

DANILO ANDRÉS BALZARINI

**Anticorpo anti-RANKL como modulador da perda óssea alveolar em
periodontite experimental induzida em animais: uma revisão sistemática**

São Paulo
2022

DANILO ANDRÉS BALZARINI

**Anticorpo anti-RANKL como modulador da perda óssea alveolar em
periodontite experimental induzida em animais: uma revisão sistemática**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

São Paulo

2022

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Balzarini, Danilo Andrés.

Anticorpo anti-RANKL como modulador da perda óssea alveolar em periodontite experimental induzida em animais: uma revisão sistemática / Danilo Andrés Balzarini; orientador Marinella Holzhausen Caldeira. -- São Paulo, 2022.

74 p. : fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Ligante RANK. 2. Denosumab. 3. Anticorpos. 4. NF kappa B. 5. Periodontite. 6. Revisão sistemática. I. Caldeira, Marinella Holzhausen. II. Título.

Fábio Jastwebski – Bibliotecário - CRB8/5280

Balzarini, DA Anticorpo anti-RANKL como modulador perda óssea alveolar em periodontite experimental induzida em animais: uma revisão sistemática. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 18/08/2022

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Emanuel da Silva Rovai

Instituição: Universidade de Taubaté

Julgamento: Aprovado

Prof^a. Dr^a.: Luciana Saraiva

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Niels Olsen Saraiva da Câmara

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Aos meus pais e a todos os meus amigos.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, **Adelardo** e **Suely**, que me incentivam o desenvolvimento contínuo, pelo suporte e apoio em minhas escolhas e investidas. Obrigado pelos ensejos.

Agraço aos meus irmãos, **Guilherme**, **Natália** e **Thomas**, pelas conversas, aventuras tresloucadas, risadas, conhecimentos compartilhados e companhia. Compartilhamos juntos a busca por conhecimentos, que nos é fundamental.

Agradeço à minha Orientadora, **Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira**, pelas oportunidades, pelos anos de amizade e prontidão. Pelo acolhimento desde minha primeira Iniciação Científica, por me despertar afeição pela academia e pela liberdade de desenvolver esse projeto, obrigado.

Agradeço aos meus amigos do grupo *Team Marinella*, **Aldrin Huamán**, **Dânia Ramadan**, **Emanuel Rovai**, **Emmanuel Albuquerque**, **Leticia Gasparoni**, **Tomaz Alves** e **Lucas Ambrósio**. Obrigado pela amizade, apoio e desenvolvimento em todas as equipes que formamos.

Agradeço a meus amigos, **Bruna Di Profio**, **Emerson Santiago**, **Fernando Martins**, **Gabriel Damin**, **Guilherme Castro**, **Guilherme Costa**, **Isabella Neme**, **Jonathan Brito**, **Julia Grimberg**, **Mohamed Hassan**, **Nathalia Vilela**, **Nayara de Lucena**, **Oswaldo Villa**, **Thiago Reina** e **Yasmin das Graças**. Companheiros de estudos, conversas e risadas que fizeram a pós-graduação, mesmo durante uma pandemia, ser agradável e enriquecedora.

Agradeço aos professores da área de concentração em Periodontia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da FOU SP, **Prof. Dr. Claudio Mendes Pannuti**, **Profa. Dra. Cristina Cunha Villar**, **Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito**, **Prof. Dr. João Batista Cesar Neto**, **Profa. Dra. Luciana Saraiva** e **Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer**, pelas oportunidades, aprendizados e receptividade.

Agradeço, pelo apoio institucional, à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), ao Departamento de Estomatologia da FOU SP, às pessoas

de **Catia Tiezzi dos Santos, Maria Cecília Forte Muniz, Fernando Nunes e Marília Camargo Gomes.**

Agradeço aos membros componentes da banca de defesa de dissertação de mestrado **Prof. Dr. Emanuel Rovai** (Universidade de Taubaté/SP), **Profa. Dra. Luciana Saraiva** (Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/SP) e **Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva da Câmara** (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/SP), pelas considerações e ponderações apontadas para o aprimoramento desse estudo e pelas impressões sobre carreira, obrigado.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Mestrado processo #130262/2020-0.

“É como se a gente estivesse escolhendo de
que borda da Terra plana vamos pular.”
– Luana Araújo

RESUMO

Balzarini DA. Anticorpo anti-RANKL como modulador da perda óssea alveolar em periodontite experimental induzida em animais: uma revisão sistemática [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida

A periodontite é caracterizada pela inflamação nos tecidos periodontais e consequente perda das estruturas de suporte do dente: osso alveolar, cemento e ligamento periodontal, podendo levar à perda de dentes. A homeostase do tecido ósseo é gerida fundamentalmente pela regulação da via de sinalização composta pelo Receptor Ativador do fator Nuclear κ B (RANK), seu ativador RANK Ligante (RANKL), e o falso ligante de RANKL Osteoprotegerina (OPG). O processo inflamatório destrutivo e com gatilho incerto da doença periodontal aumenta a expressão de RANKL, levando a desregulação no *turnover* ósseo, desbalanceado para reabsorção maior que a formação do osso alveolar. Visando reduzir danos ou promover resolução da inflamação, terapias de modulação da resposta imune do hospedeiro surgem como alternativa para manuseio da periodontite para além da abordagem sobre microrganismos uma vez que indivíduos respondem de maneiras diferentes ao tratamento e possuem diferentes padrões de perda óssea. Anticorpos anti-RANKL demonstraram serem capazes de diminuir a reabsorção óssea em processos inflamatórios e já foram apontados com potencial terapêutico sobre patologias que levam a reabsorção óssea, bem como a periodontite. Com o propósito de verificar o potencial de modulação da perda óssea alveolar por anticorpo anti-RANKL sobre a doença periodontal induzida em animais, este estudo foi conduzido seguindo as normas PRISMA e da Cochrane Lybrary. Estudos pré-clínicos em modelo animal de periodontite experimental foram considerados elegíveis. A busca eletrônica incluiu as bases de dados MEDLINE, EMBASE e LILACS e Web of Science para artigos publicados até agosto de 2022. O Risco de Viés foi analisado através da ferramenta Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentations. Foram incluídos 5 de 326 estudos encontrados nas bases de dados. Anticorpos anti-RANKL de diferentes origens foram ministrados em diferentes modelo de periodontite

experimental induzida. Os estudos selecionados apresentaram importantes características a serem observadas na condução de estudos em animais. Essa revisão sistemática concluiu que a modulação da interação entre RANK e RANKL mediada por anticorpo anti-RANKL apresenta um potencial terapêutico adjunto ao manuseio da doença periodontal desde que considerado o momento de uso dessa abordagem. Além disso, mais estudos de farmacodinâmica e farmacocinética são necessários para aplicações sobre a periodontite.

Palavras-chave: RANK Ligante, Denosumabe, Anticorpo, nf kappa b, periodontite, revisão sistemática.

ABSTRACT

Balzarini DA. Anti-RANKL antibody as alveolar bone loss modulator in experimental induced periodontitis in animals: a systematic review [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

Periodontitis is a disease characterized by inflammation in periodontal tissues and consequent loss of tooth support structures: alveolar bone, cementum, and periodontal ligament, which can lead to tooth loss. Bone tissue homeostasis is fundamentally managed by the regulation of the signaling pathway composed of the Activating Receptor of Nuclear factor κ B (RANK), its activator RANK Ligand (RANKL), and the false RANKL ligand Osteoprotegerin (OPG). The destructive inflammatory process has uncertain trigger at periodontitis, but it increases the expression of RANKL, leading to dysregulation in bone turnover, unbalanced for resorption greater than alveolar bone formation. Aiming to reduce damage or promote resolution of inflammation, host immune response modulation therapies emerge as an alternative for managing periodontitis additionally to the well-established approach to the microbial control, since individuals respond differently to treatment and have different patterns of bone loss. Anti-RANKL antibodies have been shown to be able to decrease bone resorption unleashed by inflammatory processes and have already been shown to have therapeutic potential on pathologies that lead to bone resorption, as well as periodontitis. To verify the potential for modulating alveolar bone loss by anti-RANKL antibody on periodontitis induced in animals, this study was conducted following PRISMA and Cochrane Lybrary guidelines. Preclinical studies in an animal model of experimental periodontitis were considered eligible. The search included MEDLINE, EMBASE and LILACS and Web of Science databases for published articles until August 2022. Risk of Bias was analyzed using the Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentations tool. 5 of 326 studies found in the databases were included to this analysis. Anti-RANKL antibodies of different origins were administered in different models of experimental induced periodontitis. The selected studies presented important characteristics to be observed when conducting studies in animals. This systematic review concluded that modulation of the interaction between

RANK and RANKL mediated by anti-RANKL antibody presents a therapeutic potential adjunct to the management of periodontal disease as long as the timing of use of this approach is considered. In addition, further pharmacodynamics and pharmacokinetic studies are needed for applications on periodontitis.

Keywords: RANK Ligand, Denosumab, antibody, nf kappa b, periodontitis, systematic review.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Ciclo destrutivo autossustentado da doença periodontal e possíveis adjuvantes terapêuticos com respectivos alvos para modulação da resposta imunológica do hospedeiro	34
Figura 2.2 - Estruturas proteicas. A) Domínios de IgG1; B) Proteína fusionada a partir de recombinação da Região Fc de IgG com proteína ligante ao alvo de interesse; C) Evolução da síntese de anticorpos monoclonais. Anticorpo de rato (azul), anticorpo Quimérico com região constante humana (lilás) e região variável de rato, anticorpo humanizado com região constante humana e região variável humana com pequenas variações de rato, e anticorpo inteiramente humanizado.	38
Figura 5.1 - Diagrama de fluxo da seleção de estudos	41
Quadro 5.1 - Dados coletados a partir dos estudos selecionados	43
Quadro 5.2 - Risco de viés por domínios dos estudos selecionados.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RANK	receptor ativador de fator nuclear κ B
RANKL	ligante de receptor ativador de fator nuclear κ B
OPG	osteoprotegerina
IgG	imunoglobulina G
TNF	fator de necrose tumoral
Dmab	denosumabe
DP	doença periodontal
AINE	anti-inflamatório não esteroide
Ab	anticorpo
mAb	anticorpo monoclonal
RoB	risk of bias (risco de viés)
PROSPERO	International Prospective Register of Systematic Reviews
SYRCLEs	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
LPS	lipopolissacarídeo
Omp29	proteína Omp29 de membrana externa de Aa

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
mm	milímetros
κ	kappa
mm ²	milímetros quadrados
p	probabilidade de significância
>	maior que
<	menor que
n	tamanho amostral
=	igual a

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR NA PERIODONTITE.....	25
2.2	MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO NA DOENÇA PERIDONTAL	26
2.3	ANTICORPO ANTI-RANKL	28
3	PROPOSIÇÃO	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	PICO QUESTION	33
4.2	REGISTRO DO ESTUDO	33
4.3	FONTES DE INFORMAÇÃO	33
4.4	ESTRATÉGIA DE BUSCA	34
4.5	SELEÇÃO DE ESTUDOS	34
4.5.1	Critérios de Elegibilidade	35
4.6	EXTRAÇÃO DE DADOS	36
4.7	RISCO DE VIÉS EM ESTUDOS EM ANIMAIS	36
5	RESULTADOS	39
5.2	SÍNTESE DOS RESULTADOS	41
5.2.1	Perda Óssea Alveolar Avaliada.....	43
5.3	RISCO DE VIÉS E QUALIDADE DE EVIDÊNCIA	46
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO A – Registro PROSPERO	65

1 INTRODUÇÃO

A Periodontite é uma doença crônica inflamatória associada a microrganismos e que acomete os tecidos que circundam e suportam os dentes, incluindo o osso alveolar, sendo considerada a maior causa de perda de elementos dentários (1,2). Atualmente, o padrão de cuidado para a periodontite é a terapia periodontal de controle de infecção, que consiste na remoção do fator etiológico microbiano. Entretanto, a resposta imunológica do hospedeiro pode interferir no alcance de um desfecho favorável uma vez que os indivíduos possuem diferentes susceptibilidades para a periodontite (3).

