



**CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS - UNICHRISTUS**  
**CURSO DE ODONTOLOGIA**

**LUCAS SANTOS DA COSTA**

**INFLUÊNCIA DA COMBINAÇÃO ENTRE FOTOBIMODULAÇÃO E TERAPIA  
FOTODINÂMICA NO PERFIL MICROBIOLÓGICO DE ALVÉOLOS DENTÁRIOS  
PÓS-EXODONTIA DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

**FORTALEZA**

**2025**

LUCAS SANTOS DA COSTA

INFLUÊNCIA DA COMBINAÇÃO ENTRE FOTOBIMODULAÇÃO E TERAPIA  
FOTODINÂMICA NO PERFIL MICROBIOLÓGICO DE ALVÉOLOS DENTÁRIOS PÓS-  
EXODONTIA 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.

Orientador: Prof. Dra. Maria Elisa  
Quezado Lima Verde

FORTALEZA

2025

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)

C837i Costa, Lucas Santos da.  
Influência da combinação entre fotobiomodulação e terapia  
fotodinâmica no perfil microbiológico de alvéolos dentários  
pós-exodontia de ratos tratados com ácido zoledrônico : Estudo  
experimental / Lucas Santos da Costa. - 2025.  
39 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro  
Universitário Christus - Unichristus, Curso de Odontologia,  
Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Maria Elisa Quezado Lima Verde .

1. Bisfosfonatos. 2. Osteonecrose Associada a Bisfosfonatos. 3.  
Terapia com Luz de Baixa Intensidade. 4. Microbiota. I. Título.

CDD 617.6

LUCAS SANTOS DA COSTA

INFLUÊNCIA DA COMBINAÇÃO ENTRE FOTOBIMODULAÇÃO E TERAPIA  
FOTODINÂMICA NO PERFIL MICROBIOLÓGICO DE ALVÉOLOS DENTÁRIOS PÓS-  
EXODONTIA 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.

Orientador: Prof. Dra. Maria Elisa  
Quezado Lima Verde

Aprovado em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ramille Araújo Lima  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

---

Prof. Dr. João Emanuel Sousa de Almeida  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em cada passo da minha jornada (Lucas Santos).

## RESUMO

A osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos (OMM) é uma condição multifatorial, com forte associação ao uso de ácido zoledrônico (AZ), caracterizada por necrose óssea persistente, disbiose e inflamação crônica. Diante disso, terapias adjuvantes como a fotobiomodulação (FBM) e a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) têm sido estudadas por sua capacidade de modular a resposta inflamatória e reduzir a carga microbiana. O presente estudo teve como objetivo avaliar influência da FBM e aPDT, de forma isolada e combinada no perfil microbiológico ao longo do tempo em ratos submetidos a tratamento com AZ pós-exodontia com periodontite induzida. Para isso, 50 animais foram divididos em cinco grupos (n=10): os não tratado com AZ e simulação das terapias a laser (SHAM), grupo SAL/SHAM, e tratado com AZ, grupo AZ/SHAM, FBM, aPDT e DUP (FBM+aPDT). Todos os animais foram submetidos à indução de periodontite no dia 21, a partir da ligadura nos primeiros molares inferiores, no dia 42, a exodontia foi realizada nos primeiros molares inferior que permanecia com ligadura, sendo realizado posteriormente o tratamento ou não com as terapias nos dias 42 (pós exodontia), 44 e 46. As coletas microbiológicas foram subsequentes a exodontia e as terapias, sendo analisadas de acordo com as unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml), com a eutanásia ocorrendo no dia 70. A análise microbiológica revelou que os grupos tratados com FBM, aPDT e DUP apresentaram diferença significativa das UFC/ml nas coletas 2 e 3 em comparação ao grupo AZ. A terapia aPDT isolada demonstrou a maior redução das colônias gram-negativas entre a coleta 1 ( $2,11 \pm 2,48$ ) e a coleta 4 ( $0,96 \pm 1,93$ ). O grupo FBM também apresentou redução entre a coleta 3 ( $3,08 \pm 3,98$ ) e a coleta 4 ( $1 \pm 2$ ). O grupo DUP, apesar de resultados promissores nas coletas iniciais, apresentou aumento progressivo de UFC/ml gram-negativas nas coletas 3 ( $3,72 \pm 5,54$ ) e 4 ( $3,40 \pm 4,85$ ). Na análise quantitativa, observou-se predominância de colônias de estreptococos gram-positivos (colônias 2 e 6). Conclui-se que FBM e aPDT, isoladamente, foram eficazes na redução de UFC/ml gram-negativas, mas a combinação das terapias (grupo DUP) apresentou limitação na contenção de cepas mais resistentes nas fases tardias. A prevalência de colônias de estreptococos gram-positivos, embora comensais, podem atuar como oportunistas em ambientes necróticos. A persistência de colônias patogênicas e o padrão disbiótico observado reforçam a necessidade de abordagens terapêuticas que integrem disrupção mecânica do biofilme, controle antimicrobiano e modulação inflamatória para um manejo mais eficaz da OMM.

**Palavras-chave:** Bisfosfonatos; Osteonecrose Associada a Bisfosfonatos; Terapia com Luz de Baixa Intensidade; Microbiota.

## ABSTRACT

Medication-related osteonecrosis of the jaw (OMM) is a multifactorial condition strongly associated with the use of zoledronic acid (ZA), characterized by persistent bone necrosis, dysbiosis, and chronic inflammation. In light of this, adjunctive therapies such as photobiomodulation (PBM) and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) have been investigated for their ability to modulate the inflammatory response and reduce microbial load. This study aimed to evaluate the effects of PBM and aPDT, both individually and in combination, on the microbiological profile over time in rats treated with ZA after tooth extraction with induced periodontitis. Fifty animals were divided into five groups (n = 10): untreated with ZA and submitted to laser therapy simulation (SHAM), SAL/SHAM group, and ZA-treated groups: AZ/SHAM, PBM, aPDT, and DUP (PBM + aPDT). All animals underwent periodontitis induction on day 21 by placing ligatures around the first lower molars. On day 42, tooth extraction was performed on the ligature-retained lower first molars, followed by therapeutic interventions or not on days 42 (post-extraction), 44, and 46. Microbiological samples were collected after extraction and treatments, and analyzed based on colony-forming units per milliliter (CFU/ml). Euthanasia was performed on day 70. Microbiological analysis revealed that the PBM, aPDT, and DUP groups showed significant reductions in CFU/ml during collections 2 and 3 compared to the AZ group. The aPDT group demonstrated the greatest reduction in gram-negative colonies between collection 1 ( $2.11 \pm 2.48$ ) and collection 4 ( $0.96 \pm 1.93$ ). The PBM group also showed a decrease between collection 3 ( $3.08 \pm 3.98$ ) and collection 4 ( $1 \pm 2$ ). The DUP group, although showing promising initial results, exhibited a progressive increase in gram-negative CFU/ml in collections 3 ( $3.72 \pm 5.54$ ) and 4 ( $3.40 \pm 4.85$ ). Quantitative analysis showed a predominance of gram-positive *Streptococcus* colonies (collections 2 and 6). In conclusion, PBM and aPDT, when applied individually, were effective in reducing gram-negative CFU/ml. However, the combined therapy (DUP group) showed limitations in controlling more resistant strains during the later phases. The prevalence of gram-positive *Streptococcus* colonies, although commensal, may act as opportunistic pathogens in necrotic environments. The persistence of pathogenic colonies and the observed dysbiotic pattern reinforce the need for therapeutic approaches that integrate mechanical biofilm disruption, antimicrobial control, and inflammatory modulation for more effective MRONJ management.

**Keywords:** Diphosphonates; Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw; Low-Level Light Therapy; Microbiota.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Protocolo experimental. ....	23
Figura 2 - Análise quantitativa das UFC entre grupos. Grupos: SAL = Salina, AZ = Ácido Zoledrônico, aPDT = Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, FBM = Fotobiomodulação, DUP = Combinação de aPDT e FBM. ....	25
Figura 3 - Análise quantitativa das UFC entre coletas. Grupos: SAL, AZ, aPDT, FBM, DUP. ....	26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das colônias segundo sua morfologia e classificação bacteriana, com base nas características de suas paredes celulares após a coloração de Gram. ....	24
Tabela 2 - Valores da média e desvio padrão dos grupos entre coletas microbiológicas. Grupos: SAL = Salina, AZ = Ácido Zoledrônico, aPDT = Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, FBM = Fotobiomodulação, DUP = Combinação de aPDT e FBM. ....	25
Tabela 3 - Análise quantitativa das três colônias mais prevalentes por grupo experimental, com identificação microbiológica e média $\pm$ desvio padrão. ....	27
Tabela 4 - Análise das UFC gram-negativas entre coletas por grupo experimental.400x.....	28

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AZ	cido Zoledrônico
BHI	Brain Heart Infusion
DUP	Combinação de Fotobiomodulação e Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
EROs	Espécies Reativas de Oxignio
FBM	Fotobiomodulação
LPS	Lipopolissacarídeo
OMM	Osteonecrose dos Maxilares Relacionada a Medicamentos
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
TLR	Receptor do Tipo Toll
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 Beta
MMPs	Metaloproteinases da Matriz
aPDT	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>14</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Microbiota oral saudável .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Microbiota da doença periodontal .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Osteonecrose dos maxilares relacionadas a medicamentos: Classificação e mecanismo .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4 Perfil microbiológico da osteonecrose.....</b>	<b>18</b>
<b>3.5 A terapia fotodinâmica antimicrobiana e fotobiomodulação no controle microbiológico da osteonecrose .....</b>	<b>19</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Aspectos éticos .....</b>	<b>20</b>
<b>4.2 Animais e grupos experimentais .....</b>	<b>20</b>
<b>4.3 Protocolo experimental.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3.1 Protocolo de tratamento sistêmico, ligadura e exodontia.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3.2 Protocolo de fotobiomodulação e terapia fotodinâmica.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3.3 Coleta microbiológica .....</b>	<b>22</b>
<b>4.3.4 Eutanásia .....</b>	<b>23</b>
<b>4.4 Análise estatística .....</b>	<b>23</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
<b>5.1 Coloração de Gram.....</b>	<b>24</b>
<b>5.2 Análise microbiológica quantitativa entre grupos .....</b>	<b>24</b>
<b>5.3 Análise microbiológica quantitativa entre coletas .....</b>	<b>25</b>
<b>5.4 Análise quantitativa das três colônias mais prevalentes por grupo experimental.....</b>	<b>27</b>

<b>5.5 Análise quantitativa das colônias gram-negativas .....</b>	<b>28</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXO 1 - Parecer CEUA .....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A microbiota oral constitui um ecossistema altamente diversificado, composto por mais de 700 espécies bacterianas, além de fungos, vírus e protozoários, que coexistem em equilíbrio dinâmico com o hospedeiro. Esse microbioma desempenha funções essenciais na manutenção da homeostase bucal, participando de processos como a digestão inicial, modulação do sistema imune e proteção contra patógenos exógenos (Zhang *et al.*, 2018; Rocha *et al.*, 2025).

