



CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS

CURSO DE ODONTOLOGIA

MARIA CLARA MENDES GOMES

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE LESÕES DE OSTEONECROSE DOS
MAXILARES EM ALVÉOLOS DENTÁRIOS DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO
ZOLEDRÔNICO**

FORTALEZA CE

2024

MARIA CLARA MENDES GOMES

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE LESÕES DE OSTEONECROSE DOS MAXILARES
EM ALVÉOLOS DENTÁRIOS DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao curso de Odontologia do
Centro Universitário Christus, como
requisito parcial para obtenção do título
de bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Elisa

FORTALEZA, CE

2024

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)

G633a Gomes, Maria Clara Mendes.
Análise microbiológica de lesões de osteonecrose dos maxilares
em alvéolos dentários de ratos tratados com ácido zoledrônico /
Maria Clara Mendes Gomes. - 2024.
40 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro
Universitário Christus - Unichristus, Curso de Odontologia,
Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Maria Elisa Quezado Lima Verde .

1. ácido zoledrônico. 2. arcada osseodentária. 3. microbiota. 4.
bisfosfonatos. I. Título.

CDD 617.6

MARIA CLARA MENDES GOMES

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE LESÕES DE OSTEONECROSE DOS MAXILARES
EM ALVÉOLOS DENTÁRIOS DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao curso de Odontologia do
Centro Universitário Christus, como
requisito parcial para obtenção do título
de bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Elisa

Aprovado em: ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Maria Elisa Quezado Lima Verde (Orientadora)
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Prof. Dra. Juliana Ximenes Damasceno
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Prof. Dra. Ramille Araújo Lima
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional, e ao meu esposo, pela paciência e compreensão. Sem vocês, essa conquista não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me guiado até aqui, me concedendo discernimento para enfrentar os desafios, sendo sempre fonte de força e sabedoria. Obrigada por ser meu alicerce para que pudesse construir os meus sonhos. Sempre me abrindo caminhos e me conduzindo e me abençoando nessa caminhada durante esses 5 anos.

Agradeço aos meus pais, Maria Vladia e José Heliton, que sempre me incentivaram a buscar o conhecimento e a evoluir. Obrigada por me apoiarem e pelo amor incondicional, por sempre acreditarem em mim. Todos os seus conselhos moldaram meu caráter e seus incentivos me motivaram a seguir meus sonhos. Mesmo diante das dificuldades, nunca me reprimiram e sempre me ensinaram a nunca desistir. Sei que toda essa jornada é o reflexo do apoio e das orações de vocês. Amo vocês!

Ao meu esposo, Luiz Felipe, que é meu maior apoiador e melhor amigo. Obrigada por me motivar diariamente, por acreditar em mim, mesmo quando nem eu mesma acreditava. Obrigada por ser meu abrigo nas horas mais difíceis e meu aconchego nas horas de cansaço. Tenho muita admiração pelo profissional incrível que você é. Obrigada por cuidar da nossa família e por construir, junto comigo, os nossos sonhos com muito cuidado e amor. Amo você!

Agradeço em memória a minha avó Maria Auri, que sempre me apoiou em todos os momentos e me deu colo quando mais precisava, seu sorriso e seu aconchego vai ficar sempre guardado do meu coração, seu exemplo vou levar pro resto da minha vida, bem como todas as suas histórias. A saudade é grande, mas sei que sempre estará comigo me protegendo.

Agradeço aos meus irmãos Shirley, Valéria, Wellison e Georgia, por todo apoio e amor que vocês me dão, amo cada um e vou estar aqui para o que precisarem.

Agradeço à minha dupla, Maria Fernanda, que foi meu apoio em todos os momentos. Uma amiga que levarei para a vida. Você foi meu braço direito, minha parceira não só na clínica, mas também em quase todos os outros projetos. Seu apoio foi fundamental para que todo esse processo acontecesse. Te admiro pela pessoa incrível e forte que você é.

Não poderia deixar de falar do João Emanuel, para completar nosso trio dinâmico, obrigada por todos os momentos compartilhados e por estarem ao meu lado tornando essa jornada mais leve.

Sou imensamente grata ao meu grupo de amigos que estive comigo durante esses 5 anos. À Ayla, minha primeira amiga e parte do meu trio, você foi uma das pessoas que mais

me incentivaram e estiveram ao meu lado em todas as dificuldades. À Nayala, ao Lucas Herculano, ao João Pedro, ao Felipe e à Ana Clara, por serem meu apoio e por compartilharem tantos momentos bons. Cada abraço e cada sorriso de vocês foram essenciais para mim.

Agradeço à minha orientadora, Elisa Lima Verde por confiar em mim, e por me apoiar e me guiar para seguir o caminho certo. Obrigada por me incentivar a crescer na odontologia e por me ajudar a me desenvolver. Tenho imensa admiração por você e sou muito grata por me dar a oportunidade de crescer.

Agradeço à Juliana Ximenes, por aceitar fazer parte da minha banca, e por me orientar, motivar e me dar a oportunidade de fazer parte do grupo NEMO. Sua contribuição fez toda a diferença nesse final de curso, admiro muito a profissional que a senhora, obrigada por me ajudar em todos os momentos que precisei.

Agradeço à professora Ramile por aceitar fazer parte da banca e por todos os ensinamentos, especialmente durante as pesquisas. Admiro muito sua dedicação e paciência para ensinar, a senhora é uma profissional incrível.

E, por fim, agradeço em especial alguns dos meus professores que foram essenciais para meu crescimento: George Candeiro, Vilana Araújo, Edson Cetira, Nadine Guimarães, Mário Lisboa e Daniel Sartorelli, obrigada por todos os ensinamentos. Vocês foram essenciais na minha formação, me deram oportunidades de crescer e me apoiaram em cada passo, seja na iniciação científica, seja nas monitorias. Sou muito grata a cada um de vocês.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

-Robert Collier.

RESUMO

Aminobisfosfonatos são fármacos amplamente utilizados no tratamento de distúrbios osteodegenerativos e metástases ósseas. Um dos principais efeitos adversos da terapia com bisfosfonatos é a osteonecrose dos maxilares (OM). Este trabalho objetivou realizar uma análise microbiológica de lesões de osteonecrose em alvéolos de ratos que foram tratados com ácido zoledrônico. Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) (n=8/grupo) para realização do protocolo. Três administrações semanais (Dias 0, 7, 14) de AZ 0,2 mg/kg ou solução salina, foram realizadas. No dia 42, os animais foram anestesiados (quetamina 80 mg/kg e xilazina 20 mg/kg por via intraperitoneal) e submetidos a exodontia do primeiro molar superior esquerdo. Posteriormente, os animais nos dias 42 (imediatamente após a exodontia), 44, 46 e 48 foram anestesiados e realizadas as coletas microbiológicas. No dia 49, uma administração adicional do tratamento sistêmico (AZ ou solução salina) foi realizada e, no dia 70, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica (3x a dose utilizada para anestesia) para a obtenção de hemimaxilas e posteriores análises radiográficas. Os dados foram expressos em forma de média e erro padrão, submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e comparados por meio dos testes t de Student ou Anova para medidas repetidas seguido do pós teste de Bonferroni. Após análise não foram achadas diferenças significativas no tempo cirúrgico entre os grupos (p=0,395) da sobre o número de fraturas (p=0,791) o peso dos dentes (p=0,795) e sobre a área radiolúcida dos alvéolos (p=0,519), além de não obter diferenças da massa corpórea nos grupos salina (p=0,059) e o no grupo AZ (p=0,087). Em relação as coletas microbiológicas não houve diferenças significativas nas coletas 01 (p= 0,863); coleta 02 (p=0,677) e na coleta 03 (p=0,970). havendo apenas na coleta 04 (p=0,000). A análise das colônias revelou uma diversidade significativa de microrganismos, incluindo tanto fungos na forma de levedura quanto diferentes tipos de bactérias. Desta forma o presente estudo reforça a complexidade e a variabilidade de microrganismos associadas à OM. Entretanto estudos futuros, focados na análise específica dessa microbiota oral são essenciais, para possibilitar a determinação dos possíveis agentes causadores, bem como para desenvolvimento de tratamentos mais direcionados.

