturas radiculares ( $p = 0,952$ ) foi computada. Entretanto, os dados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, não sendo relevante para o desenvolvimento da OMB, ou nos tratamentos propostos ( $p = 0,634$  e  $p = 0,952$ ).

A hipótese de que o alvo primário da OMB são os maxilares, acompanhados de um prejuízo na cicatrização dos tecidos moles adjacentes, ocorrendo de forma secundária, é a mais aceita. (BOLETTE et al., 2019; RUGGIERO et al., 2009) Portanto, o processo inflamatório com foco inicial no tecido ósseo, tem um papel fundamental na patogênese da OMB. Ademais, a presença de microrganismos, especialmente espécies bacterianas do gênero *Actinomyces*, estão entre os outros mecanismos propostos para o início da OMB. Seguindo essa linha, a proposição desse estudo é de usar a PDT como um adjuvante ao tratamento da OMB, por conta da sua ação antimicrobiana (ERVOLINO et al., 2019; SARKARAT et al., 2019).

Osteócitos em processo de apoptose, inibição da atividade dos osteoclastos, inibindo a sua diferenciação e migração, além da inibição da função dos osteoblastos, associados ao déficit de suprimento sanguíneo local, promovem o início da OMB (BOLETTE et al., 2019; MARX et al., 2005). Corroborando com esses achados, nesse estudo os grupos tratados com AZ apresentaram diferença estatística em relação aos demais grupos com um número maior de osteócitos e osteoclastos com sinais apoptóticos, apontando uma diminuição na atividade celular nos sítios examinados. Além disso, os grupos tratados com luz e PDT apresentaram um maior estímulo de atividade celular, principalmente grupos submetidos ao modelo de osteonecrose, onde há um maior índice de apoptose ( $p < 0,001$ ).

Em espaços medulares em osso perinecrótico, foram encontrados sinais de inflamação, incluindo células inflamatórias e fibrose da medula. Os próprios nitrogênios contidos nos bisfosfonatos podem ativar inflamação. Após a infusão inicial da droga, as células T medeiam uma resposta imune chamada de reação de fase aguda. Por via do mevalonato, essas bases nitrogenadas estimulam a produção de interferon- $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ) seguido pelo fator de necrose tumoral  $\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ) e interleucina- $1\beta$  ( $IL-1\beta$ ) por macrófagos e monócitos. Estimulação de  $TNF-\alpha$  então incita aumento da expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) por monócitos, que por sua vez controlam a fixação de leucócitos às células endoteliais e a migração transendotelial de células mononucleares (GEORGE; LIN; SAUNDERS, 2018).

Ressalta-se que não foram encontrados na literatura outros estudos que avaliaram as citocinas e marcadores imunológicos analisados ( $IL-2$ ,  $IFN\gamma$ ,  $IL-8$ ,  $MCP-1$ ,  $CD3$  e  $CD68$ ) em modelo animal de osteonecrose induzida por medicamento.

A redução de algumas citocinas pró inflamatórias na saliva, como a IL-6, IL-1b, IL-8, TNF-a e IL-10, já foram previamente evidenciadas em pacientes com gengivite e aparelho ortodôntico fixo, que receberam o tratamento com a PDT (ROSA et al., 2020). Entretanto, baixas doses de PDT foram eficientes ao estimular o efeito angiogênico da expressão IL-8, regulando a migração de células imunes em um modelo de estroma mesenquimal humano *In vitro*, demonstrando seu importante papel na regulação do processo inflamatório (UDARTSEVA et al., 2019). Nessa pesquisa, os grupos AZ+LUZ e AZ+PDT apresentaram redução estatística significativa da expressão IL-8, quando comparado ao grupo AZ.

Os resultados dessa pesquisa demonstraram que os grupos tratados com PDT e Luz atenuaram o processo inflamatório crônico, com uma redução significativa no número de células mononucleares ( $p < 0,001$ ), que possuem um papel importante na osteoclastogênese. Além disso, visto através da imunoexpressão CD-3 e CD68, houve uma redução significativa na quantidade de linfócitos e macrófagos, gerando um feedback negativo, que explica o mecanismo de redução do quadro de processo inflamatório crônico.