Entretanto, a ruptura desse equilíbrio, denominada disbiose, favorece a proliferação de microrganismos patogênicos, sobretudo anaeróbios gram-negativos, comumente associados ao desenvolvimento de doenças periodontais. Essas bactérias são caracterizadas pela liberação de componentes estruturais altamente imunogênicos, como os polissacarídeos da parede celular, especialmente o lipopolissacarídeo (LPS). O LPS, ao interagir com receptores do tipo Toll (TLR), principalmente o TLR4, presentes em células do sistema imune inato, desencadeia uma resposta inflamatória intensa, com produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Yuan *et al.*, 2023).

O perfil imunocelular associado à doença periodontal é marcado pela ativação de macrófagos, neutrófilos e células T, resultando na amplificação da resposta inflamatória e na destruição dos tecidos periodontais de suporte, como o ligamento periodontal e o osso alveolar. Além disso, a liberação de mediadores inflamatórios e enzimas proteolíticas, como metaloproteinases da matriz (MMPs), contribui para a progressão da destruição tecidual e favorece a exposição óssea (Dyke and Sima, 2020; Rodrigues *et al.*, 2020)

Essa condição inflamatória crônica e a consequente exposição do osso mandibular são fatores críticos no contexto de pacientes tratados com agentes antirreabsortivos, como os bisfosfonatos, aumentando significativamente o risco para o desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos (OMM) (Everts-Graber *et al.*, 2022).

A remodelação óssea é essencial para a homeostase do tecido, promovendo a reabsorção óssea por osteoclastos e a deposição por osteoblastos. O desequilíbrio nesse processo pode levar a distúrbios antirreabsortivos, caracterizados por uma superexpressão de fatores osteoclastogênicos como o Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B (RANKL) (Kim *et al.*, 2020).

Nesse contexto, os bisfosfonatos são amplamente utilizados para o tratamento de doenças ósseas degenerativas, como osteoporose, doença de Paget e mieloma múltiplo, devido à sua capacidade de reduzir o turnover ósseo. Além disso, os aminobisfosfonatos apresentam

efeitos antitumorais, incluindo indução de apoptose celular e inibição da angiogênese, sendo a terapia padrão no manejo de pacientes oncológicos com metástases ósseas (Gavaldá and BagáN, 2016; Ribeiro *et al.*, 2023).

Apesar de sua eficácia, os bisfosfonatos estão associados a um efeito adverso grave que é a OMM. Esta condição é caracterizada pela exposição óssea persistente por mais de oito semanas, sem outra etiologia identificável, e está diretamente relacionada ao histórico de uso de agentes antirreabsortivos (Gavaldá and BagáN, 2016; Everts-Graber *et al.*, 2022).

A patogênese da OMM envolve múltiplos fatores, como a supressão osteoclástica, que resulta no acúmulo de tecido ósseo não vital, a redução da angiogênese, efeitos citotóxicos locais, aumento da suscetibilidade à infecção microbiológica e sua composição, além de alterações imunológicas e baixa oxigenação tecidual (Everts-Graber *et al.*, 2022).

As taxas de desenvolvimento da osteonecrose são mais elevadas em pacientes oncológicos, com incidência entre 1% e 15%, em função da necessidade de doses elevadas de bisfosfonatos (Everts-Graber *et al.*, 2022). Os principais fatores de risco incluem procedimentos dentoalveolares invasivos locais e condições sistêmicas, como exodontias e diabetes mellitus, respectivamente, além de seu uso prolongado, densidade óssea mandibular e o tipo de fármaco utilizado (Kanatlı *et al.*, 2017; Kammerhofer *et al.*, 2023)

Diversos tratamentos têm sido propostos para a OMM, como antibioticoterapia, oxigenoterapia hiperbárica e desbridamento cirúrgico, dependendo da gravidade do caso (Rosella *et al.*, 2016; Beth-Tasdogan *et al.*, 2022). Paralelamente, condutas preventivas são indispensáveis para minimizar os riscos associados, pois a avaliação prévia e o manejo adequado das condições bucais reduzem significativamente a possibilidade de complicações, especialmente em procedimentos invasivos em região dos maxilares.

Nos últimos anos, terapias adjuvantes, como a fototerapia com laser de baixa intensidade, têm sido investigadas para prevenção e tratamento da OMM. A fotobiomodulação (FBM) atua estimulando a regeneração tecidual, modulando a inflamação e promovendo analgesia através da síntese de ATP pelos fotorreceptores mitocondriais (Dompe *et al.*, 2020).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), por sua vez, utiliza um fotossensibilizador ativado por luz que gera espécies reativas de oxigênio, promovendo a destruição seletiva de microrganismos patogênicos (Melo *et al.*, 2021)

A combinação entre FBM e aPDT tem se mostrado uma estratégia promissora, oferecendo efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antimicrobianos, embora a diversidade de protocolos e a escassez de estudos dificultem a padronização terapêutica (De Faria *et al.*, 2021).

Assim, o presente estudo visa investigar os efeitos antimicrobianos dessa combinação em alvéolos pós-exodontia em ratos tratados com ácido zoledrônico, com potencial de embasar novos protocolos clínicos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência da fotobiomodulação (FBM) e terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), de forma isolada e combinada no perfil microbiológico ao longo do tempo em ratos submetidos a tratamento com ácido zoledrônico (AZ) pós-exodontia com periodontite induzida.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar, quantitativa e qualitativamente a variação do perfil microbiológico em diferentes momentos pós-exodontia sob influência da FBM e aPDT, de forma isolada e combinada em ratos tratados com AZ.
- Comparar as unidades formadoras de colônias (UFC) por ml nas diferentes coletas para os diferentes grupos.
- Caracterizar a predominância de colônias bacterianas ao longo do tempo, identificando possíveis mudanças na microbiota.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Microbiota oral saudável

A microbiota oral saudável desempenha um papel essencial na manutenção da saúde bucal e sistêmica, sendo composta por uma comunidade microbiana diversa e dinâmica que se estabelece ainda nos primeiros anos de vida e tende à estabilidade na vida adulta. Essa microbiota varia conforme o nicho anatômico (saliva, mucosa, dentes) é composta por gêneros centrais como *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Neisseria*, *Prevotella* e *Veillonella*, os quais atuam na proteção contra patógenos e na manutenção da homeostase (Yama *et al.*, 2024).

Fatores como dieta equilibrada, boa higiene bucal, ausência de tabagismo e uso controlado de antimicrobianos são determinantes para manter o equilíbrio microbiano. Quando essa estabilidade é rompida, por exemplo, por consumo excessivo de açúcares ou má higiene, ocorre a disbiose, que favorece o crescimento de patógenos como *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium spp*, associados à cárie e à periodontite, podendo inclusive repercutir em condições sistêmicas (Shenkute and Asfaw, 2019; Prucsi *et al.*, 2021).

#### 3.2 Microbiota da doença periodontal

A doença periodontal é uma condição inflamatória crônica desencadeada por um biofilme subgingival disbiótico, caracterizado pela predominância de microrganismos anaeróbios gram-negativos, especialmente do “complexo vermelho”, que inclui *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, além do *Fusobacterium nucleatum*, que pode estar relacionado ao biofilme subgingival e a diminuição da eficiência dos neutrófilos. *Porphyromonas gingivalis* é considerada uma espécie-chave na patogênese da doença, devido à sua capacidade de modular a resposta imune e facilitar a colonização por outros patógenos (Kurgan *et al.*, 2017; Prucsi *et al.*, 2021).