Palavras-Chave: ácido zoledrônico; arcada osseodentária; microbiota, bisfosfonatos.

ABSTRACT

Aminobisphosphonates are drugs widely used in the treatment of osteodegenerative disorders and bone metastases. One of the main adverse effects of bisphosphonate therapy is osteonecrosis of the jaw (OM). This study aimed to perform a microbiological analysis of osteonecrosis lesions in alveoli of rats that were treated with zoledronic acid. Male Wistar rats (*rattus norvegicus*) (n = 8/group) were used to perform the protocol. Three weekly administrations (Days 0, 7, 14) of AZ 0.2 mg/kg or saline were performed. On day 42, the animals were anesthetized (ketamine 80 mg/kg and xylazine 20 mg/kg intraperitoneally) and underwent extraction of the upper left first molar. Subsequently, the animals were anesthetized on days 42 (immediately after tooth extraction), 44, 46, and 48, and microbiological collections were performed. On day 49, an additional administration of systemic treatment (AZ or saline) was performed, and on day 70, the animals were euthanized by anesthetic overdose (3x the dose used for anesthesia) to obtain hemimaxillas and subsequent radiographic analyses. The data were expressed as mean and standard error, subjected to the Shapiro-Wilk normality test, and compared using Student's test or ANOVA for repeated measures followed by the Bonferroni post-test. After analyzing, no significant differences were found in surgical time between groups (p = 0.395), in the number of fractures (p = 0.791), in the weight of the teeth (p = 0.795) and in the radiolucent area of the alveoli (p = 0.519), in addition to not obtaining differences in body mass in the saline groups (p = 0.059) and in the AZ group (p = 0.087). Regarding the microbiological collections, there were no significant differences in collections 01 (p = 0.863); collection 02 (p = 0.677) and in collection 03 (p = 0.970), having only in collection 04 (p = 0.000). An analysis of the colonies revealed a significant diversity of microorganisms, including both fungi in the form of yeast and different types of bacteria. Thus, the present study reinforces the complexity and variability of microorganisms associated with OM. However, future studies focused on the specific analysis of this oral microbiota are essential to enable the determination of possible causative agents, as well as the development of more targeted treatments.

Keywords: zoledronic acid; dental arch; microbiota; bisphosphonates.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do tempo cirúrgico, número de fraturas e peso dos dentes.....24

Tabela 2. Resultados de área radiolúcida dos alvéolos.....25

Tabela 3. Resultados da diferença da massa corpórea.....25

Tabela 4. Resultados da contagem das UFCs do grupo salina e do grupo ácido zoledrônico.....26

Tabela 5. Resultados da coloração de gram.....29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1. Osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos e suas manifestações clínicas.	18
3.2. Ácido zoledrônico	19
3.3. Microbioma oral e osteonecrose relacionado a bisfosfonatos	19
4. METODOLOGIA	21
4.1. Aspectos éticos	21
4.2. Animais e grupos experimentais	21
4.3. Protocolo experimental	22
4.3.1. Protocolo de tratamento sistêmico, e exodontia	22
4.3.2. Coleta microbiológica	22
4.3.3. Eutanásia	23
4.5. Análise radiográfica	23
4.6. Análise estatística	24
5. RESULTADOS	25
5.1. Análise da variação de massa corpórea	25
5.2. Análise da dificuldade cirúrgica	25
5.3. Análise radiográfica	26
5.4. Análise microbiológica quantitativa	27
5.5. Análise descritiva macroscópicas das UFCs (Unidades formadoras de colônias). 27	
5.5.1 Análise macroscópica das UFCs no grupo SAL	27
5.5.2 Análise macroscópica das UFCs no grupo AZ.	29

6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXO- PROTOCOLO CEUA.....	41

1. INTRODUÇÃO

A remodelação óssea é um processo necessário para homeostase, onde há o processo de remoção de óssea pelas células osteoclásticas e a deposição por osteoblastos. O desequilíbrio entre estes fatores pode refletir o desenvolvimento de diferentes desordens antirreabsortivas, as quais comumente apresentam superexpressão de fatores relacionados à diferenciação e ativação de osteoclastos, como o RANKL (Kim *et al.*, 2020).

Os bisfosfonatos são empregados no tratamento inúmeras desordens osseodegenerativas como a osteoporose, doença de Paget e o mieloma múltiplo, por apresentarem bons efeitos no que se refere à diminuição do turnover ósseo. Aminobisfosfonatos exercem, ainda, diversos efeitos antitumorais. Dentre eles, cita-se a inibição da adesão da célula tumoral à matriz extracelular, indução da apoptose e inibição da invasão tumoral, bem como efeitos antiangiogênicos. Consistem, portanto, na terapia padrão no manejo de pacientes com mieloma múltiplo e câncer em estágio avançado associado a metástases ósseas. A administração por via endovenosa apresenta maior biodisponibilidade, e evita efeitos adversos no trato gastrointestinal, facilitando a aderência do paciente ao tratamento. São excretados pelos rins, sem sofrer metabolização no fígado. Devido à sua grande afinidade por íons bivalentes, os bisfosfonatos tendem a ligar-se fortemente aos cristais de hidroxiapatita, o que contribui para que cerca de 60% da dose administrada permaneça aderida ao tecido ósseo (Green & Rogers, 2002; Kos, 2014; Weiss *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2006).

Um dos principais efeitos adversos associados à terapia com bisfosfonatos é a Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicamentos (OM), definida como uma exposição óssea ou osso sondável por fístula intra/extraoral, localizados na região maxilo-facial, que persista por mais de 8 semanas na ausência de outra alteração óssea potencial, como é visto na doença óssea metastática ou nas lesões associadas à radioterapia. Além disso, deve-se constatar história de tratamento com agentes antireabsortivos ou antiangiogênicos (Borromeo *et al.*, 2014; Ruggiero *et al.*, 2014).

Apesar de a patogênese da OM não ser inteiramente compreendida, estudos apontam como alguns fatores: i) a diminuição da remodelação tecidual óssea através da supressão osteoclástica, que resulta no acúmulo de microfraturas ósseas, bem como de tecido ósseo não vital; II) diminuição da angiogênese pelo efeito do medicamento utilizado, resultando em

necrose óssea avascular; III) efeitos citotóxicos do medicamento, resultando em um retardo no processo cicatricial envolvendo tecidos moles e duros; iv) aumento da susceptibilidade à infecção óssea; v) desequilíbrio imunológico e baixos índices de oxigenação local (*Ervolino et al.*, 2019).

As taxas de desenvolvimento da osteonecrose estão mais presentes em pacientes oncológicos segundo o estudo de Everts em 2022, tendo uma taxa de 1 a 15%, isto ocorre devido a necessidade de altas doses desses medicamentos durante o tratamento (*Everts-Graber et al.*, 2022). Dentre os fatores de risco para essa desordem, pode-se citar: histórico de trauma recente, principalmente traumas dentoalveolares, como exodontias; algumas condições sistêmicas, tais como hiperparatireoidismo e diabetes; duração da terapia com bisfosfonatos; anatomia do maxilar, uma vez que a densidade do trabeculado ósseo mandibular é maior em relação ao da maxila; sexo do paciente e o tipo de bisfosfonato (*Barasch et al.*, 2011; *Mozzati et al.*, 2012; *Silverman & Landesberg*, 2009; *Tsao et al.*, 2013).