A citocina MCP-1 facilita a diferenciação de osteoclastos, sendo produzidas pelos Linfócitos T, agindo como uma proteína quimiotática de monócitos e macrófagos. Os níveis de MCP-1 na OMB são elevados, visto que o processo de remodelação óssea é aumentado por conta do uso dos bisfosfonatos (MASUDA; DENG; TAMAI, 2009). Nessa pesquisa, a expressão MCP-1 foi reduzida de forma significativa nos grupos AZ+Corante, AZ+Luz e AZ + PDT, quando comparados ao grupo AZ. A redução do número de células mononucleares nesses grupos, encontrados nessa pesquisa, corroboram com os resultados de MCP-1.

O efeito biomodulador do uso da PDT no tratamento de doenças infecciosas já foi observado, inclusive demonstrando a subexpressão de citocinas como a IL 1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 e INF-y (CHOI; LEE; CHAE, 2010; FEEHAN et al., 2018; ROSA et al., 2020, 2015; TABENSKI et al., 2017; UDARTSEVA et al., 2019) . No presente trabalho, a expressão IL-2, que está relacionada à resposta por Linfócitos Th2, não obtiveram uma diferença estatística significativa entre os grupos tratados com AZ. No entanto, a expressão INF-y, que é proteína quimiotática de monócitos e macrófagos, intimamente ligada à reposta imune dos Linfócitos Th1, teve uma diminuição estatisticamente significativa no uso da Luz e PDT, entre os grupos tratados com AZ.

Como visto anteriormente, a diminuição de células mononucleares nesses grupos na análise histopatológica, podemos perceber que a PDT e a Luz agem na redução da inflamação crônica, através da diminuição resposta por Linfócitos Th1 em animais submetidos ao modelo de osteonecrose induzida por AZ.

No processo de reparo ósseo, os osteócitos sofrem apoptose e recrutam osteoclastos para reabsorver o osso danificado (DE BARROS SILVA et al., 2016; GEORGE; LIN; SAUNDERS, 2018). O trauma causado, no momento da extração, é crucial para a apoptose dos osteócitos, que é uma característica marcante do osso necrótico (CARDOSO et al., 2018). Os osteócitos injuriados sinalizam aos osteoclastos a necessidade de reabsorção óssea. Esse processo fisiopatológico é chave para o entendimento da osteonecrose, visto que os prótons e enzimas proteolíticas que são liberados para a dissolução do mineral ósseo não podem ser formados quando temos osteócitos ou osteoclastos em processo de apoptose, efeito causado pelos nitrogênios liberados pelos bisfosfonatos (BIGUETTI et al., 2019). O número de osteoclastos com sinais de apoptose nessa pesquisa foi significativamente menor nos grupos experimentais PDT e LUZ, tratados com AZ, quando comparados com os grupos tratados apenas com AZ salina e AZ corante ( $p=0,004$ ).

O uso da PDT demonstrou eficiência no reparo ósseo, sendo aplicado após a extração dentária de ratas senis tratadas com zoledronato, entretanto o número de osteoclastos por  $\text{mm}^2$  não foi alterado, quando comparado com os demais grupos experimentais (ERVOLINO et al., 2019). Apesar do papel dos osteoclastos ser um fator etiopatogênico indispensável para o acometimento da OMB, a inibição da atividade dos osteoclastos não interferiu significativamente no processo. A ação biomoduladora da PDT agindo em outros grupos celulares é sugerida como fator determinante para o processo de reparo tecidual (ERVOLINO et al., 2019).

Corroborando com esses achados, o aumento da atividade celular se deu nos grupos Luz e PDT. Além disso, o número de osteoclastos total do grupo salina ( $19,33\pm 3,26$ ) não diferiu significativamente do grupo tratado com PDT ( $25,40\pm 1,29$ ). Ambos os grupos apresentaram menor número que o grupo tratado com AZ ( $36,67\pm 1,52$ ) e os grupos co-tratados com corante ( $24,83\pm 1,01$ ), luz ( $18,20\pm 2,90$ ) ou PDT ( $19,00\pm 0,97$ ) apresentaram menor número de osteoclastos em comparação ao grupo AZ ( $p=0,002$ ), demonstrando que o número total de osteoclastos não corresponde a um achado vital para eficácia do uso da PDT como tratamento adjuvante da OMB .