Recentemente, o paradigma de uma resposta imunológica aberrante do hospedeiro frente à ameaça bacteriana ser causa necessária para a degradação do periodonto foi reconsiderado uma vez que o câmbio de um processo inflamatório para uma condição de destruição tecidual possui gatilho incerto. A destruição dos tecidos periodontais é, atualmente, atribuída a um microambiente – imunológico e microbiológico – alterado dentro da bolsa gengival, este sim sendo causa suficiente e necessária para que ocorra a degradação dos tecidos periodontais (4,5).

Essa patologia surge, então, da quebra da homeostase entre microbiota oral e hospedeiro suscetíveis, levando à disbiose e resposta inflamatória destrutiva fornecendo nutrientes que permitem que a microbiota disbiótica cresça e persista a partir de produtos gerados da degradação tecidual (6) (Figura 2.1).

A inflamação nos tecidos periodontais que pode promover a osteoclastogênese, e consequente reabsorção óssea, possui gatilho incerto (7). No entanto, o processo de reabsorção óssea alveolar está bem estabelecido em modelos humanos e animais e envolve predominantemente mecanismos dependentes de receptor ativador do fator de necrose tumoral, o receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK) e seu ligante, RANK-ligante (RANKL) (8,9).

RANK é uma proteína transmembrânica expressa em diversos tipos celulares, dentre eles, fibroblastos, linfócitos, células de linhagem macrófaga e células dendríticas e que, quando ativado pelo seu ligante, RANKL, promove uma resposta intracelular levando à diferenciação e ativação de osteoblastos. RANKL é uma proteína secretada por diversos tipos celulares, como osteoblastos e células T

ativadas. OPG, também chamada de fator inibidor de osteoclastogenese, é uma proteína falso ligante para RANKL, secretada por células mesenquimais e esteoblásticas e que atua como falso receptor de RANKL e inibe a interação RANK-RANKL (10).

A Razão entre RANKL e OPG é determinante para a manutenção da homeostase e do *turnover* ósseo e aumento nessa razão já foram demonstradas em condições de osteólise patogênica (11). Essas moléculas estão presentes não somente nos tecidos ósseos, mas em mecanismos de sinalização e mecanismos reguladores no sistema imunológico (12,13). RANKL, também originado em células T, pode aumentar significativamente a resposta imunológica, promovendo a sobrevivência e função de células dendríticas (CD), os mais potentes apresentadores de antígenos.

A inflamação, como principal responsável pela degradação dos tecidos periodontais, se apresenta, atualmente, como alvo de novas propostas terapêuticas (14), denominadas terapias de modulação do hospedeiro, as quais visam aspectos específicos da resposta inflamatória (15).

Terapias de modulação do hospedeiro objetivam modificar a resposta do hospedeiro, reduzindo aspectos prejudiciais ou promovendo processos de resolução da resposta inflamatória (16). Assim, pacientes que não responderam com melhorias da saúde periodontal após abordagem de controle microbiano ou que apresentam alterações imunológicas como fatores modificadores para periodontite, podem ser beneficiados por essas alternativas (15,17).

Desta forma, diminuir especificamente os aumentados níveis de RANKL presentes na doença periodontal (18–20) através da especificidade antígeno-anticorpo pode ser uma possível alternativa para modulação da reabsorção óssea alveolar imunomediada (6,16).

Assim, o objetivo desta revisão sistemática foi avaliar os efeitos de anticorpo (Ab) anti-RANKL sobre a perda óssea alveolar de periodontite experimental induzida em animais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR NA PERIODONTITE

Caracterizada pela destruição irreversível dos tecidos periodontais – cimento, ligamento periodontal e osso alveolar – e de etiologia atrelada à interação entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e microbiota disbiótica (8), a periodontite possui como tratamento a remoção da infecção oportunista e manutenção de controle microbiano (21), além de intervenção sobre os fatores de risco que podem ser controlados: diabetes, tabagismo e controle de biofilme dental pelo paciente (22).

O perfil inflamatório da gengivite se designa por um infiltrado de células T, enquanto a lesão da periodontite envolve predominantemente células B e plasmócitos imunoglobulinas(23). A mudança de perfil inflamatório de células T para células B, incluindo possui gatilho incerto (24) e a função do rol de interleucinas presentes em ambos cenários, tanto para a mudança de perfil inflamatório, celular e humoral, de inata para adquirida, quanto para a destruição tecidual também não está totalmente clara (25).

A reabsorção óssea patológica é um processo fisiológico de maior importância para compreender a questão central da periodontite (26). Porém antes da patologia, a homeostase deve ser entendida para aclarar temas pertinentes a processos patológicos. O eixo de sinalização RANK-RANKL-OPG já está estabelecido como determinante para manutenção dos tecidos ósseos e, portanto, muito estudado para compreensão de mecanismos fisiopatológicos sobre acometimentos de tecidos ósseos (24,25).

Uma razão aumentada na expressão de RANKL/OPG pela regulação anormal de superexpressão de RANKL encontra-se localmente presente na DP (19,20). Estudos sobre o papel de RANKL apontam esta molécula como uma significativa abordagem para o tratamento da periodontite e para melhor compreensão da reabsorção óssea imunomediada (19,20).

2.2 MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO NA DOENÇA PERIODONTAL

Muitos estudos mostraram a função biológica relacionando a interação RANK-RANKL com o sistema imunológico (27), desenvolvimento de órgãos linfoides (28), regulação de metástase óssea e iniciação e evolução do câncer de mama (29). Nessa perspectiva, inibidores de RANKL podem ser eficazes no manuseio de patologias com reabsorção dos tecidos ósseos (30).

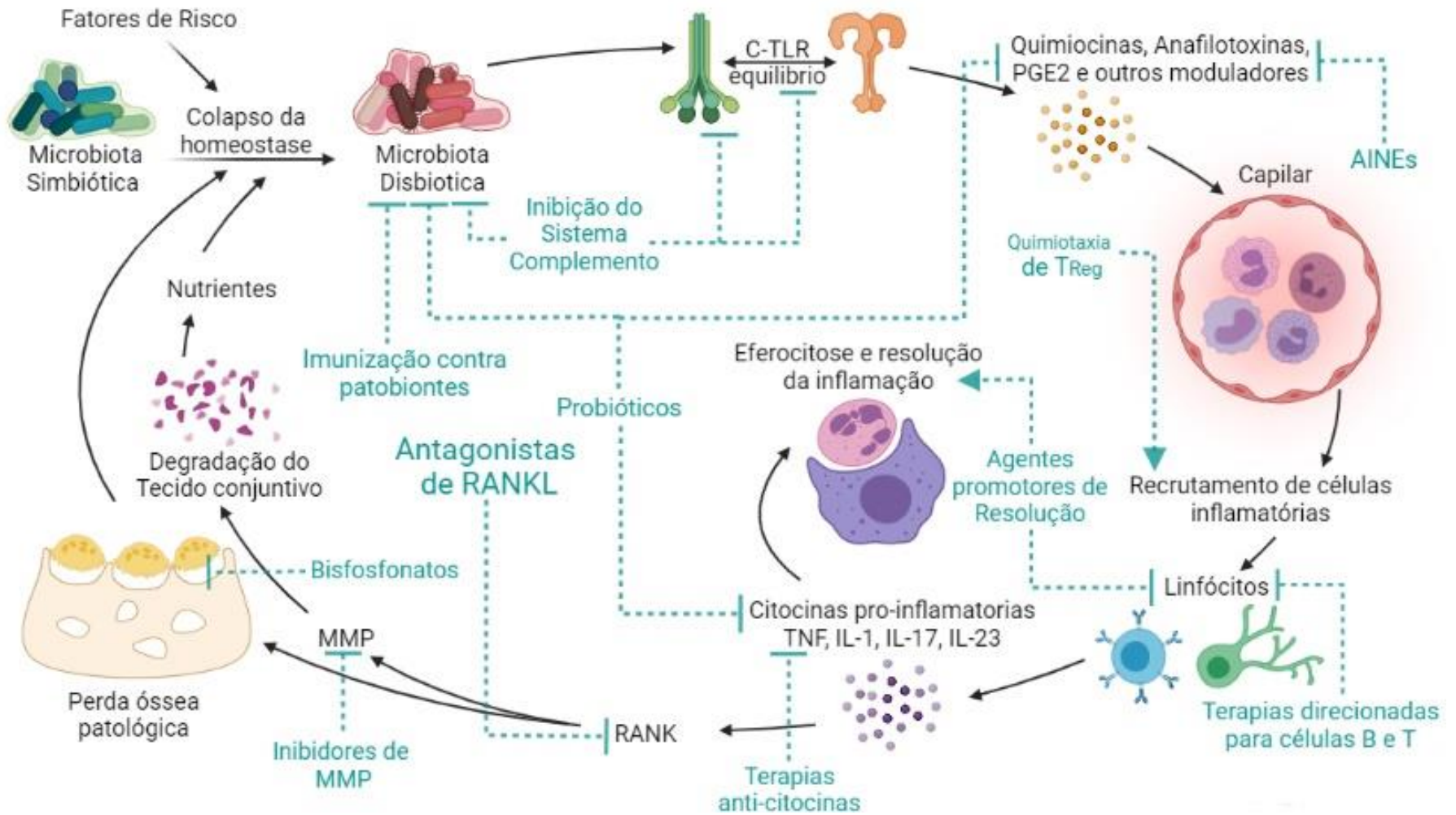
Considerando a resposta imunológica do hospedeiro como fator etiológico para a periodontite, agentes de modulação da resposta imune do hospedeiro podem esmiuçar a etiologia e proporcionar perspectivas de possíveis alvos terapêuticos (15).

Dentre os agentes de modulação da resposta imune do hospedeiro sobre a periodontite, elencam-se atualmente, como possíveis alvos de manejo adjunto da doença, a inibição do sistema complemento (31), anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (32), quimiocinas para células T (33), agentes promotores de resolução da inflamação (34), bisfosfonatos (35), inibidores de metaloproteinase da matriz (MMP) (36), antagonistas de RANK (37), probióticos (38), terapias anti-citocinas e imunizantes contra patobiontes (6).

A superexpressão de RANKL presente na periodontite (8) coloca essa molécula como alvo terapêutico na modulação da resposta do hospedeiro (6).

As alternativas de intervenção na modulação da resposta imune podem ser diversas para cada alvo específico e os estudos sobre essas alternativas se mostram em constantes avanços (16,19). Um exemplo de fármaco biomodulador para esse fim é o Denosumabe (AMG-162), um anticorpo monoclonal (mAb) inteiramente humano com alta afinidade e especificidade para RANKL humano que surgiu depois de formulações de moléculas que se ligam a RANKL, inibindo sua capacidade de ativação de RANK (39,40).