Estes microrganismos possuem uma série de fatores de virulência que contribuem para a destruição do tecido periodontal, incluindo a liberação de endotoxinas, como lipopolissacarídeos (LPS), e a produção de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular e modulam negativamente a resposta imune do hospedeiro. O LPS, por sua vez, atua como um potente ativador da resposta inflamatória, estimulando macrófagos e outras células do sistema imune a produzirem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, promovendo a destruição do tecido conjuntivo e a reabsorção óssea alveolar (Babu and Primm, 2018; Su *et al.*, 2018)

Além disso, o ambiente hipóxico e rico em produtos metabólicos tóxicos gerado pelo biofilme anaeróbio agrava a lesão tecidual e favorece a perpetuação da inflamação crônica, criando um ciclo vicioso de destruição e disbiose. A relação entre a microbiota patogênica e a resposta inflamatória do hospedeiro é, portanto, central na fisiopatogenia da periodontite (Shang *et al.*, 2023; Neurath and Kesting, 2024; Vincenzo *et al.*, 2024)

Na doença periodontal, a microbiota sofre profundas alterações, caracterizando-se por uma transição de um perfil predominantemente gram-positivo, associado à saúde, para uma comunidade dominada por anaeróbios gram-negativos, altamente patogênicos. Essa disbiose promove inflamação crônica e destruição tecidual, comprometendo o periodonto de sustentação (Prucsi *et al.*, 2021; Kamer *et al.*, 2024)

### **3.3 Osteonecrose dos maxilares relacionadas a medicamentos: Classificação e mecanismo**

Alterações nas atividades dos osteoblastos são caracterizadas por distúrbios no metabolismo ósseo, um processo responsável pela deposição e degradação óssea mediadas pelos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. O Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B (RANKL) é uma proteína responsável pela ativação dos osteoclastos, sendo a superexpressão de RANKL relacionada a alterações ósseo degenerativas em doenças como osteoporose, doença de Paget, mieloma múltiplo e metástases ósseas (Kim *et al.*, 2020; Guedes *et al.*, 2023)

Assim, diante a esses distúrbios osteometabólicos, medicamentos que interferem nessa via têm sido amplamente utilizados no tratamento de doenças. Os bisfosfonatos representam a principal classe farmacológica empregada nesses casos. Classificados, de acordo com sua estrutura química e mecanismo de ação, em duas grandes categorias: bisfosfonatos não nitrogenados (como etidronato e clodronato), que promovem apoptose dos osteoclastos por interferência na síntese de ATP, e os aminobisfosfonatos (como pamidronato, alendronato e ácido zoledrônico), que agem inibindo a enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPS), bloqueando a via do mevalonato e, por consequência, impedindo a prenilação de proteínas GTPase essenciais à função e sobrevivência osteoclástica (Kanatlı *et al.*, 2017; Wehner *et al.*, 2020)

O ácido zoledrônico, um dos aminobisfosfonatos mais potentes disponíveis, é amplamente utilizado no tratamento da osteoporose severa, mieloma múltiplo, metástases ósseas e doença de Paget. Seus efeitos antirreabsortivos se somam a propriedades antitumorais, como inibição da adesão celular, da angiogênese e da proliferação tumoral, justificando seu uso

recorrente na oncologia. Contudo, apesar da eficácia terapêutica, o uso prolongado desses agentes, especialmente por via endovenosa, está associado ao surgimento de uma condição adversa de grande relevância clínica: a osteonecrose dos maxilares relacionada a medicamentos (OMM) (Gavaldá and BagáN, 2016; Ribeiro *et al.*, 2023)

A fisiopatogênese da OMM está, portanto, intimamente ligada aos mecanismos farmacológicos de ação dos bisfosfonatos, somando-se a fatores locais, como traumas cirúrgicos (especialmente exodontias), infecções odontogênicas, e condições sistêmicas predisponentes, como diabetes mellitus e estados imunossupressores. O trauma tecidual, associado à remodelação óssea suprimida e à disfunção vascular induzida pelos bisfosfonatos, resulta em um microambiente propício à necrose e à instalação de infecção crônica (Gavaldá and BagáN, 2016; Everts-Graber *et al.*, 2022)

Estudos experimentais demonstram que exodontias realizadas em ratos previamente tratados com ácido zoledrônico (AZ) induzem uma resposta inflamatória exacerbada, com aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), além da ativação da via nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (De Barros Silva *et al.*, 2016). Esse processo resulta principalmente do trauma cirúrgico e da morte de osteócitos no alvéolo dentário, podendo também ocorrer espontaneamente na osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos (OMB) (Koy *et al.*, 2015)

No tecido ósseo, osteócitos viáveis secretam o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), que induz a diferenciação de macrófagos em osteoclastos por meio da via NF- $\kappa$ B. Estes osteoclastos promovem a reabsorção óssea, mediada por enzimas como fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e iNOS. Durante a inflamação, há manutenção da expressão de RANKL, perpetuando a atividade osteoclástica. Com a resolução inflamatória, ocorre aumento da osteoprotegerina (OPG), que bloqueia o RANK em macrófagos, inibindo a osteoclastogênese e restaurando o equilíbrio do metabolismo ósseo (Morita *et al.*, 2017; Tobeiha *et al.*, 2020).

As citocinas pró-inflamatórias associadas à OMM, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e iNOS, são também centrais na fisiopatologia da periodontite, onde sua produção é estimulada pela microbiota disbiótica rica em gram-negativos anaeróbios. Ambas as condições compartilham a ativação da via NF- $\kappa$ B e o estímulo à expressão de RANKL, promovendo um ambiente osteoclastogênico que favorece a reabsorção óssea e a perpetuação do processo inflamatório (Molon *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020).

Dessa forma, processos inflamatórios relacionados à doença periodontal e sua microbiota disbiótica podem potencializar a perpetuação do ambiente osteoclastogênico, favorecendo a reabsorção óssea e contribuindo para a fisiopatologia da osteonecrose dos maxilares (Molon *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020).

### 3.4 Perfil microbiológico da osteonecrose

A OMM apresenta uma complexa etiopatogênese, onde o componente microbiológico desempenha papel central. A colonização bacteriana sobre o osso exposto agrava a infecção e perpetua a necrose tecidual, favorecendo a evolução crônica da lesão. Microrganismos como bacilos gram-positivos (*Actinomyces spp.*), e bacilos gram-negativos (*Fusobacterium spp.* e *Prevotella spp.*) são frequentemente isolados de áreas de osteonecrose, indicando uma microbiota altamente patogênica e anaeróbia, resistente à defesa imune comprometida localmente (Sedghizadeh *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010)

O biofilme bacteriano, estruturado e protegido por uma matriz extracelular polimérica, confere resistência aos mecanismos imunológicos e terapias antimicrobianas convencionais. Estudos mostram que o biofilme presente nas áreas de osteonecrose induz alterações imunológicas locais, exacerbando a inflamação e dificultando o reparo tecidual. Além disso, a exposição óssea e a conseqüente infecção são amplificadas pela redução da vascularização e do turnover ósseo, decorrentes do uso de bisfosfonatos, que inibem a função osteoclástica (Sedghizadeh *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2020)

Modelos experimentais em roedores demonstram que a indução de periodontite associada à extração dentária potencializa a instalação da osteonecrose quando combinada ao uso de bisfosfonatos (Ervolino *et al.*, 2019). A manipulação microbiológica dessas lesões permite a quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) e a identificação de espécies bacterianas predominantes, sendo fundamentais para o entendimento da progressão da doença e desenvolvimento de estratégias terapêuticas (Sedghizadeh *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010)

Além da composição microbiológica, destaca-se a participação dos lipopolissacarídeos (LPS), componentes estruturais de bactérias gram-negativas, presentes tanto na microbiota periodontal disbiótica quanto nas lesões de OMM. A interação do LPS com receptores Toll-like, especialmente TLR4, nas células do sistema imune, desencadeia a ativação da via NF-KB, promovendo a produção exacerbada de mediadores inflamatórios e favorecendo a perpetuação da necrose óssea (Muratsu *et al.*, 2013; Babu and Primm, 2018). Nesse cenário, infecções periodontais pré-existentes podem amplificar a resposta inflamatória sistêmica, agravando o

quadro de osteonecrose e contribuindo para a manutenção de um ambiente osteoclastogênico (Muratsu *et al.*, 2013; Babu and Primm, 2018)

### **3.5 A terapia fotodinâmica antimicrobiana e fotobiomodulação no controle microbiológico da osteonecrose**

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) surge como uma intervenção promissora para o controle microbiano na OMM. O mecanismo de ação da aPDT envolve a ativação de um fotossensibilizador, como o azul de metileno, por uma fonte de luz com comprimento de onda específico, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) letais para os microrganismos. Essa abordagem possui vantagem significativa por não induzir resistência bacteriana, além de apresentar ação localizada e seletiva (Poli *et al.*, 2019)

Ervolino *et al.*, 2019, demonstraram que a aplicação de aPDT associada a extrações dentárias em ratos tratados com ácido zoledrônico resultou em uma melhora significativa na reparação alveolar, com redução do número de osteócitos necróticos e maior deposição de tecido ósseo viável.

Adicionalmente, a fotobiomodulação (FBM) pode modular a resposta inflamatória e estimular a atividade celular reparadora. A FBM age sobre os fotorreceptores mitocondriais, aumentando a produção de ATP, além de promover vasodilatação e angiogênese, fatores críticos no ambiente comprometido da osteonecrose (Hazrati *et al.*, 2025). A aplicação simultânea da FBM com a aPDT potencializa os efeitos antimicrobianos e reparadores, favorecendo um microambiente propício à cicatrização (Tartaroti *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2022)

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 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 e protocolado com o número 010/24 (Anexo I).

### 4.2 Animais e grupos experimentais

Para a realização desta pesquisa, foram utilizados 50 ratos pertencentes à linhagem Wistar (*rattus norvegicus*), com massa corpórea entre 180-200 gramas. Baseado no estudo de 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 8 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 10 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 5 animais por caixa, e numerados individualmente através de marcação na cauda, refeitas quando necessário. Além disso, os animais receberam ração comercial balanceada própria e água *ad libitum*, e foram 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, com apenas simulação dos tratamentos com FBM ou APDT (SHAM) nos dias 42, 44, 46.

**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, com apenas simulação dos tratamentos com FBM ou APDT (SHAM) nos dias 42, 44, 46.

**Grupo FBM:** animais tratados com AZ 0,2 mg/kg, por via endovenosa e submetidos às intervenções cirúrgicas do protocolo experimental para indução de OM, tratados com protocolo de FBM nos dias 42, 44, 46.

**Grupo aPDT:** animais tratados com AZ 0,2 mg/kg, por via endovenosa e submetidos às intervenções cirúrgicas do protocolo experimental para indução de OM, tratados com protocolo de aPDT nos dias 42, 44, 46.