Embora haja diversos fatores relacionados ao desenvolvimento da osteonecrose, ainda existem divergências, especialmente no que diz respeito ao papel da microbiota. Pacientes que utilizam medicamentos associados à osteonecrose, devido à maior suscetibilidade a infecções oportunistas e à vulnerabilidade imunológica, têm o ambiente bucal frequentemente comprometido por infecções, o que pode reduzir o pH oral e favorecer o crescimento bacteriano, prejudicando a cicatrização. Embora se acredite que bactérias como *Streptococcus* e cepas sacarolíticas, além de bactérias gram-negativas, possam contribuir para o desenvolvimento da osteonecrose, ainda não se sabe exatamente quais microrganismos são os principais responsáveis. (*Jelin-Uhlig et al.*, 2024; *Kim et al.*, 2024)

A literatura propõe diversos tratamentos para osteonecrose atualmente, podendo incluir antibioticoterapia local e/ou sistêmica, oxigenoterapia hiperbárica e debridamento cirúrgico, a depender do estágio da doença, visando o controle da dor, evitando infecções secundárias e a prevenindo a progressão da lesão. O manejo de pacientes em uso desses fármacos também exige condutas preventivas, a fim de minimizar os riscos de estabelecimento da OM. (*Natalie H Beth-Tasdogan et al.*, 2022; *Rosella et al.*, 2016)

Diversas abordagens, tanto conservadoras quanto cirúrgicas, são utilizadas no tratamento da osteonecrose dos maxilares. A compreensão da microbiota envolvida e dos mecanismos que levam ao desenvolvimento dessa patologia são fundamentais para orientar o

tratamento adequado. Além disso os estudos já existentes se restringem a análise histomorfológicas, não dando relevância a alterações na microbiota oral. Além disso, o conhecimento da microbiota associada também é essencial para o desenvolvimento de terapias específicas, com foco na redução dos riscos e na melhora da qualidade de vida dos pacientes afetados por essa condição. Assim, é possível implementar estratégias mais eficazes, promovendo uma recuperação mais rápida e um manejo mais eficiente da condição.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho objetiva realizar uma análise microbiológica de lesões de osteonecrose dos maxilares em alvéolos dentários de ratos tratados com ácido zoledrônico.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o impacto do tratamento com ácido zoledrônico na variação de massa corpórea dos animais e na dificuldade cirúrgica das exodontias.
- Analisar, radiograficamente, o impacto do tratamento com ácido zoledrônico no perfil de cicatrização óssea alveolar maxilar pós-exodontia.
- Avaliar, de forma quantitativa e qualitativa, a variação do perfil microbiológico ao longo do tempo após a exodontia dos primeiros molares maxilares de animais tratados com ácido zoledrônico.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos e suas manifestações clínicas.

A OM pode ser desencadeada por diversos medicamentos, incluindo inibidores do ativador do receptor nuclear kappa B e outros anticorpos monoclonais. No entanto, os bisfosfonatos, tanto administrados de forma oral quanto endovenosa, estão associados a uma maior incidência dessa condição. Quando não tratada de forma adequada, a OM pode causar desconforto significativo e prejudicar a função do sistema estomatognático, comprometendo a qualidade de vida do paciente. Apesar disso, esses medicamentos oferecem benefícios no tratamento de distúrbios ósseos, como osteoporose e metástases ósseas. (Kim *et al.*, 2024)

A OM foi descrita pela primeira vez em 2003 e está associada a um efeito adverso causado pelo uso de certos medicamentos, como os bisfosfonatos nos quais são comumente utilizados para distúrbios ósseos, interrompendo a reabsorção e induzindo a apoptose de osteoclastos. Entretanto, podem induzir a necrose e degradação óssea local. Embora a OM já seja conhecida há algum tempo, o seu mecanismo de ação ainda permanece desconhecido, especialmente devido à sua ocorrência limitada à região maxilofacial. Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar seu desenvolvimento, incluindo: Os possíveis efeitos de inflamação ou infecção local, remodelação óssea alterada, inibição da angiogênese, bem como microtraumas e supressão da imunidade do indivíduo. Além disso, a maioria dos casos de osteonecrose dos maxilares está associada a procedimentos desencadeadores prévios, sendo a exodontia um dos principais fatores de risco, especialmente quando associada ao uso desses medicamentos (N. H. Beth-Tasdogan *et al.*, 2022; Cerrato *et al.*, 2021)

A OM é diagnosticada quando o indivíduo apresenta as seguintes características determinantes: estar em tratamento atual ou anterior com agentes antirreabsortivos ou antiangiogênicos, ter presença de osso exposto sem cicatrização por mais de 8 semanas após um procedimento dentário, e não apresentar histórico de radiação na região de cabeça e pescoço, nem evidências de doenças metastáticas nos maxilares. (N. H. Beth-Tasdogan *et al.*, 2022)

De acordo com a Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilofaciais, a OM é classificada em quatro estágios, com base nos sintomas clínicos presentes. O estágio 0 refere-se a indivíduos com início da patologia, mas sem osso exposto. O estágio 1 envolve pacientes

com osso exposto, porém sem sinais de infecção. O estágio 2 caracteriza-se pela presença de infecção e osso exposto. Já o estágio 3 é identificado em pacientes com fratura, fistula ou osteólise que se estende a áreas mais amplas (N. H. Beth-Tasdogan *et al.*, 2022).

3.2. Ácido zoledrônico

O ácido zoledrônico é composto por um anel imidazólico aromático que contém dois átomos de nitrogênio. Também é conhecido como zoledronato, por sua apresentação em pH fisiológico (como um ânion carregado negativamente). Este medicamento é o mais potente da classe dos bisfosfonatos. É classificado como pertencente à terceira geração, sendo comumente utilizado para tratamentos antineoplásicos e antimetastáticos, mas também é utilizado no tratamento da osteoporose. Os protocolos de tratamento para pacientes oncológicos se dão com elevadas doses, sendo em torno de 4 mg/ mês, e quando utilizado para tratamento de osteoporose, possuem doses menores com administração de até 5 mg/ano.(Amigues *et al.*, 2023; Cerrato *et al.*, 2021; Reid *et al.*, 2020)

Assim, o risco para o desenvolvimento de OM está diretamente relacionado à dose do medicamento, sendo mais elevado em pacientes que receberam tratamento com bisfosfonatos para condições neoplásicas malignas, com uma incidência que varia de 1% a 8%. Contrastantemente, em indivíduos tratados com bisfosfonatos para osteoporose, essa incidência é significativamente menor, variando de 0,02% a 0,05%. Vale ressaltar, ainda, que a incidência de OM aumenta significativamente em casos de procedimentos cirúrgicos, sobretudo exodontias (Amigues *et al.*, 2023; Dioguardi *et al.*, 2023)

3.3. Microbioma oral e osteonecrose relacionado a bisfosfonatos

Embora existam alguns fatores mais relatados sobre o desenvolvimento da osteonecrose algumas condições ainda permanecem divergentes. Vários estudos têm levantado questões sobre o papel microbiológico no desenvolvimento da OM, especialmente devido ao perfil dos pacientes que utilizam esses medicamentos, os quais são mais suscetíveis a infecções oportunistas e a uma maior vulnerabilidade imunológica. Além disso, o ambiente bucal desses pacientes, frequentemente afetado por outras infecções, pode contribuir para a diminuição do pH oral, favorecendo o crescimento bacteriano, proporcionando a liberação de ácidos e proteases, bem favorecendo a degradação da matriz óssea. No entanto, não está claramente estabelecido quais microrganismos específicos estão envolvidos nesse processo.(Kim *et al.*, 2024)