Figura 2.1 - Ciclo destrutivo autossustentado da doença periodontal e possíveis adjuvantes terapêuticos com respectivos alvos para modulação da resposta imunológica do hospedeiro



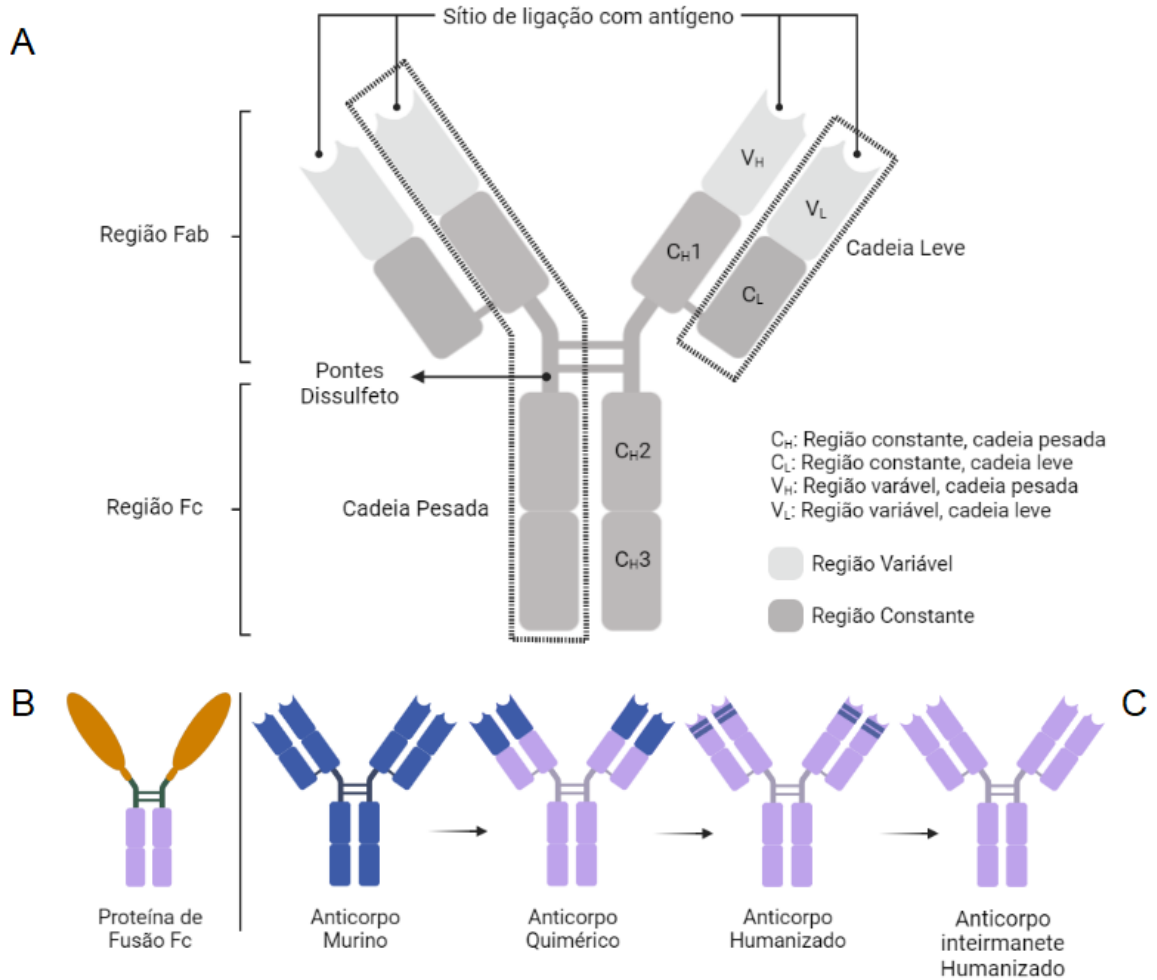
Fonte: Adaptado de Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD, 2020 (6). Criado com BioRender.com

2.3 ANTICORPO ANTI-RANKL

Inibidores de RANKL foram sintetizados para prevenir a interação RANK-RANKL e estudar as implicações das funções desencadeadas a partir da sinalização intracelular promovida e reduzir a reabsorção óssea. Esses inibidores foram sintetizados a partir da fusão de moléculas de OPG ou RANK recombinadas com o domínio Fc de Imunoglobulina G (IgG)¹(Figura 2.2 A) tais como Fc-OPG e OPG-Fc - fusões de OPG com a porção Fc de IgG, e RANK-Fc, fusão do domínio extracelular de RANK com porção Fc de IgG (Figura 2.2 B). Entretanto, essas proteínas recombinantes apresentaram características importantes quando consideradas para uso farmacológico: RANK-Fc apresentou falta de especificidade com o sítio de ligação, podendo ligar se a outros membros da superfamília TNF, e OPG-Fc ou Fc-OPG possuem uma meia vida breve e conseqüente necessidade de menores intervalos entre as doses ou pouca biodisponibilidade *in situ* (41).

Deste cenário, o anticorpo monoclonal (mAb) Denosumabe (AMG 162) (Dmab) inteiramente humano (Figura 2.2 C) que inibe desenvolvimento, ativação e sobrevivência de osteoclastos por se ligar a RANKL e prevenir a ativação de RANK, foi desenvolvido (42). A decisão de uso do fármaco Dmab foi aprovada pelo United States Food and Drug Administration (FDA) em 2009 para o tratamento de osteoporose pós menopausa (43), para osteoporose em homens (44), para tumores associados a tecidos ósseos e prevenção de eventos relacionados a efeitos esqueléticos em pacientes com metástase óssea (45) e pacientes com tumor ósseo de célula gigante sem possibilidade de ressecção (46). Vários ensaios atualmente testam as atividades do Dmab como um adjuvante para inibidores de RANKL imunológico e perda óssea patológica (47–49)

Figura 2.2 - Estruturas proteicas. A) Domínios de IgG1; B) Proteína fusionada a partir de recombinação da Região Fc de IgG com proteína ligante ao alvo de interesse; C) Evolução da síntese de anticorpos monoclonais. Anticorpo de rato (azul), anticorpo Quimérico com região constante humana (lilás) e região variável de rato, anticorpo humanizado com região constante humana e região variável humana com pequenas variações de rato, e anticorpo inteiramente humanizado.



Fonte: O autor. Criado com BioRender.com

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de anticorpo anti-RANKL sobre a perda óssea alveolar em periodontite experimental induzida em animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliar o efeito de anticorpo anti-RANKL sobre a perda óssea alveolar em periodontite experimental induzida em animais, esse estudo foi desenhado e realizado como revisão sistemática de acordo com as normas *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (50) e com o *Cochrane Handbook of Systematic Reviews of Interventions* (51).

4.1 PICO QUESTION

Animais com periodontite induzida (P) tratados com Ab Anti-RANKL como terapia de modulação do hospedeiro (I) comparada com animais com periodontite induzida sem intervenção terapêutica de modulação do hospedeiro (C) apresentam menor perda óssea alveolar (O)?

4.2 REGISTRO DO ESTUDO

O protocolo de estudo dessa revisão sistemática foi registrado no National Institute for Health Research PROSPERO, International Prospective Register of Systematic Reviews (<http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO>), sob o número de registro #CRD42021252593 (Anexo A).

4.3 FONTES DE INFORMAÇÃO

Pesquisamos os bancos de dados MedLine (via PubMed), Web of Science, LILACS e Embase entre 03 de maio de 2021 e 15 de abril de 2022. Nossa estratégia de pesquisa completa e termos de pesquisa foram definidos em “Advanced” com operadores lógicos booleanos “AND” e “OR” referindo-se a doença periodontal e Ab

anti-RANKL. Apenas artigos em inglês foram pesquisados. Foram excluídos artigos de revisão, erratas, cartas, comentários, editoriais, não in vivo e in vitro. Estudos duplicados que resultaram de diferentes bancos de dados eletrônicos foram removidos e gerenciados pelo aplicativo Rayyan para revisões sistemáticas (52).

4.4 ESTRATÉGIA DE BUSCA

O instrumento de busca elaborado e utilizado para a seleção dos estudos nas bases de dados foi o que segue:

("AMG 162" OR "RANKL inhibitor" OR "mAb anti-RANKL" OR "RANKL Ab inhibitor" OR "RANKL antibody inhibitor" OR "RANKL antibody" OR "RANKL monoclonal antibody" OR "RANK ligand inhibitor" OR "denosumab" OR "Dmab" OR "anti-RANKL" OR "Prolia" OR "Pralia" OR "Ranmark" OR "Xgeva" OR "615258-40-7" OR "anti receptor activator of NF- κ B ligand Ab" OR "anti-RANKL monoclonal antibody" OR "anti-RANKL antibody" OR "anti-RANKL mAb" OR "anti-RANKL Ab" OR "anti-receptor activator of NF-kappa B ligand" OR "anti-receptor activator of NF- κ B ligand mAb") AND ("periodontal" OR "periodontal disease" OR "periodontitis" OR "alveolar bone loss" OR "periodontal defect" OR "alveolar bone loss" OR "periodontal attachment loss" OR "periodontal attachment" OR "periodontal pocket" OR "probing depth" OR "vertical defect" OR "furcation" OR "furcation defect" OR "periodontal defect" OR "periodontal lesion" OR "periodontal osseous defect" OR "intraosseous defect" OR "intra-osseous defect" OR "intra-bony defect" OR "intra-bony defect" OR "infrabony defect" OR "angular defect" OR "bony defect" OR "tooth extraction" OR "Ligadura-induced periodontitis" OR "Ligadura induced periodontitis").

4.5 SELEÇÃO DE ESTUDOS

Todos os estudos selecionados que atenderam aos critérios de inclusão foram submetidos a uma avaliação de validade e extração de dados. Os estudos excluídos e os motivos de sua exclusão foram registrados. Após a exclusão dos estudos

duplicados, dois revisores (DB e AHM) verificaram os títulos e resumos para eliminar os estudos não aplicáveis de acordo com os termos de busca predefinidos. Qualquer conflito nesta fase foi resolvido por um terceiro revisor (ESR).

4.5.1 Critérios de Elegibilidade

A seleção dos estudos foi realizada seguindo critérios de inclusão e exclusão, elencados:

- Critérios de inclusão: 1) estudos de modelos animais controlados pré-clínicos, 2) uso de Ab anti-RANKL para modular a perda óssea, 3) presença de um grupo de controle, 4) resultados de perda óssea periodontal.

-Critérios de exclusão: estudos clínicos, relatos de casos, estudos *in vitro* e revisões foram excluídos. Os estudos que não apresentaram informações suficientes sobre a terapia avaliada também foram excluídos.

Além disso, foram observadas características no desenho dos estudos, sejam elas:

- Intervenção e comparação: Ab anti-RANKL (grupos teste) em comparação a placebo (grupos de controle).

- Medidas de resultados: Para avaliar o potencial de modulação de Ab anti-RANKL, foram observados dados de avaliação de quantidade de tecido ósseo nos sítios estudados, sejam por mensuração em cortes histológicos ou micro tomografia computadorizada (μ CT).

O desfecho primário foi a avaliação da perda óssea periodontal no grupo de intervenção comparado com o controle.

4.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO ESTUDO E RISCO DE VIÉS

Uma versão adaptada da ferramenta Cochrane Risk of Bias, a ferramenta Risk of Bias (RoB) do Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation (SYRCLE's) (53), foi usada para conduzir a avaliação do risco de viés dos estudos. Os dois revisores inspecionaram independentemente os estudos recuperados. Qualquer conflito foi resolvido por um terceiro avaliador (MH).

4.6 EXTRAÇÃO DE DADOS

As seguintes informações sobre o modelo de intervenção foram extraídas: 1) Ab utilizado, 2) via de administração, 3) dosagem (dose e tempo), 4) tempo de intervenção 5) tempo de seguimento, 6) associações, 7) análise realizada para verificar os resultados. As seguintes informações do modelo de estudo foram extraídas: 1) número de animais nos grupos de controle, 2) número de animais nos grupos tratados, 3) desenho do ensaio. As características dos animais também foram extraídas da seguinte forma: 1) espécie, 2) sexo, 3) idade, 4) peso médio, 5) preparação do animal (protocolo de doença periodontal induzida). Solicitamos informações faltantes dos autores dos estudos em questão.