**Grupo DUP:** animais tratados com AZ 0,2 mg/kg, por via endovenosa e submetidos às intervenções cirúrgicas do protocolo experimental para indução de OM, tratados com protocolo de FBM + aPDT nos dias 42, 44, 46.

### 4.3 Protocolo experimental

#### 4.3.1 Protocolo de tratamento sistêmico, ligadura e exodontia

Três administrações semanais consecutivas (dias 0, 7 e 14) de AZ 0,2 mg/kg ou solução salina (controle negativo) foram realizadas por via intravenosa (veia peniana).

Na semana seguinte (Dia 21), foi instalada uma ligadura de algodão (fio #24; Coats Corrente, São Paulo/SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo dos animais, para o acúmulo de biofilme bacteriano local e o conseqüente desencadeamento da periodontite experimental. 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 intraoral com solução de digluconato de clorexidina 0,12%, foi realizada a inserção do fio de algodão no espaço interdental entre o primeiro e o segundo molar inferior esquerdo, com o auxílio de uma pinça odontológica adaptada. Em seguida, foi realizada a amarra do fio com nó duplo em torno do primeiro molar inferior esquerdo, posicionando-se a ligadura na região do sulco gengival (Ervolino *et al.*, 2019).

Um mês após a última administração de AZ (dia 42), a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo foi executada sob o mesmo protocolo anestésico utilizado para as ligaduras. Posteriormente, foi realizada a 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 (Silva *et al.*, 2015).

Todos os procedimentos foram realizados por um mesmo operador (de forma cega e com experiência prévia) e os animais foram então aleatorizados e pesados semanalmente a partir do início do protocolo. Na semana seguinte à exodontia (dia 49), será administrada uma dose adicional do fármaco ou da solução salina (Silva *et al.*, 2015).

### 4.3.2 Protocolo de fotobiomodulação e terapia fotodinâmica

Na realização desse protocolo, que pode gerar estresse e desconforto, os animais também foram anestesiados conforme protocolo anestésico descrito nas intervenções anteriores (ligadura e exodontia). A fonte de luz utilizada para FBM e aPDT 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 cm<sup>2</sup>. Para calcular a densidade de energia, a seguinte fórmula será utilizada:  $DE = (P \cdot t)/A$ , onde a potência é calculada em Watts, o tempo em segundos e a área em cm<sup>2</sup>. Para fins de cálculo da densidade, foi considerada a área do diâmetro da ponteira (0,028 cm<sup>2</sup>), área esta semelhante à área do local irradiado (o alvéolo do animal, que possui área aproximada de 0,032 cm<sup>2</sup>). A irradiação foi realizada em um único ponto (Silva *et al.*, 2022).

Para a aPDT, foi aplicado um fotossensibilizador na região do alvéolo dentário, permanecendo por 5 minutos até a aplicação da luz. O fotossensibilizador utilizado foi o azul de metileno (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>C<sub>1</sub>N<sub>3</sub>S), que apresenta pico de absorção máxima a 660 nm (luz vermelha), na concentração de 100µg/ml, e foi mantido em estoque dentro de um frasco âmbar ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Cada aplicação de laser teve um tempo de irradiação de 60 segundos e uma distância entre a fonte de luz e o local da irradiação de 2 mm, obtendo uma densidade de energia 214,28 J/cm<sup>2</sup> (Silva *et al.*, 2022).

Assim, conforme a descrição dos grupos de estudo, nas aplicações em que foram realizada a combinação entre FBM e APDT, foram realizados 120 segundos de irradiação, dos quais 60 contarão com a presença do fotossensibilizante, que foi posteriormente a FBM (Silva *et al.*, 2022). Nos grupos onde não houve aplicação de laser ou uso do fotossensibilizante (SHAM), foi aplicada solução salina 0,9% (a fim de simular a aplicação do dessensibilizante), e a ponteira do laser foi posicionada na região do alvéolo, sem ativação ou emissão de luz (Silva *et al.*, 2022).

### 4.3.3 Coleta microbiológica

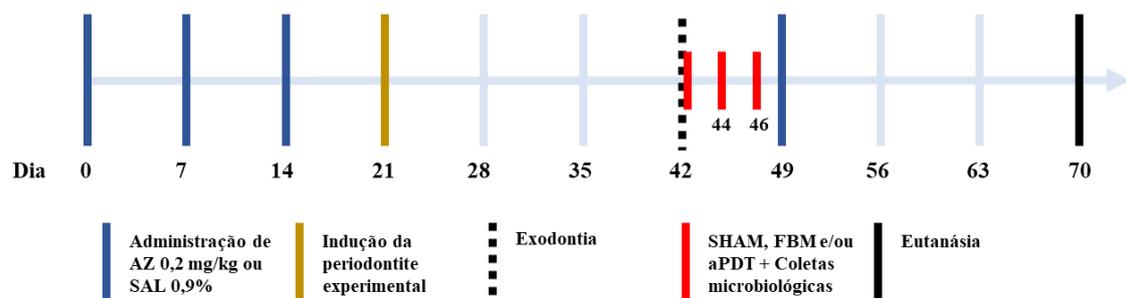
O protocolo anestésico descrito anteriormente foi utilizado para a realização da exodontia e das coletas microbiológicas subsequentes, realizadas nos dias 42 (antes e após o tratamento), 44 e 46. A coleta microbiológica foi realizada utilizando cones de papel absorventes estéreis (conicidade 50; Tanari®), inserido no alvéolo por um período de 10 segundos e em seguida foi transferido para um tubo de microcentrifuga com 2 ml de solução salina estéril 0,89%. Após a agitação, as amostras foram diluídas de forma seriada decimal (1/10; 1/100; 1/1000). A solução contendo o cone, e suas respectivas diluições foram então plaqueadas em duplicata (20 µl) através

do método spread plate em placas de BHI Agar sangue (Thermo Scientific™). As placas foram então semeadas e incubadas 37°C, com a atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, durante 48 horas. Logo após, as unidades formadoras de colônias (UFC) formadas foram contabilizadas e analisadas estatisticamente (De Araújo *et al.*, 2012).

As colônias foram inicialmente identificadas com base em sua morfologia macroscópica, posteriormente, submetidas à coloração de Gram para caracterização quanto à forma celular e classificação bacteriana, de acordo com a composição e coloração da parede celular observada em microscopia óptica, sob aumento total de 1000x. Para isso, cada colônia bacteriana foi coletada, fixada em lâminas de vidro e corada com cristal violeta por 1 minuto. Após a remoção do excesso, aplicou-se solução de Lugol a 1% por 1 minuto, seguida de lavagem com solução descorante (álcool-acetona). Em seguida, as lâminas foram incubadas com fucsina por 30 segundos e lavadas com água destilada (Funke *et al.*, 2024).

#### 4.3.4 Eutanásia

Um mês após a exodontia (dia 70), os animais foram eutanasiados através sobredose anestésica (3x a dose empregada para anestesia) (Silva *et al.*, 2022). Todo o protocolo experimental está ilustrado na Figura 1, a seguir:



**Figura 1:** Protocolo experimental.

#### 4.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como os valores médios  $\pm$  desvio padrão, submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk no software GraphPad Prism versão 10.5.0. Onde os dados paramétricos serão comparados por meio do teste de Análise de Variância (ANOVA) multifatorial, seguido do pós teste de Tukey e dados não paramétricos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pos teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Coloração de Gram

Na Tabela 1, é possível observar a classificação das colônias segundo sua morfologia e características da parede celular após a coloração de Gram, onde podemos observar um padrão de crescimento polimicrobiano.

**Tabela 1** – Classificação das colônias segundo forma e coloração de Gram.

Colônias	Forma e Coloração de Gram
Colônia 1	Levedura
Colônia 2	Estreptococos gram-positivos
Colônia 3	Bacilos gram-positivos
Colônia 4	Levedura
Colônia 5	Bacilos gram-negativos
Colônia 6	Estreptococos gram-positivos
Colônia 7	Estreptococos gram-positivos
Colônia 8	Levedura
Colônia 9	Estreptococos gram-negativos
Colônia 10	Estreptococos gram-positivos
Colônia 11	Bacilos gram-negativos
Colônia 12	Estreptococos gram-positivos
Colônia 13	Levedura
Colônia 14	Levedura
Colônia 15	Bacilos gram-negativos

### 5.2 Análise microbiológica quantitativa entre grupos

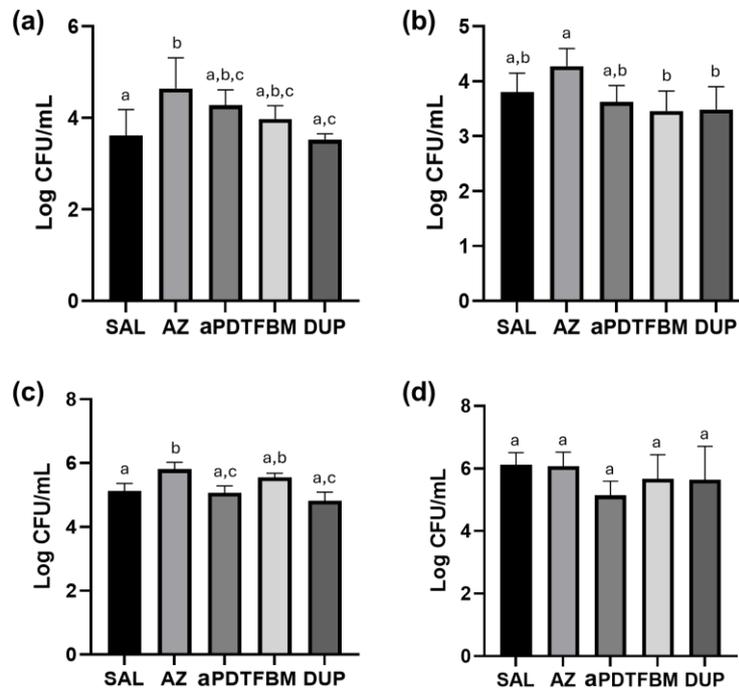
A análise quantitativa das UFC/ml entre grupos foi realizada para comparar a carga bacteriana entre os diferentes grupos experimentais em cada momento de coleta (Figura 2). Sendo observado na Tabela 2 os valores da média  $\pm$  desvio padrão dos grupos entre coletas microbiológicas.