Estudos demonstram uma alteração significativa na microbiota, incluindo bactérias e fungos, em indivíduos com OM, o que contribui para a progressão da patologia. Acredita-se ainda que o ambiente ácido da região bucal, propicia à presença de bactérias como *Streptococcus* e outras cepas sacarolíticas, que podem atuar como fatores iniciadores para o desenvolvimento da osteonecrose. Além disso, a presença de bactérias gram-negativas é considerada um possível fator que impacta na diferenciação dos osteoclastos, por produzirem produtos como, lipopolissacarídeos e outros produtos considerados tóxicos. No entanto, essa hipótese ainda não foi confirmada. (Ewald *et al.*, 2021; Jelin-Uhlig *et al.*, 2024)

Estudos demonstram que o tratamento com bisfosfonatos cria melhores acessos para a colonização de bactérias e outros microrganismos patogênicos e facilitam o desenvolvimento OM, além disso, essa hipótese é ainda mais aceita, devido a ocorrência da OM principalmente em regiões que são expostas a flora microbiana, o que fica mais evidente pois os bisfosfonatos se disseminam por todo o corpo. (Ewald *et al.*, 2021)

4. METODOLOGIA

4.1. Aspectos éticos

O presente estudo é fundamentado no princípio dos 3R's (Reduction, Refinement and Replacement), que norteia as condutas éticas de experimentação animal, e foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário Christus, onde obteve a aprovação tendo como número de aprovação 010/24

4.2. Animais e grupos experimentais

Para a realização desta pesquisa, foram utilizados 8 ratos pertencentes à linhagem Wistar (*rattus norvegicus*), com massa corpórea entre 180-200 gramas. Baseado no estudo de BARROS SILVA *et al.*, (2022) que mostrou que o tratamento com fotobiomodulação reduz significativamente o percentual de lacunas de osteócitos vazias em animais tratados com AZ ($80,77 \pm 13,69$ vs $94,65 \pm 1,93$) estima-se necessário avaliar 6 animais por grupo de estudo, a fim de obter uma amostra que rejeite com 80% de poder e 95% de confiança a hipótese nula desse estudo (teste t de Student) (Silva *et al.*, 2022). Tendo em vista a possibilidade de perda de amostra, acresceu-se 20% sobre a amostra calculada, totalizando 8 ratos por grupo de estudo.

Os animais foram oriundos do Biotério do Centro Universitários Christus e mantidos no Biotério em gaiolas apropriadas de polipropileno medindo 49x34x16cm, em número de 3 a 4 animais por caixa, onde foram numerados individualmente através de marcação na cauda, refeitas quando necessário. Além disso, os animais receberam ração comercial balanceada própria e água ad libitum, sendo mantidos em ciclos de luz-escuro de 12 horas, permanecendo nas mesmas condições ambientais ideais de experimentação.

Os grupos experimentais consistiram em:

Grupo SAL: Animais tratados sistemicamente com NaCl 0,9%, por via endovenosa e submetidos às intervenções cirúrgicas do protocolo experimental para indução de OM.

Grupo AZ: Animais tratados com AZ 0,2 mg/kg, por via endovenosa e submetidos às intervenções cirúrgicas do protocolo experimental para indução de OM.

4.3. Protocolo experimental

4.3.1. Protocolo de tratamento sistêmico, e exodontia

Três administrações semanais consecutivas (dias 0, 7 e 14) de AZ 0,2 mg/kg ou solução salina (controle negativo) foram administradas por via intravenosa. Para isso, os animais foram devidamente posicionados em mesa operatória, anestesiados (quetamina 80 mg/kg e xilazina 20 mg/kg por via intraperitoneal) e após a realização da antisepsia com solução de digluconato de clorexidina 0,12%, foi realizada a administração.

Um mês após a última administração de AZ (dia 42), a exodontia do primeiro molar superior esquerdo foi executada, com o mesmo protocolo anestésico utilizado para as administrações. Posteriormente, foi realizada a sindesmotomia do 1º molar inferior esquerdo (com auxílio de sonda exploradora), luxação com uso de espátula Holleback 3S e extração com uso de espátula Lecron-Zalle em movimento de alavanca (Silva *et al.*, 2015).

Todos os procedimentos foram realizados por um mesmo operador (de forma cega e com experiência prévia). Os animais foram semanalmente a partir do início do protocolo para monitoramento das massas corpóreas e, para as exodontias, foram operados em uma sequência aleatorizada. Para análise da dificuldade cirúrgica, foi cronometrado o tempo de cada procedimento. Os dentes removidos foram secos em papel absorvente, pesados em balança de precisão e o número de fraturas radiculares foi contabilizado. Na semana seguinte à exodontia (dia 49), foi administrada uma dose adicional do fármaco ou da solução salina (Silva *et al.*, 2015).

4.3.2. Coleta microbiológica

Para a realização desse protocolo, que pode gerar estresse e desconforto, os animais também foram anestesiados conforme protocolo anestésico descrito nas intervenções anteriores (administrações do fármaco e da exodontia). Foi realizada a coleta microbiológica utilizando cones de papel absorvente (conicidade de 50) embebidos em 1 ml de solução salina estéril (NaCl 0,9%). As coletas foram realizadas nos dias 42 (antes e depois da exodontia), 44 e 46. Os cones de papel absorvente foram então colocados em um tubo estéril contendo 450 µl de solução salina estéril (NaCl 0,9%), com 50µl de inóculo, substância que permite o crescimento bacteriano. As amostras foram homogeneizadas, e 50 µl de cada foram retirados e transferidos para outro tubo estéril contendo 450 µl de solução salina estéril com inóculo (diluição a -1). Esses 500 µl de solução foram novamente homogeneizados e novamente

diluídos de acordo com a necessidade de cada grupo (decisão baseada de acordo com o crescimento microbiológico da coleta anterior).

Cada amostra (20 µl) foi plaqueada em placas de Petri contendo meio de cultura Agar-sangue foram semeadas e incubadas a 37,8°C, com atmosfera de 5% de CO₂, por 48 horas. Posteriormente, as unidades formadoras de colônias (UFC) formadas foram contadas e sua porcentagem calculada (de Araújo *et al.*, 2012).

Além disso, foi realizada a coloração de gram de cada colônia identificada, onde foi feita a coleta de cada colônia bacteriana, fixação em lâminas de vidro e incubação com cristal violeta durante 1 min. Após remoção do excesso da coloração, foi realizada aplicação de Lugol 1% por 1 min, lavagem com descolorante (álcool/acetona) e, em seguida, incubação com fucsina por 30 min, com posterior lavagem com água destilada. Todas as lâminas coradas foram analisadas por microscopia de campo claro.

4.3.3. Eutanásia

Um mês após a exodontia (dia 70), os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica (3x a dose empregada para anestesia) para obtenção de amostras de maxila que foram conservadas em formol a 10% para posterior análise radiográfica. Todo o protocolo experimental está ilustrado na Figura 1, a seguir:

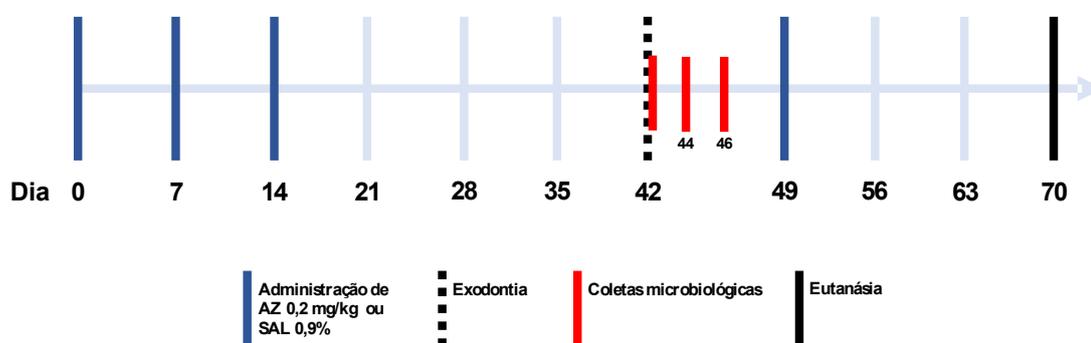


Figura 1. Esquema ilustrativo do protocolo experimental.