4.7 RISCO DE VIÉS EM ESTUDOS EM ANIMAIS

Dois revisores independentes (DB e AHM) avaliaram o risco de viés (RoB) de acordo com a Ferramenta de Risco de Viés SYSystematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE) (53,54) com base nas variáveis de previsão:

- 1) geração de sequência;
- 2) características iniciais;
- 3) ocultação de alocação;
- 4) alojamento aleatório;

- 5) cegamento de sujeitos e pessoal;
- 6) avaliação de resultados;
- 7) cegamento dos avaliadores;
- 8) dados de resultados incompletos;
- 9) relato seletivo de resultados;
- 10) outras fontes de viés.

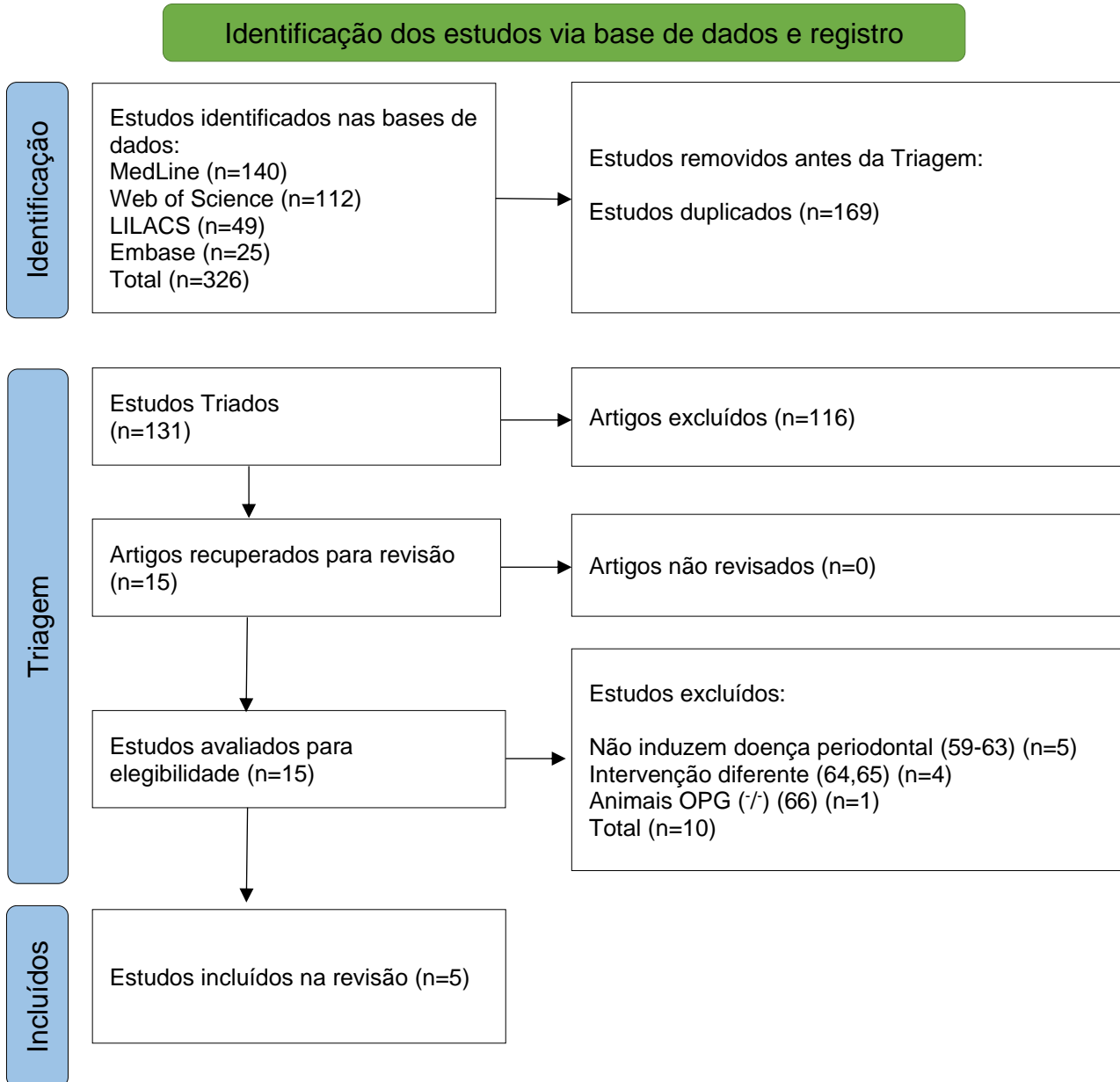
O RoB foi classificado da seguinte forma: "Sim" para indicar "baixo risco de viés", "Incerto" para indicar "risco de viés pouco claro" e "Não" para indicar "alto risco de viés" (53). A Visualização da análise de RoB foi gerada utilizando a ferramenta ROBVIS (Risk-Of-Bias VISualization) (55). Discordâncias entre examinadores foram resolvidas por um terceiro revisor (MH).

5 RESULTADOS

5.1 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ESTUDOS

Inicialmente, foram identificados 326 artigos. Após a exclusão de todas as duplicatas, restaram 131 artigos. Dois revisores leram os resumos dos 131 artigos com base nos critérios de elegibilidade e um terceiro autor foi solicitado para resolver possíveis conflitos, resultando em 116 artigos considerados irrelevantes. Portanto, 15 artigos foram lidos na íntegra com base nos mesmos critérios utilizados na primeira etapa, resultando na exclusão de 10 artigos após análise minuciosa, sendo os motivos de exclusão descritos no diagrama de fluxo de seleção de estudos (Figura 5.1). 5 estudos (56–60) foram selecionados para análise qualitativa. Nenhum estudo foi selecionado para a realização da análise quantitativa (metanálise) uma vez que os protocolos de indução de doença periodontal, dosagem de anticorpo anti-RANKL e metodologias de eleição pelos grupos de pesquisa para avaliação da perda óssea alveolar foram diferentes. As seleções dos autores tiveram coeficiente de concordância considerado quase perfeito ($\kappa > 0,81$) (61).

Figura 5.1 Diagrama de fluxo da seleção de estudos



Fonte: O autor.

Não induzem doença periodontal (48,62–65)

Intervenções diferentes (66,67)

Animais OPG (-/-)(68)

5.2 SÍNTESE DOS RESULTADOS

Os principais resultados, informações e características dos estudos selecionados são apresentados no Quadro 5.1.

Houve heterogeneidade nos protocolos de dosagem de anticorpos anti-RANKL, espécie eleita, protocolo de doença periodontal induzida, grupos tratados, desenho do estudo e medição do resultado. Cada estudo forneceu um método diferente de dosagem: 250 µg quinzenalmente, uma superdosagem realizada para induzir a osteonecrose da mandíbula (58); 3 mg/kg semanalmente (59); 1 g/sítio por 3 vezes (dias 15, 17, e 21) (57); diferentes doses (10, 1.5, 0.15, e 0.015 µg/3 sítios) por 3 vezes (dias -1, 1, e 3) (56); e 1 µg/sítio por 3 vezes (dias 5, 9, e 14) (60). Além disso, a via de administração do Ab anti-RANKL apresentou contrastes, alguns estudos por via sistêmica – intravenosa através da veia da cauda (58) ou intraperitoneal (59) – outros por via local – palato gengival (56) ou intrapapilar (57,60).

Três dos cinco estudos usaram camundongos C57BL/6J (57–59), enquanto dois deles usaram ratos da linhagem Rowett (56,60). Também houve diferenças nos protocolos de indução da doença periodontal, alguns estudos utilizaram ligadura (58,59), um estudo utilizou ligadura embebida com *Porphyromonas gingivalis* (Pg) associada à infecção *in situ* por Pg (57), outro utilizou apenas gavagem com Pg. (60), e outro utilizou micro injeção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) com lipopolissacarídeo (LPS) de Aa (56), este último estudo associou clones de células T ativadas por proteína de membrana externa Omp29 (Omp29) de Aa injetadas através da veia da cauda para avaliar a influência de células T, secretoras de RANKL (69), na doença periodontal.

As diferentes abordagens que foram utilizadas pelos estudos para indução da periodontite, e observação de perda óssea alveolar, são bem estabelecidas nos modelos já propostos na literatura (70). Entretanto, alguns aspectos devem ser considerados uma vez que cada estudo possui um objetivo e não consideram completamente um modelo humanizado de periodontite (71). Ensaios que utilizam o modelo de indução por ligadura são mais interessantes para estudar a patogênese da doença sobre a colonização microbiana (72), ensaios envolvendo Pg,

majoritariamente por gavagem, apresentam características importante sobre colonização do periodontopatógeno (73), inoculação de Aa é uma abordagem mais específica, destinada ao estudo da atividade de células B e T na periodontite (74). Todos os modelos apresentados atingem o objetivo de induzir a periodontite e perda óssea alveolar, porém, uma vez que os gatilhos que promovem a superexpressão de RANKL não estão totalmente claros e essa proteína pode ser secretada por diversos tipos celulares, ainda não é possível estabelecer o modelo mais adequado para avaliar os potenciais dessa droga.

Os estudos selecionados apresentaram diferentes perfis de comparação entre os grupos. Kim T et al. (58) compararam o grupo teste (mAb anti-RANKL + periodontite induzida) com o grupo controle (IgG normal + periodontite induzida), Kuritani et al. (59) compararam o grupo de teste (mAb anti-RANKL + periodontite induzida) com o grupo controle (solução salina + periodontite induzida), Lin J et al. (57) compararam o grupo teste (Ab anti-RANKL + periodontite induzida) com controle positivo (periodontite induzida) e controles negativos (periodontite induzida + IgG), Lin X et al. (56) compararam grupos testes (diferentes concentrações de Ab anti-RANKL + periodontite induzida + injeção na veia da cauda de clone de células T) com controle (anti-RANKL IgG + periodontite induzida + injeção na veia da cauda de clone de células T), e Han X et al. (60) compararam o grupo teste (Ab anti-RANKL + periodontite induzida) com grupo controle negativo (periodontite induzida) e controles positivos (periodontite induzida + OPG-Fc ou L6-Fc).

Quatro dos estudos foram desenhados em braços paralelos (57–60) e apenas um foi desenhado em modelo de boca dividida (56).

A fonte de anticorpos utilizada nos estudos selecionados foi diferente. Dois deles utilizaram mAb anti-RANKL (58,59), um relatou que foi produzido em coelho por imunização sem mencionar se foi obtido Ab mono ou policlonal (56), um utilizou anticorpo anti-RANKL de rato de origem de coelho adquirido da Peprotech (Rocky Hill, NJ) (57), e um não relatou a fonte (60).

5.2.1 Perda Óssea Alveolar Avaliada

Em relação à perda óssea alveolar, os resultados foram apresentados de diferentes formas. Alguns relataram a perda óssea em espessura (mm), alguns em densidade (%) e alguns em área (mm²). Três estudos encontraram reabsorção óssea significativamente menor quando o anticorpo anti-RANKL foi administrado em animais com doença periodontal induzida (57,59,60). No estudo de Kuritani et al. foi encontrada menor perda óssea alveolar com $p < 0,01$ (59) e Lin J et al. e Han et al. encontraram menor reabsorção óssea alveolar com $p < 0,05$. (57,60), em contrapartida, Lin X et al. e Kim et al. (58) não encontraram diferença significativa na reabsorção da perda óssea alveolar, $p > 0,05$ e $p > 0,01$ respectivamente (56,58).