**Coleta 1:** Para a 1<sup>o</sup> coleta microbiológica, observamos que o grupo SAL ( $3,61 \pm 0,56$ ) foi diferente estatisticamente do grupo AZ ( $4,61 \pm 0,66$ ) ( $P=0,0342$ ), entretanto o grupo SAL foi semelhante ao aPDT ( $4,28 \pm 0,33$ ), FBM ( $3,97 \pm 0,29$ ) e DUP ( $3,52 \pm 0,12$ ) ( $p > 0,05$ ). Os grupos FBM e aPDT também foram semelhantes ao grupo AZ ( $p > 0,05$ ). Porém, o grupo DUP, na coleta 1, se mostrou diferente significativamente do grupo AZ ( $p = 0,020$ ).

**Coleta 2:** Para a 2<sup>o</sup> coleta observa diferença significativa entre o grupo AZ ( $4,27 \pm 0,32$ ) e os grupos FBM ( $3,46 \pm 0,36$ ) e DUP ( $3,48 \pm 0,41$ ) ( $p < 0,05$ ).

**Coleta 3:** Na 3ª coleta observou diferença significativa entre AZ ( $5,81 \pm 0,20$ ) e os grupos SAL ( $5,12 \pm 0,24$ ), aPDT ( $5,06 \pm 0,21$ ) e DUP ( $4,81 \pm 0,27$ ) ( $p < 0,05$ ). Além de diferença significativa no grupo FBM ( $5,55 \pm 0,13$ ) entre os grupos aPDT e DUP ( $p < 0,05$ ).

**Coleta 4:** Na coleta 4 não se observou diferença significativa entre grupo ( $p > 0,05$ ).



**Figura 2:** A análise quantitativa das UFC entre grupos. Grupos: SAL= Salina, AZ= Ácido zoledrônico, aPDT= a Terapia fotodinâmica antimicrobiana, FBM= Fotobiomodulação, DUP= Combinação de aPDT e FBM. Coletas: (a) Coleta 1, (b) Coleta 2, (c) Coletas 3, (d) Coleta 4. Letras iguais representa grupos estatisticamente iguais e letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes (teste ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn)

**Tabela 2** – Média  $\pm$  desvio padrão das coletas entre grupos.

	SAL	AZ	aPDT	FBM	DUP
Coleta 1	$3,61 \pm 0,56$	$4,64 \pm 0,66$	$4,28 \pm 0,33$	$3,97 \pm 0,29$	$3,52 \pm 0,12$
Coleta 2	$3,38 \pm 0,44$	$4,27 \pm 0,32$	$3,62 \pm 0,29$	$3,46 \pm 0,36$	$3,48 \pm 0,41$
Coleta 3	$5,12 \pm 0,24$	$5,81 \pm 0,20$	$5,06 \pm 0,21$	$5,55 \pm 0,13$	$4,81 \pm 0,27$
Coleta 4	$6,19 \pm 0,39$	$6,07 \pm 0,44$	$5,14 \pm 0,44$	$5,67 \pm 0,76$	$5,63 \pm 1,07$

Grupos: SAL= Salina, AZ= Ácido zoledrônico, aPDT= a Terapia fotodinâmica antimicrobiana, FBM= Fotobiomodulação, DUP= Combinação de aPDT e FBM.

### 5.3 Análise microbiológica quantitativa entre coletas

A análise quantitativa das UFC entre coletas avaliou as variações na carga bacteriana dentro de cada grupo ao longo dos diferentes momentos de coleta (Figura 3).

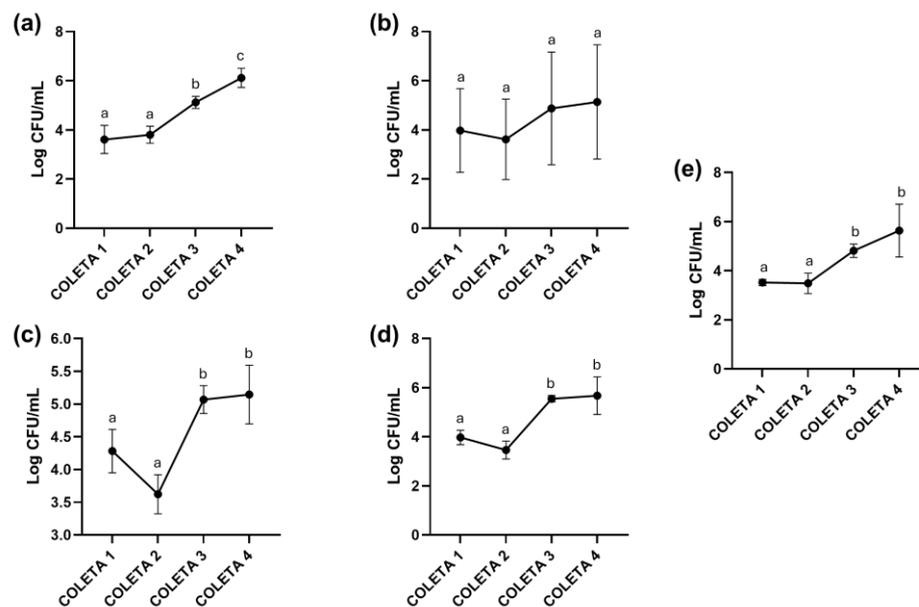
**SAL:** Na coleta microbiológica do grupo SAL, observamos que a coleta 1 foi diferente estatisticamente da coleta 3 ( $p=0,001$ ) e 4 ( $p<0,0001$ ), porém semelhante a coleta 2 ( $p=0,9042$ ). Sendo a coleta 2 diferente estatisticamente da coleta 3 ( $p=0,0029$ ) e 4 ( $p<0,0001$ ), ocorrendo o mesmo entre coleta 3 e 4 ( $p=0,02$ ).

**AZ:** No grupo AZ não houve diferença estatística entre coletas ( $p>0,05$ ).

**aPDT:** Na coleta microbiológica do grupo aPDT, observamos que a coleta 1 foi diferente estatisticamente da coleta 3 ( $p=0,0262$ ) e 4 ( $p=0,0148$ ), porém semelhante a coleta 2 ( $p=0,0667$ ). Sendo a coleta 2 diferente estatisticamente da coleta 3 ( $p=0,0003$ ) e 4 ( $p=0,0002$ ), não havendo diferença entre coleta 3 e 4 ( $p=0,9874$ ).

**FBM:** Na coleta microbiológica do grupo FBM, observamos que a coleta 1 foi diferente estatisticamente da coleta 3 ( $p=0,0017$ ) e 4 ( $p=0,0009$ ), porém semelhante a coleta 2 ( $p=0,4083$ ). Sendo a coleta 2 diferente estatisticamente da coleta 3 ( $p=0,0001$ ) e 4 ( $p<0,0001$ ), não havendo diferença entre coleta 3 e 4 ( $p=0,9783$ ).

**DUP:** Na coleta microbiológica do grupo DUP, observamos que a coleta 1 foi diferente estatisticamente da coleta 3 ( $p=0,0418$ ) e 4 ( $p=0,0015$ ), porém semelhante a coleta 2 ( $p=0,9997$ ). Sendo a coleta 2 diferente estatisticamente da coleta 3 ( $p=0,0357$ ) e 4 ( $p=0,0013$ ), não havendo diferença entre coleta 3 e 4 ( $p=0,2585$ ).



**Figura 3:** A análise quantitativa das UFC entre coletas. Grupos: (a) Sal, (b) AZ, (c) aPDT, (d) FBM, (e) DUP. Letras iguais representa grupos estatisticamente iguais e letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes (teste ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn)

#### 5.4 Análise quantitativa das três colônias mais prevalentes por grupo experimental

A análise das três UFC/ml mais observadas por grupo experimental encontra-se a seguir, com identificação microbiológica e a média  $\pm$  desvio padrão.

**SAL:** No grupo SAL, a Colônia 2 (*Streptococos gram-positivos*) ( $14,68 \pm 2,92$ ) foi mais prevalente, destacando-se de forma expressiva em relação às demais, Colônia 15 (*Bacilos gram-negativos*) ( $5,15 \pm 3,65$ ) e Colônia 3 (*Bacilos gram-positivos*) ( $5,06 \pm 3,75$ ).

**AZ:** No grupo AZ, as três colônias mais prevalentes foram: a Colônia 2 ( $13,10 \pm 9,69$ ); Colônia 6 (*Streptococos gram-positivos*) ( $9,25 \pm 8,77$ ); e Colônia 5 (*Bacilos gram-negativos*) ( $5,65 \pm 4,94$ ).

**aPDT:** No grupo submetido à aPDT, a maior prevalência foi da Colônia 2 ( $13,51 \pm 3,39$ ), em relação as demais, Colônia 6 ( $8,23 \pm 2,02$ ) e Colônia 5 ( $6,51 \pm 4,86$ ). Assim como no grupo AZ, houve predominância de *streptococos gram-positivos*.

**FBM:** No grupo tratado com FBM, a Colônia 6 ( $14,45 \pm 2,54$ ), superou a Colônia 2 ( $11,69 \pm 4,66$ ) em prevalência. A terceira colônia mais prevalente foi a Colônia 1 (*Levedura*) ( $8,82 \pm 6,65$ ).