4.5. Análise radiográfica

Após 24h da eutanásia e remoção das hemimaxilas cirurgicamente, estas foram posicionadas paralelamente ao filme radiográfico e o posicionador com localizador

perpendicular ao filme, distando 10 cm deste. Para as tomadas radiográficas será 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 imagens foram exportadas para o formato *.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*), considerando como unidade amostral a média aritmética das três medidas. (Silva *et al.*, 2015).

4.6. Análise estatística

Os dados foram expressos em forma de média e erro padrão, submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e comparados por meio dos testes t de Student ou Anova para medidas repetidas seguido do pós teste de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% no software SPSS versão 20.0 para Windows.

5. RESULTADOS

5.1. Análise da variação de massa corpórea

Durante o protocolo experimental, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($p>0.05$), ou quando comparados os dias experimentais do grupo SAL ($p=0,059$) ou AZ ($p=0,087$) (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação de massa corpórea dos animais ao longo dos dias experimentais.

Dia experimental	Massa corpórea		p-Valor ^a
	SAL	AZ	
D0	252.50±9.24	241.67±7.03	0,371
D7	300.25±15.33	278.33±8.23	0,205
D14	323.50±15.97	293.00±9.88	0,122
D21	341.75±19.07	306.67±11.74	0,134
D28	360.00±20.64	327.00±12.93	0,189
D35	380.00±22.03	343.00±13.87	0,171
D42	370.50±28.54	354.33±14.87	0,595
D49	392.00±23.25	351.67±14.47	0,156
D56	420.00±25.83	368.67±16.06	0,111
D63	429.25±25.00	389.17±17.84	0,215
D70	435.50±27.94	388.67±16.55	0,16
p-Valor^b	0,059	0,087	

Legenda: SAL: grupo salina; AZ: grupo ácido zoledrônico; D: dia experimental; ^aTeste t de Student;

^bTeste ANOVA para medidas repetidas/Bonferroni (média±EPM).

5.2. Análise da dificuldade cirúrgica

Os parâmetros de análise de dificuldade cirúrgica consistiram em tempo cirúrgico, quantidade de fraturas radiculares e peso dos dentes. Não houve diferenças significativas entre os grupos considerando o tempo ($p=0,395$) número de fraturas ($p=0,791$) ou peso dos dentes ($p=0,795$) (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação dos parâmetros de dificuldade cirúrgica.

Dificuldade cirúrgica	GRUPO		p-Valor ^a
	SAL	AZ	
Tempo do procedimento (s)	9.30±1.45	8.95±1.29	0,392
Qnt. fraturas radiculares	1.75±0.48	2.00±0.77	0,791
Peso dente (g)	0.02±0.01	0.02±0.01	0,795

Legenda: SAL: grupo salina; AZ: grupo ácido zoledrônico; ^aTeste t de Student (média±EPM).

5.3. Análise radiográfica

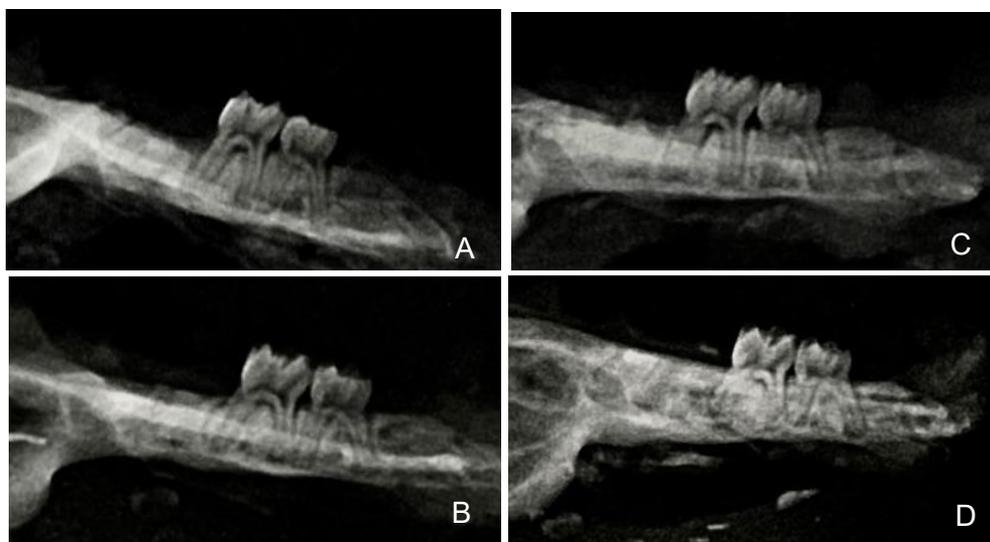
Na análise radiográfica, não houve diferença estatística na mensuração da área radiolúcida correspondente aos alvéolos após a exodontia ($p=0,519$) (Tabela 3).

Tabela 3. Análise radiográfica.

Área radiolúcida (mm ²)	GRUPO		p-Valor ^a
	SAL	AZ	
	31.72±4.31	35.43±3.45	0,519

Legenda: SAL: grupo salina; AZ: grupo ácido zoledrônico; ^aTeste t de Student (média±EPM).

Ilustração 1. Radiografia das maxilas



Legenda: (A) Radiografia SAL 2; (B) Radiografia SAL1; (C) Radiografia AZ5; (D) Radiografia AZ6..

5.4. Análise microbiológica quantitativa

Com relação a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), não houve diferença significativa entre os grupos nas coletas 01 ($p=0,863$); 02 ($p=0,677$) e 03 ($p=0,970$). No entanto, na coleta 4, o grupo AZ apresentou uma quantidade superior de UFCs comparado ao grupo SAL ($p=0,000$) (Tabela 4).

Ao longo dos dias, o grupo SAL mostrou uma homogeneidade na quantidade de UFCs ($p=0,244$). Já no grupo AZ, a quantidade de UFCs aumentou significativamente na coleta 4 (quando comparada à coleta 1) ($p<0,026$) (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados da contagem das UFC do grupo salina e do grupo ácido zoledrônico.

	UFC		p-Valor ^a
	SAL	AZ	
Coleta 1	2.82±0.25	2.89±0.30	0,863
Coleta 2	3.34±0.37	3.53±0.22	0,677
Coleta 3	4.29±0.11	4.30±0.16	0,970
Coleta 4	4.24±0.14	5.30±0.07*	0,000
p-Valor^b	0,244	0,026	

Legenda: SAL: grupo salina; AZ: grupo ácido zoledrônico; D: dia experimental * $p<0,05$ versus coleta 1; ^aTeste t de Student; ^bTeste ANOVA para medidas repetidas/Bonferroni (média±EPM).

5.5. Análise descritiva macroscópicas das UFCs (Unidades formadoras de colônias)

5.5.1 Análise macroscópica das UFCs no grupo SAL

Nas coletas do grupo salina foram apresentados ao total 11 padrões de colônias a qual foram descritas a seguir:

Na amostra Salina 01, foram identificados 3 padrões de colônias, denominados como: Colônia 01, que se caracterizou por ser muito pequeno, de forma pontiforme, coloração branca, levemente elevada e sem hemólise. Além disso, estavam presentes as colônias 2.1 e 2.2, ambas de tamanho pequeno a médio, com região central elevada, coloração branca e bordas transparentes. A diferença entre elas estava na presença de hemólise: a colônia 2.1

realizou hemólise, enquanto a colônia 2.2 não apresentou hemólise. Por fim, a colônia 3, também presente, tinha características circulares, coloração branca, era plana, uniforme, brilhante e realizava hemólise. Nesta amostra, houve uma maior presença de colônias do tipo 01.