Quadro 5.1 - Dados coletados a partir dos estudos selecionados

Estudo	Ab utilizado	Via de Administração	Dosagem	Espécie	Sexo – idade - peso médio
Kim T, 2018 (55)	mAb Anti-RANKL de camundongo (IK22-5)	Intravenoso, pela veia caudal	250 µg bissemanal Super dosagem para induzir ONJ durante todo experimento	C57BL/6J camundongo	Feminino – 6 semanas - ?
Kuritani M, 2018 (56)	mAb Anti-RANKL de camundongo (OYC1®)	Intraperitoneal	3 mg/kg no início da intervenção	C57BL/6J camundongo	Masculino – 8 semanas - ?
Lin J, 2014 (54)	Ab de coelho anti-RANKL de camundongo, Peprtech (Rocky Hill, NJ)	Papila interdental	1 g/sítio por 3 vezes (dias 15, 17, e 21)	C57BL/6J camundongo	? - 2-10 semanas - 15-20g
Lin X, 2011 (53)	Ab produzido em New Zealand White rabbits (Robert Sargeant, Ramona, CA) por imunização com RANKL de camundongo (19.4 kDa, 174 amino acids; Peprtech, Rocky Hill, NJ)	Palato gengival	Doses diferentes (10, 1.5, 0.15, e 0.015 µg/3 sítios) por 3 vezes (dias -1, 1, e 3)	Ratos Rowett	Feminino – 2 meses - ?
Han X, 2013 (57)	IgG anti-RANKL (xRANKL)	Papila interdental por palatal	1 µg/sítio 3 vezes (dias 5, 9, e 14)	Rato Rowett	Feminino - 2-3 meses - ?

Quadro 5.1 (continuação) Dados coletados a partir dos estudos selecionados

Estudo	Preparação do animal	Grupos	Tipo de estudo	Tempo de seguimento	Análise realizada e Desfecho
Kim T (55)	Ligadura por 3 semanas, uma semana após dose inicial da intervenção	Ligadura + IgG normal (n=5); Ligadura + intervenção (n=5)	Paralelo	6 semanas	μ CT (mm): Sem diferença significativa reportada
Kuritani M (56)	Ligadura por 2 semanas desde início da intervenção	Ligadura + solução salina (n=6); Ligadura + intervenção (n=6)	Paralelo	2 semanas	μ CT (μ m e %): Diferença significativa (p<0.01) em ligadura + solução salina <i>versus</i> ligadura + mAb anti-RANKL
Lin J (54)	Ligadura encharcada com Pg por 2 semanas + infecção por Pg em CMC aplicada no sulco nos dias 1 e 2.	Ligadura + infecção (n=10); Ligadura + infecção + IgG normal (n=10); Ligadura + infecção + Ab anti-RANKL (n=10)	Paralelo	4 semanas	μ CT (mm ²): Diferença significativa (p<0.05) em Ligadura + infecção <i>versus</i> infecção + Ab anti-RANKL
Lin X (53)	Microinjeção de Aa +LPS de Aa. Ratos receberam injeção de células T via veia caudal (5 x 10 ⁶ /rato)	Microinjeção + IgG normal (n=3); Microinjeção + Ab anti-RANKL: 4 grupos (0.015, 0.15, 1.5, e 10 μ g/3 sítios) (n=3 por grupo)	Boca dividida	10 dias	Microscopia (%): Sem diferença significativa em microinjeção + IgG <i>versus</i> microinjeção + Ab anti-RANKL
Han X (57)	Gavagem com Pg por 4 dias consecutivos (dias 0 a 3)	Grupo gavagem (n=4); Grupo gavagem + intervenção (n=4)	Paralelo	28 dias	Microscopia (mm). Diferença significativa (p<0.05) em gavagem <i>versus</i> gavagem + IgG anti-RANKL.

Fonte: O Autor

Conclusão

5.3 RISCO DE VIÉS E QUALIDADE DE EVIDÊNCIA

Foram obtidas 50 entradas das questões relevantes da ferramenta RoB do SYRCLE. Os estudos incluídos nesta revisão apresentaram alto risco de viés após o uso da ferramenta de análise de risco de viés (53). A Tabela 5.1 mostra os riscos de avaliação de viés dos estudos incluídos. Todos os estudos não tinham informações sobre componentes aleatórios no processo de geração da sequência e tinham informações pouco claras sobre habitação durante o experimento. Apenas dois estudos declararam cegamento do avaliador de desfecho (56,57).

Tabela 5.2 Risco de viés por domínios dos estudos selecionados

Critérios		Kim T, 2018 (55)	Kuritani M, 2018 (56)	Lin J, 2014 (54)	Han X, 2013 (57)	Lin X, 2011 (53)	
Viés de Seleção	1. Geração de	A sequência de alocação foi gerada e aplicada corretamente?	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto
		<i>Os pesquisadores descreveram o componente randômico na geração de sequência aleatória, como uma tabela de referências ou um programa de computador?</i>	Não	Não	Não	Não	Não
	2. Características iniciais	Os grupos eram similares no início do estudo ou houve algum ajuste para fatores de confusão na análise?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
		<i>A distribuição de características importantes estava balanceada para as intervenções e grupo controle?</i>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
		<i>O tempo de indução da doença foi suficiente?</i>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

Continua

Critérios		Kim T, 2018 (55)	Kuritani M, 2018 (56)	Lin J, 2014 (54)	Han X, 2013 (57)	Lin X, 2011 (53)
	As alocações foram adequadamente ocultadas?	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto
	<i>O investigador que atribui os animais ao grupo de intervenção ou controlo não prevê a atribuição devido a um dos seguintes métodos ou métodos equivalentes? Codificação de terceiros de alocação de grupos experimentais e de controle randomização central por terceiros Envelopes opacos e selados numerados sequencialmente.</i>	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto
Viés de Performance	Os animais foram alocados aleatoriamente durante o estudo?	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto
	<i>Os autores colocaram aleatoriamente as gaiolas ou animais dentro da sala/instalação de animais? Os animais foram selecionados aleatoriamente durante a avaliação dos resultados?</i>	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto
	<i>É improvável que o resultado ou a medição do resultado tenha sido influenciado por não abrigar os animais aleatoriamente?</i>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	Os cuidadores e/ou investigadores estavam cegos quanto ao conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento?	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto
5. Cegamento	<i>O cegamento de cuidadores e investigadores foi garantido e era improvável que seu cegamento pudesse ter sido quebrado?</i>	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto

Continua

Critérios		Kim T, 2018 (55)	Kuritani M, 2018 (56)	Lin J, 2014 (54)	Han X, 2013 (57)	Lin X, 2011 (53)	
Viés de Detecção	6. Avaliação de resultado	Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação dos resultados?	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto
		<i>Os investigadores escolheram aleatoriamente um animal durante a avaliação do resultado ou usaram um componente aleatório na geração da sequência para avaliação do resultado?</i>	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto
	7. Cegamento	O avaliador de resultados estava cego?	Incerto	Incerto	Sim	Sim	Incerto
		<i>O cegamento do avaliador de resultados foi garantido e era improvável que o cegamento pudesse ter sido quebrado?</i>	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto
		<i>O avaliador do resultado não foi cego, mas os autores da revisão julgam que o resultado provavelmente não será influenciado pela falta de cegamento?</i>	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto
	Viés de Atrito	8. Dados de resultado incompletos	Os dados de resultados incompletos foram tratados adequadamente?	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Todos os animais foram incluídos na análise?</i>			Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>As razões para a falta de dados de resultados provavelmente não estariam relacionadas ao resultado verdadeiro? (por exemplo, falha técnica)</i>			Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Os dados de resultados ausentes estão equilibrados em números entre os grupos de intervenção, com razões semelhantes para dados ausentes entre os grupos?</i>			Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto
<i>Os dados de resultados ausentes são imputados usando métodos apropriados?</i>			Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto

Continua

Critérios		Kim T, 2018 (55)	Kuritani M, 2018 (56)	Lin J, 2014 (54)	Han X, 2013 (57)	Lin X, 2011 (53)
Reporte de Viés	9. Relatório de resultado seletivo					
	Os relatórios do estudo estão livres de relatórios seletivos de resultados?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	<i>O protocolo do estudo estava disponível e todos os resultados primários e secundários pré-especificados do estudo foram relatados no manuscrito atual?</i>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	<i>O protocolo do estudo não estava disponível, mas estava claro que o relatório publicado incluía todos os resultados esperados (ou seja, comparando métodos e seção de resultados)?</i>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Outros	10. Outros riscos de viés					
	O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	<i>O estudo estava livre de contaminação (agrupamento de drogas)?</i>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	<i>O estudo foi livre de influência inadequada dos financiadores?</i>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	<i>O estudo estava livre de erros de unidade de análise?</i>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	<i>Os riscos de viés específicos do projeto estavam ausentes?</i>	Não	Não	Não	Não	Não
	<i>Novos animais foram adicionados aos grupos controle e experimental para substituir os desistentes da população original?</i>	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto

Conclusão

Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

Modelos animais de doença periodontal têm características úteis para investigar os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese das doenças periodontais. Esses modelos oferecem uma oportunidade para investigar etapas discretas da doença periodontal que podem ser divididas em cinco fases: i) colonização bacteriana; ii) invasão bacteriana do tecido conjuntivo através do epitélio; iii) estímulos a uma resposta inflamatória; iv) indução de ruptura do tecido conjuntivo e reabsorção do osso alveolar; v) limitação de danos por processos de reparação (73).

Ligaduras e/ou sementeira com patógenos humanos que constituem o biofilme da placa dentária (por exemplo, Pg, Aa, consórcio bacteriano) e/ou seus produtos (por exemplo, LPS) são necessários para induzir a doença periodontal. Modelos de ratos e camundongos são amplamente utilizados para estudos microbiológicos e imunológicos para entender alguns aspectos da interação do hospedeiro com patobiontes e perspectivas terapêuticas sobre a patogênese da periodontite (73,74). Os modelos animais de doença periodontal induzida propostos nos estudos recuperados para esta revisão (56–60) atingiram a perda óssea alveolar em seus procedimentos e seguem os procedimentos padronizados presentes na literatura (71,73–76).

Ainda sobre perspectivas terapêuticas, as intervenções no curso natural das doenças podem ocorrer em diferentes “níveis de prevenção” que são designados em fase pré-patogênica (promoção da saúde e proteção específica) ou fase patogênica (diagnóstico precoce e pronto tratamento, limitação da incapacidade e reabilitação) (77). Intervenções no curso natural da doença na fase patogênica ocorrem quando o manejo viável, após o diagnóstico, objetiva interromper ou estagnar o processo de progressão da doença, para evitar complicações ou sequelas da doença (78). E para a periodontite, o primeiro desafio na prevenção é um diagnóstico oportuno e preciso, porque a perda óssea alveolar é, em grande parte, irreversível, e particularmente difícil de prevenir, uma vez que os pacientes raramente procuram atendimento precoce pois a doença periodontal é, inicialmente, indolor (8).

Para avaliar os efeitos do Ab anti-RANKL como agente da terapia de modulação do hospedeiro sobre a doença periodontal, alguns aspectos sobre o momento de

intervenção devem ser explorados. O objetivo da terapia de modulação do hospedeiro na doença periodontal é quebrar um ciclo autossustentável que liga a disbiose microbiana e a inflamação destrutiva (6). A respeito disso, a condição periodontal deve ser anterior ao manejo alternativo proposto. No estudo de Lin X et al., Ab anti-RANKL foi administrando desde o dia -1 (56), e no estudo de Kim T et al., dispuseram o modelo de ligadura uma semana após a dose inicial de mAb anti-RANKL (58).

Os dois estudos que utilizaram o anticorpo anti-RANKL antes do experimento com periodontite (56,58) – fase pré-patogênica, então fase não patogênica – foram os mencionados que não encontraram diferença significativa no resultado da reabsorção óssea alveolar.

Em 2014, a American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) atualizou o termo “Bisfosfonatos-Related Osteonecrosis of the Jaw” para “Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw” (MRONJ) devido ao aumento do número de casos de osteonecrose nos ossos gnáticos associados a inibidores de angiogênese e outros medicamentos antirreabsortivos, (79).

Para melhor compreensão da etiologia de MRONJ, a combinação de um fator de risco sistêmico (por exemplo, drogas antirreabsortivas) com fatores de risco locais orais (por exemplo, doença periodontal, infecção periapical) é largamente utilizada. Pesquisas com animais tem utilizado mAb anti-RANKL em altas dosagens como fator de risco sistêmico uma vez que essa abordagem pode se apresentar como desvantagem em algumas situações, como a superdosagem (80).

O procedimento proposto por Kim T et al. (58) foi uma superdosagem de mAb anti-RANKL, como fator de risco sistêmico, associado à doença periodontal experimental na sequência, como fator de risco local oral, para induzir MRONJ e não encontrou diferença na perda óssea alveolar, embora a remoção do fator de risco local oral tenha melhorado a condição de MRONJ (58).

Além disso, os modelos animais são importantes no desenvolvimento da base científica para a compreensão dos processos patológicos. As vantagens dos estudos *in vivo* são as complexidades celulares humanas que imitam muitas vezes mais precisas do que os estudos *in vitro*, que trazem um número limitado de interações

entre tipos de células (81). No entanto, a administração de anticorpo pode levar a uma resposta anti-anticorpo devido à alta reatividade anti-alótipo de imunogenicidade que é prevista acontecer em terapia com anticorpo xenogênico – Exemplo: IgG de origem de coelho administrado em rato (82,83).

Assim, a escolha dos anticorpos utilizados também é um fator a ser discutido. Os dois estudos realizados usando mAb comercialmente disponível discordaram nos resultados de reabsorção óssea alveolar. Kim T et al. não expuseram diferença significativa na perda óssea alveolar comparando grupo teste (mAb anti-RANKL + periodontite induzida) com o grupo controle (IgG normal + periodontite induzida), embora o regime de administração do fármaco foi uma superdosagem (58), e Kuritani M et al. expuseram diferença significativa comparando grupo teste (mAb anti-RANKL + periodontite induzida) com o grupo controle (solução salina + periodontite induzida).

Alguns estudos não relataram etapas da produção de anticorpos e discordam sobre os resultados encontrados. Lin X et al. não encontraram diferença significativa comparando grupos testes (diferentes concentrações de Ab anti-RANKL + periodontite induzida + injeção na veia da cauda de clone de células T) com controle negativo (anti-RANKL IgG QUALQUER? IGM IGA IGG + periodontite induzida + injeção na veia da cauda de clone de células T) e controle positivo (periodontite induzida + injeção na veia da cauda de clone de célula T) (56), enquanto Lin J et al. encontraram menor perda óssea alveolar com significância estatística comparando grupo teste (Ab anti-RANKL + periodontite induzida) com controle positivo (periodontite induzida) (57). Han X et al. encontraram perda óssea alveolar significativamente menor comparando grupo teste (Ab anti-RANKL + periodontite induzida) com grupo controle negativo (periodontite induzida), mas não relataram informações sobre o anticorpo usado.

Em relação ao desenho do estudo, estudos de braços paralelos (57–59) e um estudo de boca dividida (56) foram recuperados da presente revisão sistemática. As propostas de randomização podem ser realizadas sobre indivíduos (braços paralelos) ou sobre sítios (boca dividida). O *design* paralelo não é apenas o mais simples, mas também o mais popular, enquanto o boca dividida requer a consideração de outros elementos na população, como a intervenção, a mensuração dos resultados da intervenção e, principalmente, o efeito *carry-across*, quando a intervenção proposta

executada em uma das partes interfere, de maneira sistêmica, na outra parte (84). O único estudo desenhado em modelo de boca dividida, Lin X et al. não obteve diferença na perda óssea alveolar comparando os grupos testes (diferentes concentrações de Ab anti-RANKL + periodontite induzida + injeção na veia da cauda de clone de células T) com controle (anti-RANKL IgG + periodontite induzida + injeção na veia da cauda de clone de células T) (56).

A perda óssea imunomediada da periodontite manifesta-se não somente pela desregulação direta do eixo RANK/RANKL/OPG. A inflamação crônica da periodontite envolve células T indiscutivelmente, no entanto, a especificidade das células T no início da periodontite é inespecífica (85). Dependendo do ambiente, a célula T, após a ativação, pode ser polarizada em subconjuntos de células auxiliares de linfócitos T efetores (86). Além disso, células T ativadas promovem a reabsorção óssea alveolar através de mecanismos diretos e indiretos através na modulação RANK/RANKL/OPG (26,87).

No estudo de Lin X et al., clones de células T específicas para Omp29 foram transferidas para os animais concomitante ao anticorpo anti-RANKL no modelo de perda óssea alveolar de periodontite experimental induzida mediada por células T, e não foi encontrada nenhuma diferença significativa na perda óssea alveolar comparando grupos testes (diferentes concentrações de Ab anti-RANKL + periodontite induzida + injeção na veia da cauda de clone de células T) com controle (anti-RANKL IgG + periodontite induzida + injeção na veia da cauda de clone de células T), no entanto, os autores apontam não encontrarem diferença estatística significativa para a perda óssea alveolar devido a antigenicidade e resposta inflamatória pelo uso de Ab anti-RANKL de rato de origem de coelho, portanto xenogênica (56).

7 CONCLUSÃO

A intervenção com anticorpo anti-RANKL parece indicar melhores resultados sobre menor reabsorção óssea em modelos animais quando a inflamação periodontal já está estabelecida.

Mais estudos de farmacodinâmica e farmacocinética em animais são necessários para estabelecer protocolos de uso dessa nova droga na periodontia.

REFERÊNCIAS¹

1. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*. 2019;394(10194):249–60.
2. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol*. 2017;44(5):456–62.
3. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89(March):S173–82.
4. Kumar PS. Microbial dysbiosis: The root cause of periodontal disease. *J Periodontol*. 2021;92(8):1079–87.
5. Scannapieco FA, Dongari-Bagtzoglou A. Dysbiosis revisited: Understanding the role of the oral microbiome in the pathogenesis of gingivitis and periodontitis: A critical assessment. *J Periodontol*. 2021;92(8):1071–8.
6. Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontol 2000*. 2020;84(1):14–34.
7. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*. 2014 Jan;35(1):3–11.
8. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:1–14.
9. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol*. 2012;39(3):239–48.
10. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):139–46.
11. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006;12(1):17–25.
12. Takayanagi H. Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(4):292–304.

¹ De acordo com estilo Vancouver

13. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May;423(6937):337–42.
14. Wang B, Shao J, Fu J, Jansen JA, Walboomers XF, Hooijmans CR, et al. Topical Host-Modulating Therapy for Periodontal Regeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Tissue Eng - Part B Rev*. 2019;25(6):526–43.
15. Balta MG, Papathanasiou E, Blix IJ, Van Dyke TE. Host Modulation and Treatment of Periodontal Disease. *J Dent Res*. 2021;100(8):798–809.
16. Preshaw PM. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontol 2000*. 2018;76(1):131–49.
17. Mark Bartold P, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):317–29.
18. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):116–51.
19. Valverde P. Pharmacotherapies to Manage Bone Loss-Associated Diseases: A Quest for the Perfect Benefit-to-Risk Ratio. *Curr Med Chem*. 2008;15(3):284–304.
20. Tompkins KA. The osteoimmunology of alveolar bone loss. *Connect Tissue Res*. 2016;57(2):69–90.
21. Lindhe J, Nyman S. The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. Vol. 2, *Journal of Clinical Periodontology*. 1975. p. 67–79.
22. Monje A, Catena A, Borgnakke WS. Association between diabetes mellitus/hyperglycaemia and peri-implant diseases: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2017 Jun;44(6):636–48.
23. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009;54:S2–10.
24. Tsukasaki M. RANKL and osteoimmunology in periodontitis. *J Bone Miner Metab*. 2021;39(1):82–90.
25. Tanaka S. RANKL-Independent Osteoclastogenesis: A Long-Standing Controversy. *J Bone Miner Res*. 2017;32(3):431–3.
26. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. *J Immunol Res*. 2015;2015.
27. Ahern E, Smyth MJ, Dougall WC, Teng MWL. Roles of the RANKL–RANK axis in antitumour immunity — implications for therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(11):676–93.

28. Brendolan A, Caamaño JH. Mesenchymal cell differentiation during lymph node organogenesis. *Front Immunol.* 2012;3(DEC):1–6.
29. Bădilă AE, Rădulescu DM, Niculescu AG, Grumezescu AM, Rădulescu M, Rădulescu AR. Recent advances in the treatment of bone metastases and primary bone tumors: An up-to-date review. *Cancers (Basel).* 2021;13(16):1–27.
30. Li B, Wang P, Jiao J, Wei H, Xu W, Zhou P. Roles of the RANKL–RANK Axis in Immunity—Implications for Pathogenesis and Treatment of Bone Metastasis. *Front Immunol.* 2022;13(March):1–16.
31. Hajishengallis G, Hasturk H, Lambris JD, Apatzidou DA, Belibasakis GN, Bostanci N, et al. C3-targeted therapy in periodontal disease: moving closer to the clinic. *Trends Immunol.* 2021;42(10):856–64.
32. Drosos AA, Pelechas E, Voulgari P V. Treatment strategies are more important than drugs in the management of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2020;39(4):1363–8.
33. Yu H. Targeting s1prs as a therapeutic strategy for inflammatory bone loss diseases—beyond regulating s1p signaling. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):1–15.
34. Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan CN, et al. Resolvin E1 Regulates Inflammation at the Cellular and Tissue Level and Restores Tissue Homeostasis In Vivo. *J Immunol.* 2007;179(10):7021–9.
35. Koide Y, Kataoka Y, Hasegawa T, Ota E, Noma H. Effect of systemic bisphosphonate administration on patients with periodontal disease: a systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ Open.* 2022;12(3):e057768.
36. Luchian I, Goriuc A, Sandu D, Covasa M. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in Periodontal and Peri-Implant Pathological Processes. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3).
37. Anastasilakis AD, Toulis KA, Polyzos SA, Terpos E. RANKL inhibition for the management of patients with benign metabolic bone disorders. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18(8):1085–102.
38. Albuquerque-Souza E, Balzarini D, Ando-Suguimoto ES, Ishikawa KH, Simionato MRL, Holzhausen M, et al. Probiotics alter the immune response of gingival epithelial cells challenged by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2019;54(2):115–27.
39. Pageau SC. Denosumab. *MAbs.* 2009;1(3):210–5.
40. Narayanan P. Denosumab: A comprehensive review. *South Asian J Cancer.* 2013;02(04):272–7.

41. Anastasilakis AD, Toulis KA, Polyzos SA, Anastasilakis CD, Makras P. Long-term treatment of osteoporosis: Safety and efficacy appraisal of denosumab. *Ther Clin Risk Manag.* 2012;8:295–306.
42. Baron R, Ferrari S, Russell RGG. Denosumab and bisphosphonates: Different mechanisms of action and effects. *Bone.* 2011;48(4):677–92.
43. McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH, et al. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density: Commentary. *Obstet Gynecol Surv.* 2006;61(6):384–6.
44. Kostenuik PJ, Nguyen HQ, McCabe J, Warmington KS, Kurahara C, Sun N, et al. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. *J Bone Miner Res.* 2009;24(2):182–95.
45. Body JJ, Facon T, Coleman RE, Lipton A, Geurs F, Fan M, et al. A study of the biological receptor activator of nuclear factor- κ ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(4):1221–8.
46. Thosani S, Hu MI. Denosumab: A new agent in the management of hypercalcemia of malignancy. *Futur Oncol.* 2015;11(21):2865–71.
47. Blomberg Jensen M, Andreassen CH, Jørgensen A, Nielsen JE, Juel Mortensen L, Boisen IM, et al. RANKL regulates male reproductive function. *Nat Commun.* 2021;12(1):1–15.
48. Poubel VL do N, Capella DL, Santos ARS, Correa M, Ruhland L, Rivero ERC. Evaluation of Mandibular Bone After Dental Extraction in Rats Treated With Antiresorptive Drugs. *J Oral Maxillofac Surg.* 2018;76(3):474–82.
49. Chen JH, Lin CY, Chen YCM, Tian WT, Chu HM, Chang TW. Bispecific Antibody Binding to RANKL and Osteonectin with Enhanced Localization to the Bone. *Mol Pharm.* 2017;14(11):4113–20.
50. Shamseer L, Moher D, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (prisma-p) 2015: Elaboration and explanation. *BMJ.* 2015;349(January):1–25.
51. Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, et al. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions.* Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. 2019. 1–694 p.
52. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev.* 2016;5(1):1–10.
53. Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE’s risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol.* 2014 Dec 26;14(1):43.

54. de Vries RBM, Hooijmans CR, Langendam MW, van Luijk J, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, et al. A protocol format for the preparation, registration and publication of systematic reviews of animal intervention studies. *Evidence-based Preclin Med.* 2015;2(1):e00007.
55. McGuinness LA, Higgins JPT. Risk-of-bias VISualization (robvis): An R package and Shiny web app for visualizing risk-of-bias assessments. *Res Synth Methods.* 2021;12(1):55–61.
56. Lin X, Han X, Kawai T, Taubman MA. Antibody to receptor activator of NF- κ B ligand ameliorates T cell-mediated periodontal bone resorption. *Infect Immun.* 2011;79(2):911–7.
57. Lin J, Bi L, Yu X, Kawai T, Taubman MA, Shen B, et al. Porphyromonas gingivalis exacerbates ligature-induced, RANKLdependent alveolar bone resorption via differential regulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4. *Infect Immun.* 2014;82(10):4127–34.
58. Kim T, Kim S, Song M, Lee C, Yagita H, Williams DW, et al. Removal of Pre-Existing Periodontal Inflammatory Condition before Tooth Extraction Ameliorates Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw–Like Lesion in Mice. *Am J Pathol.* 2018;188(10):2318–27.
59. Kuritani M, Sakai N, Karakawa A, Isawa M, Chatani M, Negishi-Koga T, et al. Anti-mouse RANKL antibodies inhibit alveolar bone destruction in periodontitis model mice. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(4):637–43.
60. Han X, Lin X, Yu X, Lin J, Kawai T, LaRosa KB, et al. Porphyromonas gingivalis infection-associated periodontal bone resorption is dependent on receptor activator of NF- κ B ligand. *Infect Immun.* 2013;81(5):1502–9.
61. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics.* 1977;33(1):159.
62. Zhu L, Wei H, Wu Y, Yang S, Xiao L, Zhang J, et al. Licorice isoliquiritigenin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro and prevents inflammatory bone loss in vivo. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Jul;44(7):1139–52.
63. Aghaloo TL, Cheong S, Bezouglaia O, Kostenuik P, Atti E, Dry SM, et al. RANKL Inhibitors Induce Osteonecrosis of the Jaw in Mice With Periapical Disease. *J Bone Miner Res.* 2014 Apr;29(4):843–54.
64. da Silva LAB, Longo DL, Stuani MBS, de Queiroz AM, da Silva RAB, Nelson-Filho P, et al. Effect of root surface treatment with denusomab after delayed tooth replantation. *Clin Oral Investig.* 2021;25(3):1255–64.
65. Francisconi CF, Vieira AE, Azevedo MCS, Tabanez AP, Fonseca AC, Trombone APF, et al. RANKL Triggers Treg-Mediated Immunoregulation in

Inflammatory Osteolysis. *J Dent Res*. 2018;97(8):917–27.

66. Yuan H, Gupte R, Zelkha S, Amar S. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2011 Nov;38(11):1029–36.
67. Hu Y, Yu P, Yu X, Hu X, Kawai T, Han X. IL-21/anti-Tim1/CD40 ligand promotes B10 activity in vitro and alleviates bone loss in experimental periodontitis in vivo. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;1863(9):2149–57.
68. Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, et al. Osteoprotegerin-Deficient Male Mice as a Model for Severe Alveolar Bone Loss: Comparison With RANKL-Overexpressing Transgenic Male Mice. *Endocrinology*. 2013 Feb 1;154(2):773–82.
69. Chen N-J, Huang M-W, Hsieh S-L. Enhanced Secretion of IFN- γ by Activated Th1 Cells Occurs Via Reverse Signaling Through TNF-Related Activation-Induced Cytokine. *J Immunol*. 2001;166(1):270–6.
70. Marchesan J, Girnary MS, Jing L, Miao MZ, Zhang S, Sun L, et al. An experimental murine model to study periodontitis. *Nat Protoc*. 2018;13(10):2247–67.
71. Rojas C, García MP, Polanco AF, González-Osuna L, Sierra-Cristancho A, Melgar-Rodríguez S, et al. Humanized Mouse Models for the Study of Periodontitis: An Opportunity to Elucidate Unresolved Aspects of Its Immunopathogenesis and Analyze New Immunotherapeutic Strategies. *Front Immunol*. 2021;12(June).
72. Lin P, Niimi H, Ohsugi Y, Tsuchiya Y, Shimohira T, Komatsu K, et al. Application of ligature-induced periodontitis in mice to explore the molecular mechanism of periodontal disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16).
73. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa Jr C. Animal Models to Study Host-Bacteria Interactions Involved in Periodontitis. In: *Bone*. 2011. p. 117–32.
74. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental Animal Models in Periodontology: A Review. *Open Dent J*. 2010;4(1):37–47.
75. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011.
76. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013 Aug;394(1–2):49–54.
77. Leavell HR. Teamwork in the service of health. *Am J Public Health*. 1954;44(11):1393–401.

78. Leavell HR, Clark GE. *Medicina Preventiva*. In: McGraw-Hill do Brasil. II. Rio de Janeiro: McGraw-Hill do Brasil; 1976. p. 11–36.
79. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw - 2014 update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72(10):1938–56.
80. Ueda N, Nakashima C, Aoki K, Shimotsuji H, Nakaue K, Yoshioka H, et al. Does inflammatory dental disease affect the development of medication-related osteonecrosis of the jaw in patients using high-dose bone-modifying agents? *Clin Oral Investig*. 2021;25(5):3087–93.
81. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa Jr C. Animal Models to Study Host-Bacteria Interactions Involved in Periodontitis. In: *Bone*. 2011. p. 117–32.
82. Hwang WYK, Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods*. 2005;36(1):3–10.
83. De Groot AS, Scott DW. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends Immunol*. 2007;28(11):482–90.
84. Lesaffre E, Philstrom B, Needleman I, Worthington H. The design and analysis of split-mouth studies: What statisticians and clinicians should know. *Stat Med*. 2009 Dec 10;28(28):3470–82.
85. Campbell L, Millhouse E, Malcolm J, Culshaw S. T cells, teeth and tissue destruction – what do T cells do in periodontal disease? *Mol Oral Microbiol*. 2016;31(6):445–56.
86. Matzinger P, Kamala T. Tissue-based class control: The other side of tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(3):221–30.
87. Hathaway-Schrader JD, Novince CM. Maintaining homeostatic control of periodontal bone tissue. *Periodontol 2000*. 2021 Jun 10;86(1):157–87.

ANEXO A – Registro PROSPERO

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews

NHS
National Institute for
Health Research



CRD42021252593

Animal review

1. * Review title.

Give the working title of the review. This must be in English. The title should have the interventions or exposures being reviewed and the associated health or social problems.

Anti-RANKL antibody as host modulation therapy in experimental periodontitis: A systematic review.

2. Original language title.

For reviews in languages other than English, this field should be used to enter the title in the language of the review. This will be displayed together with the English language title.

3. * Anticipated or actual start date.

Give the date when the systematic review commenced, or is expected to commence.

03/05/2021

4. * Anticipated completion date.

Give the date by which the review is expected to be completed.

31/12/2021

5. * Stage of review at time of this submission.

Indicate the stage of progress of the review by ticking the relevant Started and Completed boxes. Additional information may be added in the free text box provided.

Please note: Reviews that have progressed beyond the point of completing data extraction at the time of initial registration are not eligible for inclusion in PROSPERO. Should evidence of incorrect status and/or completion date being supplied at the time of submission come to light, the content of the PROSPERO record will be removed leaving only the title and named contact details and a statement that inaccuracies in the stage of the review date had been identified.

This field should be updated when any amendments are made to a published record and on completion and publication of the review.

The review has not yet started: No

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



Review stage	Started	Completed
Preliminary searches	Yes	No
Piloting of the study selection process	No	No
Formal screening of search results against eligibility criteria	No	No
Data extraction	No	No
Risk of bias (quality) assessment	No	No
Data analysis	No	No
Provide any other relevant information about the stage of the review here.		

6. * Named contact.

The named contact acts as the guarantor for the accuracy of the information presented in the register record.

Marinella Holzhausen Caldeira

Email salutation (e.g. "Dr Smith" or "Joanne") for correspondence:

Dr Holzhausen

7. * Named contact email.

Enter the electronic mail address of the named contact.

marinella@usp.br

8. * Named contact address.

Enter the full postal address for the named contact.

Avenida Professor Lineu Prestes, 2227, São Paulo, SP, 05508-000, Brazil

9. Named contact phone number

Enter the telephone number for the named contact, including international dialling code.

+55(11)30917833

10. * Organisational affiliation of the review.

Full title of the organisational affiliations for this review and website address if available. This field may be completed as 'none' if the review is not affiliated to any organisation.

University of São Paulo

Organisation web address:

<http://www.fo.usp.br/>

11. * Review team members and their organisational affiliations.

Give the personal details and the organisational affiliations of each member of the review team. Affiliation

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



refers to groups or organisations to which review team members belong. **NOTE: email and country are now mandatory fields for each person.**

Mr Danilo Balzarini. University of São Paulo
 Mr Aldrin Huaman Mendoza. University of São Paulo
 Professor Emanuel Silva Rovai. University of São Paulo
 Professor Marinella Holzhausen Caldeira. University of São Paulo

12. * Funding sources/sponsors.

Give details of the individuals, organisations, groups or other legal entities who take responsibility for initiating, managing, sponsoring and/or financing the review. Any unique identification numbers assigned to the review by the individuals or bodies listed should be included.

No funding sources/sponsors.

Grant number(s)

13. * Conflicts of interest.

List any conditions that could lead to actual or perceived undue influence on judgements concerning the main topic investigated in the review.

None

14. Collaborators.

Give the name, affiliation and role of any individuals or organisations who are working on the review but who are not listed as review team members.

15. * Review question.

Give details of the question to be addressed by the review, clearly and precisely.

In vivo animal models, are antibody anti-RANKL effective as host modulator on periodontal disease, in comparison with control?

Context and rationale

Provide a brief description of the context and rationale of the review, including information on the relevance of your review for human health (max 250 words).

Periodontal disease is characterized by inflammation in periodontal tissues that leads to loss of tooth support structures: alveolar bone, cementum and periodontal ligament. Bone tissue remodeling is regulated by the RANK/RAKL/OPG pathway and interferences in this pathway by inflammatory processes, as in periodontal disease, imply disruption in bone turnover. Host modulation therapies targets to modulate host's damage or to promote resolution. Anti-RANKL monoclonal antibody have been shown to decrease bone resorption in solid tumors and have already been identified as potential targets for modulation therapy for periodontal disease. To our knowledge, there are no systematic reviews that assessed the benefits of anti-RANKL as host modulation therapy for periodontal disease in order to understand the quality of these studies. Thus, the aim of this systematic review is to evaluate the effects of use of Anti-RANKL antibody in experimental periodontal disease in animal models, compared to control.

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews

16. * Searches.

Give details of the sources to be searched, and any restrictions (e.g. language or publication period). The full search strategy is not required, but may be supplied as a link or attachment.

The MEDLINE, EMBASE, Web of Science and LILACS databases will be searched up to May 2021. Medical subject headings (MeSH) terms and keywords will be combined with Boolean operators and will be used to search the databases. No restrictions will be applied to our search.

17. URL to search strategy.

Give a link to the search strategy or an example of a search strategy for a specific database if available (including the keywords that will be used in the search strategies).

https://www.crd.york.ac.uk/PROSPEROFILES/252593_STRATEGY_20210601.pdf

Alternatively, upload your search strategy to CRD in pdf format. Please note that by doing so you are consenting to the file being made publicly accessible.

Do not make this file publicly available until the review is complete

18. * Human disease modelled.

Give a short description of the disease, condition or healthcare domain being modelled.

Induced/experimental periodontal disease in animals

19. * Animals/population.

Give summary criteria for the animals being studied by the review, e.g. species, sex, details of disease model. Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

All animal models with periodontal disease.

Exclusion criteria:

Not animal models, animal models with other bone defects (not periodontal).

20. * Intervention(s), exposure(s).

Give full and clear descriptions of the nature of the interventions or the exposures to be reviewed (e.g. dosage, timing, frequency). Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

Anti-RANK antibody tested for modulating periodontal disease progression

Exclusion criteria:

Anti-RANKL tested for other conditions

21. * Comparator(s)/control.

Where relevant, give details of the type(s) of control interventions against which the experimental condition(s) will be compared (e.g. another intervention or a non-exposed control group). Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

Another drug for periodontal disease, a non-exposed control group, animals undergoing no treatment at all,

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



baseline measurements

Exclusion criteria:

Another intervention but not for periodontal disease

22. * Study designs to be included.

Give details of the study designs eligible for inclusion in the review. If there are no restrictions on the types of study design eligible for inclusion, or certain study types are excluded, this should be stated. Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

Pre-clinical controlled animal model studies with a separate control group.

Exclusion criteria:

Not an animal study, clinical studies, case reports, in vitro studies, studies without a separate control group.

23. Other selection criteria or limitations applied.

Give details of any other inclusion and exclusion criteria, e.g. publication types (reviews, conference abstracts), publication date, or language restrictions.

Excluded: Reviews, systematic reviews

24. * Outcome measure(s).

Give detail of the outcome measures to be considered for inclusion in the review. Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

Alveolar bone measurement, immunologic profile

Exclusion criteria:

Outcomes that do not assess periodontal conditions.

25. N/A.

This question does not apply to systematic reviews of animal studies for human health submissions.

26. * Study selection and data extraction.

Procedure for study selection

Give the procedure for selecting studies for the review, including the screening phases (title and/or title-abstract and/or full-text), the number of researchers involved, and how discrepancies will be resolved.

Two reviewers (DB and AHM) will assess independently the titles and abstracts to determine their initial potential inclusion. Then, full manuscript will be examined to decide whether the studies met the inclusion criteria. Disagreements will be solved by discussion with a third reviewer (ESR). Selected studies that meet the inclusion criteria will be considered for validity assessment and data extraction. The studies that are excluded and the reasons for their exclusion will be recorded.

Prioritise the exclusion criteria

PROSPERO International prospective register of systematic reviews

Multiple exclusion criteria may apply to an abstract/paper, which can cause discrepancies between reviewers in the reason for exclusion recorded. To avoid this, it is helpful to prioritize the exclusion criteria (e.g. 1) not an animal study; 2) not a myocardial infarction model, etc.) and record the highest ranking applicable criterion as the reason for exclusion. Please sort the exclusion criteria defined in questions 19 to 24. If applicable, do so for each screening phase.

- 1) Outcomes that do not assess periodontal disease;
- 2) not animal models;
- 3) animal models with other bone defects that non alveolar bone;
- 4) animals with a disease;
- 5) anti-RANKL antibody tested for other bone defects (not periodontal defects);
- 6) anti-RANKL antibody tested for other conditions;
- 7) another intervention but not for periodontal host modulation therapy;
- 8) not an animal study
- 9) Clinical studies;
- 10) Case reports;
- 11) in vitro studies;
- 12) studies without a separate control group.
- 13) Reviews, systematic reviews

Methods for data extraction

Describe methods for data extraction, including the number of reviewers performing data extraction, extraction of data from text and/or graphs, whether and how authors of eligible studies will be contacted to provide missing or additional data, etc.

Data will be extracted independently by two reviewers (DB and AHM), with disagreements solved by discussion with a third reviewer (ESR). The authors of the selected publications will be contacted for clarification of data or to provide missing data if necessary. Data extraction will be from text and table. extraction will be from text and table.

Data to be extracted: study design

Specify the data to be extracted related to characteristics of the study design, e.g. controlled versus cross-over, number of experimental groups, etc.

Number of experimental groups, number of control groups, number of animals per groups, drug administration.

Data to be extracted: animal model

Specify the data to be extracted related to characteristics of the animal model, e.g. species, sex of the animals, etc.

Specie, sex, age, experimental induced periodontal disease model.

Data to be extracted: intervention of interest

Specify the data to be extracted related to characteristics of the intervention of interest, e.g. dose, timing, etc. dose, timing, route of drug administration

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



Data to be extracted: primary outcome(s)

Define the primary outcome measure(s). For each outcome measure, specify in which format data will be extracted, including the eligible units of measurement, and data type (continuous/dichotomous). A description of any other manipulation or transformation of the extracted data that is planned may be included.

- Alveolar bone loss: continuous (mm); - Histological evaluation: qualitative

Data to be extracted: secondary outcome(s)

Define the secondary outcome measure(s). For each outcome measure, specify in which format data will be extracted, including the eligible units of measurement, and data type (continuous/dichotomous). A description of any other manipulation or transformation of the extracted data that is planned may be included.

MicroCT: continuous (mm) Immunological profile, if there are common cytokines evaluated: continuous (pg mL⁻¹),

Data to be extracted: other

Specify any other data or study characteristics to be extracted, e.g. bibliographical details, such as author, year and language.

Bibliographical details, journal, doi, authors, year of publication, source of funding, conflicts of interest, ethical statement, citation.

27. * Risk of bias and/or quality assessment.

State whether and how risk of bias and/or study quality will be assessed. Assessment tools specific for pre-clinical animal studies include [SYRCLE's risk of bias tool](#) and the [CAMARADES checklist](#) for study quality

No risk of bias and/or quality assessment planned

No

By use of SYRCLE's risk of bias tool

Yes

By use of SYRCLE's risk of bias tool adapted as follows:

No

By use of the CAMARADES checklist for study quality

No

By use of the CAMARADES checklist for study quality, adapted as follows:

No

Other criteria, namely

No

Method for risk of bias and/or quality assessment

Give the procedure for the risk of bias and/or quality assessment, including the number of reviewers involved, their contribution, and how discrepancies will be resolved.

Data will be extracted independently by two reviewers (DB and AHM), according to SYRCLE's risk of bias tool: articles will be classified as A (low risk of bias), B (high risk of bias) or C (unclear), all disagreements solved by discussion with a third reviewer (ESR).

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



Supporting Online Material, if available, will be accessed for clarification of data or to provide missing data.

Data extraction will be from text and tables.

28. * Strategy for data synthesis.

Planned approach

For each outcome measure, specify whether a quantitative or narrative synthesis is planned and how this decision will be made.

We are planning a narrative synthesis gathering in particular qualitative comparison of outcomes in periodontal bone loss.

We will provide a narrative synthesis of the findings from the included studies, structured around the type of intervention (anti-RANKL antibody), target population characteristics (animal models), type of outcome (alveolar bone loss) and intervention content. We will provide summaries of anti-RANKL antibody effects for each study by calculating standardized mean differences, according to the outcome.

If a meta-analysis is planned, please specify the following:

Effect measure

For each outcome measure, specify the effect measure to be used (e.g. mean difference, odds ratio etc.).

The data will be organized in a categorial worksheet with information about sample, intervention (dose, timing, route of drug administration) , parameters analyzed (mostly alveolar bone loss), results, conclusion.

We plan to perform meta-analysis if at least two studies are included.

If heterogeneity is higher than 40%, we plan to conduct sensitivity analysis excluding each study one at a time.

Effect models

For each outcome measure, specify the statistical model of analysis (e.g. random-effects or fixed-effect model).

For outcomes that are measured using different scales / metrics, the standardized average difference between treatments will be calculated, also with the 95% confidence interval.

For outcomes that present their data in means, and are measured in the same unit of measurement, the weighted mean difference between treatments will be calculated, associated with their 95% confidence interval, for outcomes that present their data in means, and are measured in the same unit of measurement.

Finally, the difference in risk between treatments will be calculated for outcomes that are presented as frequencies.

Heterogeneity

Specify the statistical methods to assess heterogeneity (e.g. I^2 , Q). For further guidance please refer to the [introduction](#) and [practical guide](#) to pre-clinical meta-analysis.

Statistical heterogeneity will be verified using Cochran's Q test and inconsistency using I^2 statistics.

Sensitivity analysis will be conducted in case of significant heterogeneity. For all analyzes, an alpha value equal to 5% will be adopted.

Other

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



Specify other details of the meta-analysis methodology (e.g. correction for multiple testing, correction for multiple use of control group).

Unplanned

29. * Analysis of subgroups or subsets.

Subgroup analyses

Give any planned exploration of subgroups or subsets within the review. 'None planned' is a valid response if no subgroup analyses are planned.

None planned

Sensitivity

For each outcome measure, specify any sensitivity analyses you propose to perform.

None planned

Publication bias

Specify whether an assessment of publication bias is planned. If applicable, specify the method for assessment of publication bias.

we will use contour-enhanced funnel plots and Egger's test to identify publication bias.

30. * Review type.

Type of review

Animal model review

No

Experimental animal exposure review

No

Pre-clinical animal intervention review

Yes

31. Language.

Select each country individually to add it to the list below, use the bin icon to remove any added in error.

English

There is an English language summary.

32. * Country.

Select the country in which the review is being carried out from the drop down list. For multi-national collaborations select all the countries involved.

Brazil

33. Other registration details.

List other places where the systematic review protocol is registered. The name of the organisation and any unique identification number assigned to the review by that organisation should be included.

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews



34. Reference and/or URL for published protocol.

Give the citation and link for the published protocol, if there is one.

Add web link to the published protocol.

Or, upload your published protocol here in pdf format. Note that the upload will be publicly accessible.

No I do not make this file publicly available until the review is complete

Please note that the information required in the PROSPERO registration form must be completed in full even if access to a protocol is given.

35. Dissemination plans.

Give brief details of plans for communicating essential messages from the review to the appropriate audiences.

Yes

Give brief details of plans for communicating review findings.?

a paper will be submitted to a leading journal in this field

36. * Keywords.

Give words or phrases that best describe the review. Separate keywords with a semicolon or new line.

Anti-RANKL antibody; anti-RANKL; mAb anti-RANKL; alveolar bone; periodontitis; systematic review

37. Details of any existing review of the same topic by the same authors.

Give details of earlier versions of the systematic review if an update of an existing review is being registered, including full bibliographic reference if possible.

38. * Current review status.

Review status should be updated when the review is completed and when it is published.

Please provide anticipated publication date

Review_Ongoing

39. Any additional information.

Provide any further information the review team consider relevant to the registration of the review.

40. Details of final report/publication(s) or preprints if available.

This field should be left empty until details of the completed review are available OR you have a link to a preprint. Give the full citation for the preprint or final report or publication of the systematic review.

Give the link to the published review or preprint.