**DUP:** No grupo DUP, a Colônia 2 ( $16,39 \pm 0,42$ ) foi a mais prevalente, representando o maior valor registrado entre todas as colônias e grupos. Em seguida, destacaram-se a Colônia 6 ( $11,25 \pm 1,81$ ), e a Colônia 1 ( $6,53 \pm 2,93$ ).

**Tabela 3** - Média  $\pm$  desvio padrão por colônia dos grupos.

	SAL	AZ	APDT	FBM	DUP
Colônia 1	0,74 $\pm$ 1,22	1,28 $\pm$ 1,48	1,26 $\pm$ 0,58	2,20 $\pm$ 1,66	1,63 $\pm$ 0,73
Colônia 2	3,67 $\pm$ 0,73	3,27 $\pm$ 2,42	3,37 $\pm$ 0,84	2,92 $\pm$ 1,16	4,09 $\pm$ 0,10
Colônia 3	1,26 $\pm$ 0,93	0,95 $\pm$ 0,66	0,86 $\pm$ 1,16	0,23 $\pm$ 0,46	0,88 $\pm$ 0,59
Colônia 4	-	0,45 $\pm$ 0,91	-	0,12 $\pm$ 0,25	0,24 $\pm$ 0,48
Colônia 5	1,02 $\pm$ 1,28	1,41 $\pm$ 1,23	1,62 $\pm$ 1,21	0,25 $\pm$ 0,5	1,78 $\pm$ 0,95
Colônia 6	1,14 $\pm$ 1,45	2,31 $\pm$ 2,19	2,05 $\pm$ 0,50	3,61 $\pm$ 0,63	2,81 $\pm$ 0,45
Colônia 7	-	0,31 $\pm$ 0,69	0,29 $\pm$ 0,58	0,21 $\pm$ 0,42	-
Colônia 8	-	-	-	0,5 $\pm$ 0,57	-
Colônia 9	0,44 $\pm$ 0,63	0,18 $\pm$ 0,37	0,35 $\pm$ 0,71	0,68 $\pm$ 0,51	0,54 $\pm$ 0,42
Colônia 10	0,50 $\pm$ 1,01	1,48 $\pm$ 1,24	0,38 $\pm$ 0,44	0,75 $\pm$ 0,95	-
Colônia 11	0,10 $\pm$ 0,21	-	0,26 $\pm$ 0,52	-	-
Colônia 12	0,33 $\pm$ 0,67	-	0,29 $\pm$ 0,34	-	-
Colônia 13	-	-	0,14 $\pm$ 0,28	-	-
Colônia 14	0	0,35 $\pm$ 0,41	-	0,23 $\pm$ 0,26	0,12 $\pm$ 0,25
Colônia 15	1,28 $\pm$ 0,91	0,47 $\pm$ 0,95	-	0,70 $\pm$ 0,50	0,20 $\pm$ 0,41

Grupos: SAL= Salina, AZ= Ácido zoledrônico, aPDT= a Terapia fotodinâmica antimicrobiana, FBM= Fotobiomodulação, DUP= Combinação de aPDT e FBM.

### 5.5 Análise quantitativa das colônias gram-negativas

Na Tabela 4, observa-se a análise individual das UFC/ml gram-negativas (Colônia 5, 9, 11 e 15), sendo descrita a seguir:

**SAL:** Tem uma redução da média  $\pm$  desvio padrão entre coleta 1 ( $2,33\pm 1,99$ ) e coleta 4 ( $1,26\pm 2,52$ ).

**AZ:** O grupo AZ, observa-se um aumento das coletas UFC gram-negativas, principalmente na coleta 3 ( $3,30\pm 4,30$ ) com sua redução na coleta 4 ( $1\pm 2$ ).

**aPDT:** Observa uma redução de UFC entre coleta 1 ( $2,11\pm 2,48$ ) e coleta 4 ( $0,96\pm 1,93$ ).

**FBM:** Tem um aumento de UFC principalmente observado na coleta 3 ( $3,08\pm 3,98$ ) e redução na coleta 4 ( $1\pm 2$ ).

**DUP:** Em DUP observa um grande aumento da média  $\pm$  e desvio padrão nas coletas 3 ( $3,72\pm 5,54$ ) e 4 ( $3,40\pm 4,85$ ) em relação a coleta 1 ( $1,56\pm 1,90$ ).

**Tabela 4** - Média  $\pm$  desvio padrão por coleta de colônia gram-negativas entre grupos.

	SAL	AZ	aPDT	FBM	DUP
Coleta 1	$2,33\pm 1,99$	$1,59\pm 1,85$	$2,11\pm 2,48$	$1,92\pm 2,32$	$1,56\pm 1,90$
Coleta 2	$2,03\pm 2,72$	$2,41\pm 2,99$	$2,81\pm 3,29$	$1,56\pm 3,13$	$1,44\pm 1,93$
Coleta 3	$0,67\pm 1,34$	$3,30\pm 4,30$	$3,2\pm 5,24$	$3,08\pm 3,98$	$3,72\pm 5,54$
Coleta 4	$1,26\pm 2,52$	$1\pm 2$	$0,96\pm 1,93$	$1\pm 2$	$3,40\pm 4,85$

Grupos: SAL= Salina, AZ= Ácido zoledrônico, aPDT= a Terapia fotodinâmica antimicrobiana, FBM= Fotobiomodulação, DUP= Combinação de aPDT e FBM.

## 6 DISCUSSÃO

A etiopatogênese da OMM ainda não é completamente compreendida, sendo considerada multifatorial e complexa. Fatores como inibição da remodelação óssea, hipovascularização, infecção secundária e disbiose oral são constantemente apontados como contribuintes ao quadro clínico (Kumar *et al.*, 2010; Everts-Graber *et al.*, 2022).

A presença de periodontite inflamatória crônica, caracterizada por um biofilme subgingival disbiótico rico em microrganismos gram-negativos, como *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, pode intensificar a colonização bacteriana óssea e a necrose. Esse quadro inflamatório é exacerbado pela liberação de citocinas inflamatórias, que são produzidas em resposta à infecção e à presença do biofilme. Citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  são particularmente relevantes, pois promovem a inflamação e atraem células imunes para o local, agravando ainda mais a resposta inflamatória (Sedghizadeh *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010).

A interação entre esses elementos favorece a persistência de necrose óssea e dificulta a cicatrização após procedimentos invasivos, como exodontias. Nesse contexto, intervenções terapêuticas capazes de modular esses fatores tornam-se fundamentais para o controle da OMM (Poli *et al.*, 2019; Everts-Graber *et al.*, 2022).

Na análise microbiológica quantitativa de UFC/ml entre grupos, observa-se nas coletas 2 e 3, que FBM, aPDT e DUP, teve diferença estatisticamente significativa em comparação a AZ (Figura 2b e 2c), sugerindo que o modelo experimental do grupo AZ é mais propício a uma colonização bacteriana (Kumar *et al.*, 2010; KöVÉR *et al.*, 2025).

Esse resultado encontra respaldo na literatura, onde múltiplos estudos demonstram que a FBM favorece a neoangiogênese, promove regeneração tecidual e modula a inflamação por mecanismos que incluem a ativação das mitocôndrias e o aumento da síntese de adenosina trifosfato (ATP) (Joniová *et al.*, 2024). Por outro lado, a aPDT atua por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são capazes de destruir biofilmes bacterianos resistentes, sem induzir resistência antimicrobiana (Youf *et al.*, 2021).

No que se refere à análise das colônias bacterianas (Tabela 3), destacou-se que, em praticamente todos os grupos, a Colônia 2 e 6 (*Streptococcus* gram-positivos) que apresentou as maiores médias de prevalência, especialmente no grupo DUP (16,39 $\pm$ 0,42) para colônia 2 e FBM para colônia 6 (3,61 $\pm$ 0,63). Assim, embora os *Streptococcus* sejam comumente associados à homeostase oral, em condições de disbiose e necrose tecidual, podem desempenhar papel oportunista e modular estado inflamatório crônico ao seu favor (Bloch *et al.*, 2024). Sugerindo

uma possível disbiose local induzida pelo tratamento de FBM na modulação inflamatória, que também está presente no grupo DUP (FBM + aPDT), onde pode ter alterado a competição microbiana, modulando o estado inflamatório e citocinas pró-inflamatórias favorecendo essas colônias gram-positivas (Amaroli *et al.*, 2022; Bloch *et al.*, 2024).

Além disso, verificou-se a elevada presença de bacilos gram-negativos, com destaque para a Colônia 5, nos grupos AZ ( $1,41 \pm 1,23$ ), aPDT ( $1,62 \pm 1,21$ ) e DUP ( $1,78 \pm 0,95$ ), considerando-se a média  $\pm$  e o desvio padrão das quatro coletas (Tabela 3). Esse achado está em conformidade com o perfil microbiológico clássico da OMM, induzida por ácido zoledrônico nesses grupos experimentais, destacando o papel dominante desses microrganismos gram-negativos na progressão da necrose óssea (Kumar *et al.*, 2010; KöVÉR *et al.*, 2025).

Os bacilos gram-negativos são capazes de liberar lipopolissacarídeos (LPS), que, ao interagirem com receptores Toll-like (especialmente TLR4) nas células do sistema imune, ativam a via de sinalização NF- $\kappa$ B, induzindo a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , contribuindo diretamente para a intensificação do processo necrótico (Alqranei *et al.*, 2021)

A análise temporal das colônias gram-negativas (Tabela 4) permitiu observar comportamentos distintos entre os grupos quanto à variação da carga microbiana ao longo das coletas. O grupo SAL apresentou uma tendência de redução da média de UFC, com valores decrescendo da média e desvio padrão  $2,33 \pm 1,99$  na coleta 1 para  $1,26 \pm 2,52$  na coleta 4, sugerindo uma resposta imune natural e controle microbiológico mesmo na ausência de intervenção terapêutica ativa. De modo semelhante, o grupo aPDT também demonstrou redução desses parâmetros entre a coleta 1 ( $2,11 \pm 2,48$ ) e a coleta 4 ( $0,96 \pm 1,93$ ), o que reforça o potencial da terapia fotodinâmica em controlar microrganismos patogênicos, como os bacilos gram-negativos, amplamente associados à fisiopatologia da OMM (Poli *et al.*, 2019).