Na Coleta 02 da mesma amostra, apresenta-se as colônias 1, 2.1 e 3. No entanto, uma nova colônia foi identificada e designada como colônia 4. A colônia 4 apresentava tamanho médio, coloração amarelada, era bem elevada, brilhante e realizava hemólise. Nesta coleta houve maior presença de colônias do tipo 01 e do tipo 2.1.

Na Coleta 03, encontrou a presença da colônia 01 e, além desta, foi identificada a colônia 11, que se apresentou de forma circular, plana, de tamanho médio a pequeno, e realizou hemólise. Também foi observada a presença da colônia 12, que tinha formato plano, disforme e coloração acinzentada. Além disso, nesta coleta, todas as placas apresentaram mudança de cor, o que sugere o possível crescimento de microrganismos fastidiosos. Nesta coleta, houve maior presença das colônias do tipo 11.

Na coleta 04 permaneceu a presença de colônia do tipo 12, tendo também a presença de colônias identificadas como 13 a qual possuía coloração branca, elevada e de aspecto verrucóide. Além desta, foram observadas também colônias denominadas de 14 a qual eram pequenas de coloração branco acinzentadas e não fazia hemólise aparente, sendo levemente elevadas. Nesta coleta houve uma presença de forma significativa da coleta 12.

Na amostra salina 02 coleta 01 foram identificadas colônias do tipo 1; 2.1 e 2.2 e 3, permanecendo esse perfil na coleta 02. Esse padrão se modificou apenas na coleta 03, com a identificação de colônias do tipo 11 a qual obteve maior predominância nesta coleta e na coleta 04 onde além desta foram observadas também as colônias 12 e 13.

Na amostra Salina 03, na Coleta 01, apresentam-se como colônias dos tipos 2.1 e 1, sendo estas as mais predominantes. Além disso, foi identificada a colônia do tipo 5, que se caracterizava por ser circular, amarelada, plana e levemente elevada, sem realizar hemólise. Também foi observada a presença de colônias do tipo 6, que tinham formato circular, disforme, de grande porte, e coloração cinza, lembrando-se a uma alga unicelular. Na Coleta 02, o padrão das colônias foi o mesmo, com maior predominância das colônias do tipo 01. Já nas Coletas 03 e 04, o perfil das colônias se modificou, apresentando como colônias dos tipos 11, 12 e 13, sendo as colônias 11 e 12 como mais predominantes, respectivamente.

Na amostra Salina 04, observou-se a reprodução do padrão de colônias nas Coletas 01 e 02, com a presença das colônias 2.1 e 2.2. Já na Coleta 03, foram identificadas as colônias 11, 12 e 13, com maior prevalência das colônias 11. E por fim na coleta 04 manteve-se colônias 11 e 13 com a presença da colônia 01, na qual foi mais prevalente.

Em suma, no grupo SAL, observou-se um predomínio das colônias 01 e 2.1 na coleta 01, sendo repetido o mesmo padrão na coleta 2, já na coleta 3 houve maior predomínio principalmente da colônia 11 e por fim as colônias na coleta 4 maior predomínio de colônias 11 e 12.

5.5.2 Análise macroscópica das UFCs no grupo AZ.

Nas coletas do AZ foram apresentados ao total 14 padrões de colônias a qual foram descritas a seguir:

Na amostra AZ 01 na coleta 01 foram encontradas colônias 1; 2.1; 2.2; 3 e colônias denominadas de 08 na qual está colônia se assemelhava a número 03 porém era mais elevada e não fazia hemólise. Esse padrão se repetiu na coleta 02 tendo maior prevalência nas coletas das colônias 1 e 2.2 respectivamente.

Na coleta 01 na amostra AZ2 houve uma continuação da presença das colônias 1; 2.1; 2.2 e 6 somente diferindo da coleta 02 pela presença da colônia 06 a qual não havia presente nesta coleta.

Na amostra AZ 03 na coleta 01 e 02 houve a presença do mesmo padrão sendo observadas as colônias 01; 2.1 e 2.2, obtendo maior prevalência da colônia 01 em ambas as coletas.

Na amostra AZ 05 na coleta 01 e 02 houve também a presença do mesmo padrão sendo observadas as colônias 01; 2.1 e 2.2. Entretanto, o que diferem é a presença da colônia 5 e 10 na coleta 02, onde a colônia 10 se caracteriza pelo aspecto circular, plano com coloração amarelo-rosa, grande e com o centro mais pigmentado. Nesta coleta houve uma maior significância na colônia 2.2.

Na coleta 03 Houve a repetição do mesmo padrão de colônias, e neste caso houve além disso a mudança de coloração das placas, onde a mesma ficou mais escurecida parecendo agar chocolate e com presença de mau cheiro, na qual sugere crescimento de

fastigiosas. Nesta coleta houve a observação de colônias do tipo 12 ; 13 e 14 a qual a última se caracterizava por uma colônia pequena, branca acinzentada, sem hemólise aparente, levemente elevada (sendo mais para plana).

Na coleta 04 houve uma mudança de padrão de acordo com a amostra, contendo na amostra AZ1 a presença de colônias 13 e colônias 16, na qual está são semelhantes a descrição da colônia 11 porém fazem hemólise, além desta foi observado colônias do tipo 1.1 que eram semelhantes a 01, porém fazem hemólise. Já nas amostras AZ2; AZ3 e AZ5 houve a repetição das colônias 16 e 1.1.

Em suma, no grupo AZ, observou-se um predomínio das colônias 01 e 2.2 na coleta 01, colônias 01 e 2.1 na coleta 2, já na coleta 3 houve maior predomínio principalmente da colônia 14 e por fim as colônias na coleta 4 maior predomínio de colônias 1.1.

5.6 Resultado da coloração de gram das colônias.

Os resultados da coloração de gram estão listados na Tabela 05, a seguir:

Tabela 5. Análise descritiva da coloração de Gram.

Colônias	Resultado da coloração de Gram
Colônia 01	Bacilar gram positivos
Colônia 1.1	Estreptobacilos gram positivos ou leveduras
Colônia 2.1	Streptococcus gram positive
Colônia 2.2	Diplococos, cocos isolados gram positivos
Colônia 03	Fungos gram positivos
Colônia 04	Fungos gram positivos (semelhante à colônia 03)
Colônia 05	Bacilos gram negativos
Colônia 06	Bacilos gram negativos
Colônia 07	Padrão semelhante a fungo
Colônia 08	Fungos gram positivos (semelhante a colônia 03 e 04)
Colônia 09	Padrão compatível com fungo (levedura)
Colônia 10	Padrão compatível com fungo (levedura)
Colônia 11	Padrão compatível com fungo (levedura)
Colônia 12	Padrão compatível com fungo (levedura)
Colônia 13	Bacilos gram negativos
Colônia 14	Padrão compatível com fungo (levedura)
Colônia 15	Bacilos gram negativos
Colônia 16	Bacilos gram negativos

6. DISCUSSÃO

A literatura apresenta uma diversidade de modelos experimentais para o estudo da OM (Yan et al., 2022). O presente estudo consistiu em uma adaptação de um modelo publicado em 2015 e, desde então, amplamente utilizado, o qual replica um esquema terapêutico antineoplásico com zoledronato e, após a realização do procedimento e de um *drug holiday*, há a continuidade do tratamento e, ainda assim, o estabelecimento da OM (Silva et al., 2015).

No presente estudo, no entanto, o procedimento de exodontia foi realizado em maxila, região menos propensa ao desenvolvimento de OM, quando comparada à mandíbula. Por isso, diferentemente dos estudos cujas lesões de OM foram induzidas em mandíbula, a ação do fármaco não foi suficiente para aumentar o grau de dificuldade cirúrgica dos procedimentos (de Barros Silva et al., 2019; de Barros Silva et al., 2017; Silva et al., 2015).