## **8. CONCLUSÃO**

Os resultados evidenciam que Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana atenua processo inflamatório crônico e sinais de apoptose devido a uma redução da resposta por Linfócitos Th1 em alvéolos dentários de ratos submetidos a modelo de osteonecrose induzida por ácido zoledrônico. Ademais, os resultados também evidenciam que a laserterapia (fotobiomodulação) parece ter um efeito positivo na redução do processo inflamatório crônico. Mais estudos são necessários a fim de avaliar outros protocolos de terapia fotodinâmicas (diferentes fotossensibilizadores e densidades de energia).

## REFERÊNCIAS

- ADLER, R. A. et al. Managing Osteoporosis in Patients on Long-Term Bisphosphonate Treatment: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 31, n. 1, p. 16–35, 2016.
- AKRAM, Z. et al. Clinical efficacy of photodynamic therapy and laser irradiation as an adjunct to open flap debridement in the treatment of chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 36, n. 1, p. 3–13, 2020.
- APARECIDA CARIOLATTO, F. et al. Recommendations for the Prevention of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, v. 18, n. 2, p. 142–152, 2018.
- AZIZI, A. et al. Comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene Blue on streptococcus mutans bacterial colonies. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, n. April, p. 203–209, 2019.
- BETH-TASDOGAN et al. Interventions for managing medication-related osteonecrosis of the jaw ( Review ) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. **Cochrane Library**, v. CD012432, n. 10, p. 1–56, 2017.
- BIGUETTI, C. C. 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**, v. 14, n. 6, p. 1–22, 2019.
- BLACK, D. M.; ROSEN, C. J. Clinical Practice. Postmenopausal Osteoporosis. **The New England journal of medicine**, v. 374, n. 3, p. 254–62, 2016.
- BOLETTE, A. et al. Influence of induced infection in medication-related osteonecrosis of the jaw development after tooth extraction: A study in rats. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 2, p. 349–356, 2019.
- CANO-DURÁN, J. A. et al. The role of Leucocyte-rich and platelet-rich fibrin (L-PRF) in the treatment of the medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 9, n. 8, p. e1051–e1059, 2017.
- CARDOSO, C. L. et al. Osteoradionecrosis, Osteomyelitis, and Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws: Comparative Histopathological Study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 126, n. 3, p. e170–e171, 2018.

CHILAKAMARTHI, U.; GIRIBABU, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. **Chemical Record**, v. 17, n. 8, p. 775–802, 2017.

CHOI, S. S.; LEE, H. K.; CHAE, H. S. In vitro photodynamic antimicrobial activity of methylene blue and endoscopic white light against *Helicobacter pylori* 26695. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 101, n. 3, p. 206–209, 2010.

CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571–589, 2018.

DA COLLINA, G. A. et al. Oral hygiene in intensive care unit patients with photodynamic therapy: Study protocol for randomised controlled trial. **Trials**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2017.

DE BARROS SILVA, P. G. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 9, p. 1237–1245, 2015.

DE BARROS SILVA, P. G. et al. Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Diseases**, v. 22, n. 7, p. 649–657, 2016.

DE CAMARGO MORAES, P. et al. Tooth alterations in areas of bisphosphonate-induced osteonecrosis. **Clinical Oral Investigations**, v. 19, n. 2, p. 489–495, 2015.

DE SOUZA TOLENTINO, E. et al. Adjuvant therapies in the management of medication-related osteonecrosis of the jaws: Systematic review. **Head and Neck**, v. 41, n. 12, p. 4209–4228, 2019.

EL-RABBANY, M. et al. Effectiveness of treatments for medication-related osteonecrosis of the jaw: A systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Dental Association**, v. 148, n. 8, p. 584- 594.e2, 2017.

ERVOLINO, E. et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. **Bone**, v. 120, n. September 2018, p. 101–113, 2019.

ESTEBAN FLOREZ, F. L. et al. Bioluminescence Analysis of Antibacterial Photodynamic Therapy Using Methylene Blue Mediated by Low-Intensity Level Laser Against Cariogenic Biofilms. **Photomedicine and laser surgery**, v. 36, n. 5, p. 258–265, 2018.

FEEHAN, J. et al. Therapeutic applications of polarized light: Tissue healing and immunomodulatory effects. **Maturitas**, v. 116, n. July, p. 11–17, 2018.

FLIEFEL, R. et al. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: A systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 5, p. 568–585, 2015.

GARCIA, V. G. et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, n. 5, p. 584–594, 2014.

GEORGE, E. L.; LIN, Y. L.; SAUNDERS, M. M. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a mechanobiology perspective. **Bone Reports**, v. 8, n. March, p. 104–109, 2018.

HAFNER, S. et al. Photodynamic Inactivation of *Actinomyces naeslundii* in Comparison with Chlorhexidine and Polyhexanide - A New Approach for Antiseptic Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 74, n. 3, p. 516–522, 2016.

HEGGENDORN, F. L. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Report of a case using conservative protocol. **Special Care in Dentistry**, v. 36, n. 1, p. 43–47, 2016.

HUANG, T. C. et al. Antimicrobial efficacy of methylene blue-mediated photodynamic therapy on titanium alloy surfaces in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, n. August 2018, p. 7–16, 2019.

JIAO, Y. et al. Advancing antimicrobial strategies for managing oral biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v. 11, n. 3, p. 1–11, 2019.

JOSEPH, B. et al. Is antimicrobial photodynamic therapy effective as an adjunct to scaling and root planing in patients with chronic periodontitis? A systematic review. **Biomolecules**, v. 7, n. 4, 2017.

KOTH, V. S. 1 et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: from the sine qua non condition of bone exposure to a non-exposed BRONJ entity. **Dentomaxillofacial radiology pathology and surgery.**, v. 7, n. 45, p. 1–31, 2016.

KUŹNIK, A. et al. Bisphosphonates—much more than only drugs for bone diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 866, n. November, 2020.

KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, n. June, p. 1098–1107,

2018.

LAN, M. et al. Photosensitizers for Photodynamic Therapy. **Advanced Healthcare Materials**, v. 8, n. 13, p. 1–37, 2019.

LEAL, C. R. L. et al. Antimicrobial photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* is altered by glucose in the presence of methylene blue and red LED. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, p. 1–4, 2017.

LEIZAOLA-CARDESA, I. O. et al. Bisphosphonates, vitamin D, parathyroid hormone, and osteonecrosis of the jaw. Could there be a missing link? **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 21, n. 2, p. e236–e240, 2016.

LOPEZ-JORNET, P. et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Is autologous platelet concentrate application effective for prevention and treatment? A systematic review. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 8, p. 1067–1072, 2016.

MAGALHÃES, I. A. et al. Photobiomodulation and antimicrobial photodynamic therapy as adjunct in the treatment and prevention of osteoradionecrosis of the jaws: A case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, n. July, p. 101959, 2020.

MARX, R. E. PAMIDRONATE (AREDIA) AND ZOLEDRONATE (ZOMETA) INDUCED AVASCULAR NECROSIS OF THE JAWS: A GROWING EPIDEMIC. **Social Thought**, v. 61, n. 4, p. 1115–1118, 2003.

MARX, R. E. et al. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: Risk factors, recognition, prevention, and treatment. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 11, p. 1567–1575, 2005.

MASUDA, T.; DENG, X.; TAMAI, R. Mouse macrophages primed with alendronate down-regulate monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) production in response to Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 agonist via Smad3 activation. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 9, p. 1115–1121, 2009.

MÜCKE, T. et al. Bisphosphonate and medication-related osteonecrosis of the jaw: A review. **Seminars in Musculoskeletal Radiology**, v. 20, n. 3, p. 305–314, 2016.

NEMEZIO, M. A. et al. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a *Streptococcus mutans* biofilm model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, n. May, p. 234–237, 2017.

OLIVEIRA, C. C. DE et al. Effects of dexamethasone and nimesulide on

bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: An experimental study. **Archives of Oral Biology**, v. 83, p. 317–326, 2017.

OTTO, S. et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Prevention, diagnosis and management in patients with cancer and bone metastases. **Cancer Treatment Reviews**, v. 69, p. 177–187, 2018.

POLI, P. P. et al. Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in the prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw following dentoalveolar surgery: A case series. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, n. May, p. 117–123, 2019.

RIBEIRO, G. H. et al. Osteonecrosis of the jaws: a review and update in etiology and treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 84, n. 1, p. 102–108, 2018.

ROSA, E. P. et al. Efficacy of photodynamic therapy and periodontal treatment in patients with gingivitis and fixed orthodontic appliances: Protocol of randomized, controlled, double-blind study. **Medicine (United States)**, v. 99, n. 14, 2020.

ROSA, L. P. et al. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy using a 660nm laser and methylene blue dye for inactivating *Staphylococcus aureus* biofilms in compact and cancellous bones: An in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 2, p. 276–281, 2015.

RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw - 2009 update. **Australian Endodontic Journal**, v. 35, n. 3, p. 119–130, 2009.

SARDELLA, A. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws associated with photodynamic therapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, n. 10, p. e314–e316, 2011.

SARKARAT, F. et al. Efficacy of Photodynamic Therapy in Minimizing Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws After Dental Extraction: A Preliminary Animal Study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 77, n. 2, p. 307–314, 2019.

SCOTTI, R. et al. Azul de metileno immobilizado na celulose/TiO<sub>2</sub> e SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>: Propriedades eletroquímicas e planejamento fatorial. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 208–212, 2006.

TABENSKI, L. et al. Antimicrobial photodynamic therapy vs. local minocycline in addition to non-surgical therapy of deep periodontal pockets: a controlled randomized

clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 7, p. 2253–2264, 2017.

TERRA GARCIA, M. et al. Photodynamic therapy mediated by chlorin-type photosensitizers against *Streptococcus mutans* biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 256–261, 2018.

TOKUBO, L. M. et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on *Streptococcus mutans* biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, n. 2010, p. 94–98, 2018.

UDARTSEVA, O. O. et al. Low-dose photodynamic therapy promotes angiogenic potential and increases immunogenicity of human mesenchymal stromal cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 199, n. June, p. 111596, 2019.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 165–173, 2001.

WEBER, J. B. B.; CAMILOTTI, R. S.; PONTE, M. E. Efficacy of laser therapy in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): a systematic review. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 6, p. 1261–1272, 2016.

ZANDI, M. et al. The starting point for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Alveolar bone or oral mucosa? A randomized, controlled experimental study. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 1, p. 157–161, 2017.

# ANEXO 1

**CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE**  
**CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS**

**Unichristus**  
Centro Universitário Christus

Of. No. 002/18

Protocolo da CEUA: 002/18

Pesquisador Responsável: Profa. RAMILLE ARAÚJO LIMA

Título do Projeto: EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA PREVENÇÃO DA OSTEONECROSE INDUZIDA POR ÁCIDO ZOLEDRÔNICO EM RATOS.

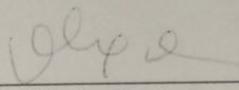
Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE considerou **APROVADO** o projeto supracitado na reunião do dia 27 (vinte e sete) de março de 2018.

Descrição do animal utilizado:

Espécie:	Wistar, macho	Número Amostral:	60
----------	---------------	------------------	----

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 27/03/2019.

Fortaleza, 27 de março de 2018.



Olga Vale Oliveira Machado  
Coordenadora  
CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE

Recebido 1x  
Ramille Lima 30/04/18

Oficina  
Rua Isabel, 1320  
Fortaleza-CE

Campus Dionísio Torres  
Rua Israel Bezerra, 830  
60135-460 - Fortaleza-CE

Campus D. Luis  
Av. Dom Luis, 911  
60160-230 - Fortaleza-CE

Campus Parque Ecológico  
Rua João Adolfo Cargel, 133  
60192-345 - Fortaleza-CE  
Fone: 85.3265.8100 | Fax: 85.3255.8100