Quanto à evolução temporal das UFC/ml, os dados evidenciaram que no grupo AZ não houve redução significativa entre as coletas, mantendo-se um padrão elevado e estável de UFC ( $P > 0,05$ ) (Figura 2b), refletindo a dificuldade de resolução espontânea das infecções associadas à OMM sem intervenção terapêutica. Esse padrão é consistente com estudos que apontam a inibição do turnover ósseo e a hipovascularização induzidas pelos bisfosfonatos como fatores determinantes para a persistência da necrose e da colonização bacteriana (Kumar *et al.*, 2010; Everts-Graber *et al.*, 2022)

Por outro lado, o grupo AZ apresentou um pico de UFC gram-negativas na coleta 3 ( $3,30 \pm 4,30$ ), com posterior queda na coleta 4 ( $1 \pm 2$ ), o que pode refletir um processo inflamatório tardio, sem resolução espontânea adequada. O grupo FBM, por sua vez, teve

comportamento semelhante, com aumento importante na coleta 3 ( $3,08 \pm 3,98$ ), seguido por redução na coleta 4 ( $1 \pm 2$ ). Esses padrões sugerem que, embora a fotobiomodulação possua efeito anti-inflamatório e bioestimulante, seu impacto isolado no controle de bactérias gram-negativas pode ser limitado ou dependente do tempo e da severidade da colonização prévia (Pereira *et al.*, 2019)

O grupo DUP apresentou um comportamento microbiológico inesperado, com aumento progressivo da média de UFC/ml gram-negativas nas coletas 3 ( $3,72 \pm 5,54$ ) e 4 ( $3,40 \pm 4,85$ ) em relação à coleta 1 ( $1,56 \pm 1,90$ ) (Tabela 4), o que contrasta com expectativas da literatura que aponta uma redução mais consistente desses patógenos com a aplicação da aPDT (De Faria *et al.*, 2021; Melo *et al.*, 2021). Sendo observado essa semelhança no grupo aPDT, onde a análise por colônias revelou uma média elevada para bacilos gram-negativos ao considerar a média e o desvio padrão das quatro coletas (Colônia 5:  $1,62 \pm 1,21$ ) (Tabela 3).

Entretanto, em aPDT observou-se na análise das UFC/ml gram-negativas (Tabela 4) um comportamento intermediário em relação ao controle microbiológico. A redução da UFC/ml total foi evidente entre as coletas, com destaque para a queda de mais de 50% das colônias de UFC/ml gram-negativas entre a coleta 1 ( $2,11 \pm 2,48$ ) e a coleta 4 ( $0,96 \pm 1,93$ ), segundo a média e desvio padrão, evidenciando seu potencial no combate a microrganismos patogênicos (Silva *et al.*, 2022). Esse achado contrasta com o observado no grupo DUP mencionado anteriormente, que apresentou aumento das UFC gram-negativas no mesmo intervalo (Coleta 1:  $1,56 \pm 1,90$ ; Coleta 4:  $3,40 \pm 4,85$ ).

Acerca disso, a literatura recente reforça a eficácia dessas abordagens. Segundo (Conti *et al.*, 2019), a FBM é capaz de modular a expressão de RANKL/OPG, favorecendo o equilíbrio entre reabsorção e formação óssea; enquanto a aPDT promove significativa redução do biofilme e melhora os parâmetros de reparação óssea (Poli *et al.*, 2019).

Adicionalmente, a presença predominante de bactérias gram-negativas, capazes de induzir a liberação de proteases e contribuir para a acidificação do meio local, favorece a manutenção de um ambiente acidúrico e inflamatório (Rocha *et al.*, 2025), perpetuando a atividade osteoclástica via estímulo contínuo de RANKL e ativação da via NF-KB (Babu and Primm, 2018). Assim, a capacidade das terapias adjuvantes de reduzir a carga microbiana e modular a resposta inflamatória apresenta-se como uma estratégia promissora no manejo da OMM.

Embora esse resultado do grupo DUP em relação da prevalência de UFC gram-negativas não invalide a eficácia da combinação terapêutica observada na análise microbiológica quantitativa entre coletas no grupo DUP (Figura 2e), pode indicar que, em determinados

contextos, a combinação dos tratamentos não elimina completamente as colônias gram-negativas mais resistentes, como a Colônia 5. Onde o modelo experimental de periodontite e acúmulo de biofilme bacteriano pode ter influenciado na resistência e agido como barreira física para difusão do fotossensibilizador no alvéolo (Sedghizadeh *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010).

De forma geral, os dados obtidos neste estudo evidenciam um cenário de disbiose microbiana em todos os grupos experimentais, inclusive naqueles submetidos às terapias adjuvantes. Essa disbiose, caracterizada por alterações no equilíbrio ecológico da microbiota oral, manifestou-se pela predominância de colônias patogênicas, especialmente bacilos gram-negativos e leveduras, em detrimento de uma microbiota comensal típica da cavidade bucal saudável (Zhang *et al.*, 2018). Tal desequilíbrio pode ter sido potencializado não apenas pela imunossupressão local induzida pelos bisfosfonatos e pelo trauma cirúrgico da exodontia, mas também pela presença prévia de periodontite experimentalmente induzida (Sedghizadeh *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010).

A periodontite, por sua natureza inflamatória crônica, favorece a instalação e maturação de um biofilme disbiótico, rico em microrganismos anaeróbios gram-negativos, como *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. Esses patógenos produzem lipopolissacarídeos (LPS) e enzimas proteolíticas, exacerbando a inflamação local e dificultando a regeneração tecidual (Babu and Primm, 2018; Su *et al.*, 2018).

Neste contexto, como citado anteriormente, o biofilme formado sobre o tecido ósseo exposto funciona como uma barreira física e biológica à cicatrização, dificultando a ação de terapias antimicrobianas e perpetuando a necrose tecidual. Esse fator é especialmente relevante em modelos de osteonecrose dos maxilares (OMM) associados à exodontia, pois a presença de infecção periodontal ativa no momento da extração potencializa a colonização do alvéolo e o agravamento do quadro osteonecrotico (Sedghizadeh *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010).

Assim, vale ressaltar, que tais achados inesperados, como o crescimento da microbiota gram negativa nos grupos aPDT, FBM e DUP, pode ter sua associação correlacionada ao modelo experimental de periodontite em ratos.

Esses resultados reforçam a importância de abordagens terapêuticas que não apenas reduzam a carga bacteriana total, mas que também atuem na disrupção do biofilme, como aPDT (que demonstrou os melhores resultados neste estudo), o debridamento mecânico e o uso de enzimas degradadoras, no controle da inflamação e na restauração da homeostase microbiológica, condição essencial para o reparo ósseo adequado e a prevenção da progressão da OMM induzida por medicamentos.

## 7 CONCLUSÃO

Neste estudo a FBM e aPDT em ratos submetidos a tratamento com ácido zoledrônico (AZ) após exodontia com periodontite induzida, de forma isolada demonstraram influência na redução da carga bacteriana, principalmente nas gram-negativas.

A análise das UFC/ml entre coletas para os diferentes grupos, mostrou um aumento significativo dessas UFC a partir da coleta 3, porém ao analisar o perfil microbiológico individual, observou-se predominância de estreptococos gram-positivos, compatíveis com uma microbiota polimicrobiana presente em todos os grupos experimentais, sendo esses microrganismos comumente encontrados na microbiota oral saudável.

## REFERÊNCIAS

- ALQRANEI, M. S. *et al.* Lipopolysaccharide-TLR-4 axis regulates osteoclastogenesis independent of RANKL/RANK signaling. **BMC Immunology**, v. 22, n. 1, 2021. ISSN 1471-2172. Disponível em: <https://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12865-021-00409-9>. Acesso em: 19 jun. 2025.
- AMAROLI, A. *et al.* A narrative review on oral and periodontal bacteria microbiota photobiomodulation, through visible and near-infrared light: from the origins to modern therapies. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 3, 25 jan. 2022. ISSN 1422-0067. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35163296/>. Acesso em: 19 jun. 2025.
- BABU, J.; PRIMM, J. Prevotella denticola protease interferes with Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide mediated secretion of anti-inflammatory components by the cultured monocytic cells. **Journal of Dental Science, Oral and Maxillofacial Research**, v. 1, n. 2, 2018. ISSN 2630-9610. Disponível em: [https://epa.oszk.hu/03500/03510/00003/pdf/EPA03510\\_jdsomr\\_1\\_2\\_2018\\_057-060.pdf](https://epa.oszk.hu/03500/03510/00003/pdf/EPA03510_jdsomr_1_2_2018_057-060.pdf). Acesso em: 19 jun. 2025.
- 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, 12 jul. 2022. ISSN 1361-6137. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35866376/>. Acesso em: 19 jun. 2025.
- BLOCH, S. *et al.* Oral streptococci: modulators of health and disease. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 14, p. 1357631, 2024. ISSN 2235-2988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35163296/>. Acesso em: 19 jun. 2025.
- CONTI, C. M. *et al.* Effects of photobiomodulation on root resorption induced by orthodontic tooth movement and RANKL/OPG expression in rats. **Photochem Photobiol**, v. 95, n. 5, p. 1249-1257, set. 2019. ISSN 0031-8655. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30968413/>. Acesso em: 19 jun. 2025.
- DE ARAÚJO, F. R. *et al.* Perialveolar bacterial microbiota and bacteraemia after dental alveolitis in adult rats that had been subjected to neonatal malnutrition. **Br J Nutr**, v. 107, n. 7, p. 996-1005, abr. 2012. ISSN 0007-1145. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21816120/>. Acesso em: 19 jun. 2025.
- DE BARROS SILVA, P. G. *et al.* Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Dis**, v. 22, n. 7, p. 649-657, out. 2016. ISSN 1354-523X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27232600/>. Acesso em: 19 jun. 2025.
- DE FARIA, C. M. G.; COSTA, C. S.; BAGNATO, V. S. Photobiomodulation effects on photodynamic therapy in HNSCC cell lines. **J Photochem Photobiol B**, v. 217, p. 112170, abr. 2021. ISSN 1011-1344. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33676286/>. Acesso em: 19 jun. 2025.
- DYKE, T. E. V.; SIMA, C. Understanding resolution of inflammation in periodontal diseases: is chronic inflammatory periodontitis a failure to resolve? **Periodontology 2000**, v. 82, n. 1,

2020. ISSN 1600-0757. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/prd.12317>. Acesso em: 19 jun. 2025.

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, fev. 2022. ISSN 0884-0431. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34787342/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

FUNKE, G. J. *et al.* Microbiologia. 14. ed. Porto Alegre: **ArtMed**, 2024. *E-book*. p.66. ISBN 9786558822585. Disponível em:

<https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9786558822585/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

GAVALDÁ, C.; BAGÁN, J. V. Concept, diagnosis and classification of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: a review of the literature. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 21, n. 3, p. e260-270, 1 maio 2016. ISSN 1698-4447. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26827066/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

GUEDES, A.; BECKER, R. G.; TEIXEIRA, L. E. M. Multiple myeloma (Part 2) – update on the approach to bone disease. **Rev Bras Ortop (São Paulo)**, v. 58, n. 3, p. 368-377, jun. 2023. ISSN 0102-3616. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37396088/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

HAZRATI, P. *et al.* The effect of photobiomodulation therapy on fracture healing: a systematic review and meta-analysis of animal studies. **Lasers Med Sci**, v. 40, n. 1, 2025. ISSN 1435-604X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40016554/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

JONIOVÁ, J. *et al.* Optimizing photobiomodulation radiometric and spectral parameters in vitro to enhance angiogenesis and mitochondrial function. **Int J Mol Sci**, v. 26, n. 1, 26 dez. 2024. ISSN 1422-0067. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39795951/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

KAMER, A. R. *et al.* Periodontal inflammation and dysbiosis relate to microbial changes in the gut. **Microorganisms**, v. 12, n. 6, 2024. ISSN 2076-2607. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38930608/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

KAMMERHOFER, G. *et al.* Association between Hyperglycemia and Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ). **J Clin Med**, v. 12, n. 8, 19 abr. 2023. ISSN 2077-0383. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37109314/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

KANATLI, U. *et al.* Surgical treatment of bilateral femoral stress fractures related with long-term alendronate therapy. **Eklemler Hastalik Cerrahisi**, v. 28, n. 1, p. 55-58, abr. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28291441/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

KIM, J. M. *et al.* Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. **Cells**, v. 9, n. 9, 10 set. 2020. ISSN 2073-4409. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32927921/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

KUMAR, S. K. *et al.* The role of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate therapy. **Curr Osteoporos Rep**, v. 8, n. 1, p. 40-48, mar. 2010. ISSN

1544-1873. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20425090/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

KURGAN, Ş. et al. Strain-Specific Impact of *Fusobacterium nucleatum* on Neutrophil Function. **J Periodontol**, v. 88, n. 4, p. 380-389, abr. 2017. ISSN 0022-3492. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27762731/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

KÖVÉR, Z. et al. The Microbiological Background of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ): Clinical Evidence Based on Traditional Culture and Molecular Biological Detection Methods. **Antibiotics**, v. 14, n. 2, 2025. ISSN 2079-6382. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/14/2/203>. Acesso em: 25 jun. 2025.

MELO, M. A. W. C. et al. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) for biofilm treatments. Possible synergy between aPDT and pulsed electric fields. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2247-2272, dez. 2021. ISSN 2150-5594. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34496717/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

MOLON, R. S. D. et al. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 12, 2018. ISSN 1059-910X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30351474/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

MORITA, M. et al. Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following anti-resorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28387378/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

MURATSU, D. et al. Zoledronic acid enhances lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory reactions through controlled expression of SOCS1 in macrophages. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67906, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23874464/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

NEURATH, N.; KESTING, M. Cytokines in gingivitis and periodontitis: from pathogenesis to therapeutic targets. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 2024. ISSN 1664-3224. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39253090/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

PEREIRA, F. D. M. et al. Efeitos do laser de diodo de alta potência e da fotobiomodulação em dentes de ratos reimplantados tardiamente. **Revista De Odontologia Da UNESP**, v. 48, 2019. ISSN 1807-2577. Disponível em <https://www.scielo.br/j/rounesp/a/RCLJm9dCgbw6p5vqkN3ky6p/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

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 Photodyn Ther**, v. 27, p. 117-123, set. 2019. ISSN 1572-1000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31152878/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

PRUCSI, Z. et al. Uncovering the Oral Dysbiotic Microbiota as Masters of Neutrophil Responses in the Pathobiology of Periodontitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021. ISSN 1664-302X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34707586/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

RIBEIRO, D. B. et al. Terapias direcionadas para metástases ósseas: inibidores de reabsorção óssea e agentes antineoplásicos. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 5, 2023. ISSN 2595-6825. Disponível em:

<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/62901>. Acesso em: 25 jun. 2025.

ROCHA, S. T. et al. The prevalence of motility-related genes within the human oral microbiota. **Microbiol Spectr**, v. 13, n. 1, p. e0126424, 7 jan. 2025. ISSN 2165-0497.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39651911/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

RODRIGUES, K. T. et al. Associação entre condições sistêmicas e gravidade da doença periodontal em pacientes atendidos na Clínica-Escola da UFCG. **Rev Odontol UNESP**. 2020;49:e20200025. Disponível em:

<https://revodontolunesp.com.br/article/doi/10.1590/1807-2577.02520>. Acesso em: 25 jun. 2025.

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, mar.-abr. 2016. ISSN 2231-0762. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27114946/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

SEDGHIZADEH, P. P. et al. Microbial biofilms in osteomyelitis of the jaw and osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy. **J Am Dent Assoc**, v. 140, n. 10, p. 1259-1265, out. 2009. ISSN 0002-8177. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19797556/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

SHANG, J. et al. Role of oxidative stress in the relationship between periodontitis and systemic diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 14, 2023. ISSN 1664-042X. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37501927/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

SHENKUTE, D.; ASFAW, T. Streptococcus mutans Dental Caries among Patients Attending Debre Berhan Referral Hospital, Ethiopia. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 10, n. 1, 2019. ISSN 2155-9597. Disponível em: <https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/emstreptococcus-mutansem-dental-caries-among-patients-attending-debre-berhan-referral-hospital-ethiopia-18242.html>. Acesso em: 25 jun. 2025.

SILVA, P. G. B. 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.015>. Acesso em: 25 jun. 2025.

SILVA, P. G. B. et al. Photodynamic therapy and photobiomodulation therapy in zoledronic acid-induced osteonecrosis in rats. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 38, p. 102889, jun. 2022. ISSN 1572-1000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35489689/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

SILVA, P. G. B. et al. Photodynamic therapy and photobiomodulation therapy in zoledronic acid-induced osteonecrosis in rats. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 38, p. 102889, jun. 2022. ISSN 1572-1000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35489689/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

SU, Y. et al. Ecological Balance of Oral Microbiota Is Required to Maintain Oral Mesenchymal Stem Cell Homeostasis. **Stem Cells**, v. 36, n. 4, p. 551-561, abr. 2018. ISSN 1066-5099. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29266799/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

TARTAROTI, N. C. et al. Antimicrobial photodynamic and photobiomodulation adjuvant therapies for prevention and treatment of medication-related osteonecrosis of the jaws: Case series and long-term follow-up. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, 2020. ISSN 1572-1000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31923636/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

TOBEIHA, M. et al. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. **Biomed Res Int**, v. 2020, p. 6910312, 2020. ISSN 2314-6133. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32149122/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

VINCENZO, F. D. et al. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. **Internal and Emergency Medicine**, v. 19, n. 2, 2024. ISSN 1828-0447. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37505311/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

WANG, J. et al. NIK inhibitor impairs chronic periodontitis via suppressing non-canonical NF- $\kappa$ B and osteoclastogenesis. **Pathogens and Disease**, v. 78, n. 7, 2020. ISSN 2049-632X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37143646/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

WEHNER, C. et al. Effect of bisphosphonate treatment of titanium surfaces on alkaline phosphatase activity in osteoblasts: a systematic review and meta-analysis. **BMC Oral Health**, v. 20, n. 1, p. 125, 25 abr. 2020. ISSN 1472-6831. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32334598/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

YAMA, K. et al. Oral Microbiota Development in the First 60 Months: A Longitudinal Study. **J Dent Res**, v. 103, n. 12, p. 1249-1257, nov. 2024. ISSN 0022-0345. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39394772/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

YOUF, R. et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, 24 nov. 2021. ISSN 1999-4923. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34959277/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

YUAN, X. et al. Systemic antibiotics increase microbiota pathogenicity and oral bone loss. **Int J Oral Sci**, v. 15, n. 1, p. 4, 12 jan. 2023. ISSN 1674-2818. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36631439/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

ZHANG, Y. et al. Human oral microbiota and its modulation for oral health. **Biomed Pharmacother**, v. 99, p. 883-893, mar. 2018. ISSN 0753-3322. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29710488/>. Acesso em: 25 jun. 2025.

## ANEXO 1 - Parecer 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**