Estudos evidenciam que os bisfosfonatos apresentam maior afinidade por áreas de osso cortical e por áreas onde há maior remodelação óssea, tais como mandíbula e fêmur (Wang et al., 2024). Infere-se, portanto, que a ausência de repercussão do tratamento com AZ na dificuldade cirúrgica evidenciados neste estudo pode estar relacionada ao fato de a maxila apresentar uma menor densidade mineral óssea, quando comparada à mandíbula.

Da mesma forma, modelos experimentais de exodontia em mandíbula de roedores tratados com AZ evidenciam, radiograficamente, uma ausência de áreas sugestivas de formação óssea e um aumento da área radiolúcida/hipodensa e diminuição da densidade mineral óssea na região alveolar (de Barros Silva et al., 2019; de Barros Silva et al., 2017; Lima-Verde et al., 2023; Silva et al., 2015). A densidade mineral óssea é um parâmetro amplamente utilizado em avaliações radiográficas por tomografia. Já nas radiografias digitais, como a do presente estudo, comumente se utiliza a área radiolúcida correspondente ao alvéolo pós-exodontia. As radiografias digitais apresentam diversas vantagens, como baixo custo de utilização, e são amplamente utilizadas em estudos publicados anteriormente. No entanto, dada a menor densidade mineral óssea do osso maxilar, sugere-se, que maiores variações na densidade mineral óssea possam não ter sido sensíveis à análise bidimensional do presente estudo, fazendo-se necessária uma análise tridimensional, mais minuciosa e menos sujeita a vieses de sobreposição, como por exemplo a análise microtomográfica, para uma melhor avaliação do impacto do tratamento com AZ no osso maxilar (Lima-Verde et al., 2023).

Ainda assim, no presente estudo, foi possível identificar um aumento significativo de UFC no grupo AZ no 5º dia (coleta 4) após a exodontia (quando comparado ao grupo SAL, bem como quando comparado à coleta 1 do grupo AZ). Esse aumento indica uma maior colonização bacteriana nas lesões de OM com o passar do protocolo experimental. Além disso, foi possível observar uma variedade de colônias presentes, tanto de fungos na forma de levedura quanto de bactérias. As bactérias gram-positivas estiveram principalmente presentes nos primeiros dias de coleta, enquanto as bactérias gram-negativas mostraram um aumento progressivo ao longo dos dias

A literatura evidencia uma participação importante da microbiota oral na progressão da OM, destacando não só a presença de bactérias como também de fungos. Além disso, observa-se um aumento no perfil de *Actinomyces*, uma bactéria anaeróbica não facultativa, gram-positiva, comumente encontrada na cavidade oral. O estudo de Pushalka (2014), também demonstrou a proliferação de fungos do tipo levedura, bem como a formação de biofilme com predominância de bactérias (Pushalkar *et al.*, 2014) (Cerrato *et al.*, 2021).

Além disso, no estudo de Jiang (2002), observou-se que as bactérias presentes na cavidade bucal de pacientes que apresentam lesões de OM podem estimular a osteólise do tecido ósseo independentemente da ação dos osteoblastos. Esse processo é mediado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias locais, promovendo a osteoclastogênese e a progressão da OM (Jiang *et al.*, 2002).

No estudo de Ewald (2021), que analisou microbiologicamente lesões em pacientes com osteonecrose, foi possível identificar, nas 116 amostras coletadas, um total de 43 gêneros bacterianos e 6 tipos de fungos. Os gêneros mais frequentes foram *Streptococcus* spp., *Neisseria* spp., *Lactobacillus* spp. e *Staphylococcus* coagulase-negativo. A presença de leveduras foi observada em 25 dos pacientes (Ewald *et al.*, 2021). Já no estudo de Uhlig, em 2024, após a análise de amostras de pacientes com câncer e a realização de PCR, foi identificado um total de 20 gêneros bacterianos em pacientes com osteonecrose. Entre eles, os gêneros predominantes foram *Pseudoramibacter alactolyticus* e *Streptococcus mitis*. E no grupo controle, foram observados *Lactobacillus gasseri* e *Streptococcus mutans* (Jelin-Uhlig *et al.*, 2024).

Sedghizadeh (2012), em seu estudo, observou que a maioria da microbiota bacteriana presente em pacientes afetados por osteonecrose era composta por bactérias anaeróbias

facultativas, o que facilita a colonização em regiões de osso necrótico, que possuem um aporte sanguíneo limitado e, conseqüentemente, baixo nível de oxigênio. Além disso, o estudo demonstrou que pacientes com OM apresentam perfis bacterianos distintos daqueles de pacientes saudáveis, com uma maior diversidade e carga bacteriana nos pacientes afetados (Sedghizadeh *et al.*, 2012).

Assim, a literatura evidencia estudos com resultados contrastantes no que tange ao perfil microbiológico das lesões de OM observadas em pacientes. No entanto, observa-se a mesma disbiose constatada neste estudo, em relação ao perfil de bactérias gram negativas e gram positivas (Ewald *et al.*, 2021; Pushalkar *et al.*, 2014). Além disso, no estudo Jabbour, em 2016, foi observado um aumento significativo das UFC nas lesões de OM e em áreas adjacentes dos sítios da lesão (Jabbour *et al.*, 2016), o que corrobora com os resultados deste estudo.

A realização das coletas microbiológicas para uma análise temporal, em diferentes momentos após a realização da exodontia, pode contribuir para uma melhor compreensão da evolução dessa disbiose e, assim, guiar condutas terapêuticas preventivas. Assim, o presente estudo contribui fortemente para a área, impulsionando futuros estudos destinados à identificação e especificação dessas colônias bacterianas, a fim de melhor direcionar condutas clínicas e protocolos terapêuticos antimicrobianos.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que, apesar de não apresentar impacto direto na variação de massa corpórea, na dificuldade cirúrgica ou parâmetros radiográficos dos alvéolos pós-exodontia, o tratamento com AZ exerce um impacto significativo na progressão da colonização microbiana (UFC) dos alvéolos pós-exodontia a partir do 5º dia pós-operatório.

A análise das colônias revelou uma diversidade significativa de microrganismos, incluindo tanto fungos (em forma de leveduras) quanto diferentes tipos de bactérias, os quais apresentaram um aumento progressivo ao longo do protocolo experimental. Esses achados reforçam a complexidade e a variabilidade de microrganismos associadas à OM, além da importância de uma análise microbiológica mais específica, a fim de melhor compreender e direcionar protocolos de tratamento para esta condição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIGUES, C. et al. Zoledronate and osteonecrosis of the jaw in osteoporosis: incidence and risk factors. Analysis of the French Pharmacovigilance Database. **Joint Bone Spine**, v. 90, n. 6, p. 105599, Paris, França, dez. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2023.105599>. Acesso em: 25 ago. 2024.

BARASCH, A. et al. Risk factors for osteonecrosis of the jaws: a case-control study from the CONDOR dental PBRN. **J Dent Res**, v. 90, n. 4, p. 439-444, Chicago, EUA, abr. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0022034510397196>. Acesso em: 15 set. 2024.

BETH-TASDOGAN, N. H. et al. Interventions for managing medication-related osteonecrosis of the jaw. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 7, n. 7, p. Cd012432, Londres, Reino Unido, jul 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012432.pub3>. Acesso em: 25 ago. 2024.

BORROMEO, G. L. et al. A large case-control study reveals a positive association between bisphosphonate use and delayed dental healing and osteonecrosis of the jaw. **J Bone Miner Res**, v. 29, n. 6, p. 1363-1368, Bethesda, EUA, jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbmr.2179>. Acesso em: 19 fev. 2024.

CERRATO, A. et al. Actinomyces and MRONJ: A retrospective study and a literature review. **J Stomatol Oral Maxillofac Surg**, v. 122, n. 5, p. 499-504, Paris, França, nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2020.07.012>. Acesso em: 25 ago. 2024.

DE ARAÚJO, F. R. G. et al. Perialveolar bacterial microbiota and bacteraemia after dental alveolitis in adult rats that had been subjected to neonatal malnutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 7, p. 996-1005, Brasil, ago. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S000711451100393X>. Acesso em: 25 ago. 2024.

DE BARROS SILVA, P. G. et al. Chronic treatment with zoledronic acid alters the expression levels of inflammatory, bone, and apoptotic markers and Toll-like receptors 2 and 4 in rat dental pulp. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, St, v. 128, n. 2, p. 139-

145, Brasil, ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2019.01.069>. Acesso em: 15 set. 2024.

DE BARROS SILVA, P. G. et al. Immune cell profile of dental pulp tissue treated with zoledronic acid. **Int Endod J**, v. 50, n. 11, p. 1067-1076, Brasil, nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12734>. Acesso em: 26 set. 2024.

DIOGUARDI, M. et al. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis complications in patients undergoing tooth extraction: a systematic review and literature updates. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 27, n. 13, p. 6359-6373, Bologna, Itália, jul. 2023. Disponível em: https://doi.org/10.26355/eurrev_202307_32996. Acesso em: 15 set. 2024.

ERVOLINO, E. et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. **Bone**, v. 120, p. 101-113, Amsterdam, Países Baixos, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.10.014>. Acesso em: 25 ago. 2024.

EVERTS-GRABER, J. et al. Risk of osteonecrosis of the jaw under denosumab compared to bisphosphonates in patients with osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v. 37, n. 2, p. 340-348, EUA, fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbmr.4472>. Acesso em: 19 fev. 2024.

EWALD, F. et al. Retrospective analysis of bacterial colonization of necrotic bone and antibiotic resistance in 98 patients with medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). **Clin Oral Investig**, v. 25, n. 5, p. 2801-2809, Alemanha, mai. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03595-9>. Acesso em: 25 ago. 2024.

GREEN, J. R.; ROGERS, M. J. Pharmacologic profile of zoledronic acid: a highly potent inhibitor of bone resorption. **Drug Development Research**, v. 55, n. 4, p. 210-224, EUA, jun. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ddr.10071>. Acesso em: 26 set. 2024.

JABBOUR, Z. et al. Profile of bacteria colonizing the exposed bone of patients with anti-osteoclastic drug-related osteonecrosis of the jaws. **Can J Microbiol**, v. 62, n. 9, p. 772-780,

Canadá, set. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0212>. Acesso em: 15 set. 2024.

JELIN-UHLIG, S. et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw and oral microbiome: clinical risk factors, pathophysiology and treatment options. **Int J Mol Sci**, v. 25, n. 15, Suíça, 24 jul. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25158053>. Acesso em: 19 fev. 2024.

JIANG, Y. et al. Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. **Infect Immun**, v. 70, n. 6, p. 3143-3148, EUA, jun. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.70.6.3143-3148.2002>. Acesso em: 25 ago. 2024.

KIM, H. Y. et al. Can medication-related osteonecrosis of the jaw be attributed to specific microorganisms through oral microbiota analyses? A preliminary study. **BMC Oral Health**, v. 24, n. 1, p. 160, Reino Unido, fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9092073>. Acesso em: 15 set. 2024.

KIM, J. M. et al. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. **Cells**, v. 9, n. 9, Suíça, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5114/aoms.2014.40738>. Acesso em: 19 fev. 2024.

KOS, M. Association of dental and periodontal status with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a retrospective case-controlled study. **Arch Med Sci**, v. 10, n. 1, p. 117-123, Polônia, fev. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5114/aoms.2014.40738>. Acesso em: 26 set. 2024.

LIMA-VERDE, M. E. Q. et al. Zoledronate treatment exerts sex-independent effects on bone and dental physicochemical properties in mice jaw necrosis. **J Bone Miner Metab**, v. 41, n. 6, p. 760-771, Brasil, nov. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00774-023-01465-4>. Acesso em: 25 ago. 2024.

MOZZATI, M.; ARATA, V.; GALLESIO, G. Tooth extraction in patients on zoledronic acid therapy. **Oral Oncol**, v. 48, n. 9, p. 817-821, Reino Unido, set. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.03.009>. Acesso em: 15 set. 2024.

PUSHALKAR, S. et al. Oral microbiota and host innate immune response in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Int J Oral Sci**, v. 6, n. 4, p. 219-226, Japão, dez. 2014.

Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.46>. Acesso em: 10 out. 2024.

REID, I. R. et al. Zoledronate. **Bone**, v. 137, p. 115390, EUA, ago. 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115390>. Acesso em: 10 out. 2024.

ROSELLA, D. et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and practical guidelines. **J Int Soc Prev Community Dent**, v. 6, n. 2, p. 97-104, Índia, mar.-abr. 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.4103/2231-0762.178742>. Acesso em: 19 fev. 2024.

RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw - **Update. Journal of Oral and**

Maxillofacial Surgery, v. 72, n. 10, p. 1938-1956, EUA, out. 2014. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.joms.2014.04.031>. Acesso em: 10 out. 2024.

SEDGHIZADEH, P. P. et al. Metagenomic investigation of microbes and viruses in patients with jaw osteonecrosis associated with bisphosphonate therapy. **Oral Surg Oral Med Oral**

Pathol Oral Radiol, v. 114, n. 6, p. 764-770, EUA, dez. 2012. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.08.444>. Acesso em: 10 out. 2024.

SILVA, P. G. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 9, p. 1237-1245, Brasil, set.

2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.015>. Acesso em: 25 ago. 2024.

SILVERMAN, S. L.; LANDESBURG, R. Osteonecrosis of the jaw and the role of bisphosphonates: a critical review. **Am J Med**, v. 122, n. 2 Suppl, p. S33-45, EUA, fev. 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2008.12.005>. Acesso em: 19 out. 2024.

TSAO, C. et al. Oral health risk factors for bisphosphonate-associated jaw osteonecrosis. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 71, n. 8, p. 1360-1366, EUA, ago. 2013. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.joms.2013.02.016>. Acesso em: 19 fev. 2024.

WANG, Y. et al. Effect of bisphosphonate on bone microstructure, mechanical strength in osteoporotic rats by ovariectomy. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 25, n. 1, p. 725, Reino Unido, set. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/dmd.108.021071>. Acesso em: 19 fev. 2024.

WEISS, H. M. et al. Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid. **Drug Metab Dispos**, v. 36, n. 10, p. 2043-2049, EUA, out. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/dmd.108.021071>. Acesso em: 25 ago. 2024.

WOO, S. B. et al. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 753-761, EUA, mai. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00009>. Acesso em: 19 fev. 2024.

YAN, R. et al. Establishment and assessment of rodent models of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). **Int J Oral Sci**, v. 14, n. 1, p. 41, China, 10 ago. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41368-022-00182-4>. Acesso em: 25 ago. 2024.

ANEXO- PROTOCOLO CEUA

CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE
CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS



Of. No. 010/24

Protocolo da CEUA: 010/24

Pesquisador Responsável: MARIA ELISA QUEZADO LIMA VERDE

Título do Projeto: INFLUÊNCIA DA COMBINAÇÃO ENTRE FOTOBIMODULAÇÃO E TERAPIA FOTODINÂMICA NA CICATRIZAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA EM RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

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 02 (dois) de abril de 2024.

Descrição do animal utilizado:

Espécie:	<i>Rattus Novergicus</i> (Ratos Swiwtas) Machos entre 180-200g	Número Amostral:	50
----------	--	------------------	----

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 02/04/2025.

Fortaleza, 02 de abril de 2024.

Olga Vale Oliveira Machado
Coordenadora

CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE