



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

LETÍCIA CHAVES FERREIRA

**Plasma rico em plaquetas: uma terapia preventiva para a osteonecrose dos maxilares
associada à terapia com bisfosfonatos.**

Araçatuba – SP

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

LETÍCIA CHAVES FERREIRA

Plasma rico em plaquetas: uma terapia preventiva para a osteonecrose dos maxilares associada à terapia com bisfosfonatos.

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Adj. Edilson Ervolino.

Araçatuba – SP

2018

Dedicatória

Dedico esse trabalho de conclusão de curso à pessoa mais importante da minha vida, e a principal responsável por essa conquista, minha mãe Cassileide Gonçalves Chaves. Você é meu maior exemplo de mulher, mãe e guerreira, ama seus filhos e faz qualquer coisa por eles. Tenho muito orgulho da pessoa que és, trabalhava em dois empregos e fazia faculdade a noite para nos proporcionar uma vida melhor. Eu nunca serei capaz de te agradecer o suficiente por tudo que você faz por mim e representa na minha vida. Meu amor por ti é incondicional, e se um dia tive a oportunidade de escolher ser sua filha, quero que saiba que o faria mil outras vezes. A jornada até aqui foi longa e de muita luta, e você é a minha maior incentivadora, obrigada por acreditar na minha capacidade. Espero um dia ser uma mãe como você, eu te amo muito.

Agradecimentos

Á Banca Examinadora

Professor Edilson, meu orientador desde o primeiro ano de graduação, primeiramente obrigada pela oportunidade de me apresentar ao fantástico mundo da pesquisa científica. Quando me convidou para trabalhar com você fiquei muito feliz, desse momento até hoje já se passaram quase seis anos e eu sou ainda mais feliz por ter me convidado. Aprendi muito ao seu lado, você é uma pessoa de muitas virtudes, extremamente dedicado e perfeccionista, o famoso padrão Edilson Ervolino. Sei que sou geniosa e difícil de convencer, então gostaria de me desculpar e, agradecer pela paciência e carinho. O senhor será sempre meu orientador, confio muito no seu trabalho, obrigada por me permitir fazer parte dessa equipe.

Professora Leticia Helena Theodoro, que mulher incrível! Primeiramente obrigada por ter aceitado estar aqui nesse momento tão importante da minha vida. Você é uma pessoa de muito caráter, muito séria e correta, te admiro muito. Desde quando começamos a trabalhar juntas na clínica nos demos muito bem, você me ensina demais, e eu me sinto honrada por isso. Obrigada por acreditar no meu trabalho, saiba que levarei comigo cada um dos seus ensinamentos com muito amor.

Professora Sandra Helena Penha de Oliveira, a gênio dos adrenérgicos e colinérgicos. Foi você a responsável pela minha paixão pela farmacologia, seu amor em ensinar inspira e, sua alegria dentro da sala faz o tão difícil segundo ano se tornar inesquecível. Obrigada por ser essa referência de mulher forte, independente e além de tudo inteligentíssima. A senhora é inspiração na minha vida, obrigada por estar aqui nesse momento.

Á Família ZOL

Tenho tanto a agradecer a todo vocês que é difícil saber por onde começar. Aos primeiros membros que tão bem recepcionaram, Thamires mulher determinada e com uma memória incrível, nunca esquecia do algodão. Luan, meu amigo, não tenho palavras pra agradecer o quanto você me ajudou e me ensinou em todos esses anos, obrigada por estar sempre disponível para mim e por segurar as pontas quando eu surtava. Nunca esquecerei de tudo que você representa e de quão maravilhoso será este futuro histologista certificado. Fernanda, que entrou comigo nessa jornada e cresceu dentro de ciência ao meu lado, obrigada por todos os momentos de estudos e gordices. Tiago e Luy, meus bixos, e a Daniela que chegaram depois pra fazer parte da equipe, obrigada por todo esse tempo de convivência, por todo carinho e momentos divertidos que vivemos. Depois vieram as minha Jéssicas, minhas pupulinhas, que vocês tenham muito sucesso na jornada de vocês, tenho muito apreço por vocês. E agora aos que estão entrando, Mariane, Eduardo e Isabela, que vocês se apaixonem por esse grupo assim como eu, e que a Família ZOL aumente e leve cada vez mais reconhecimento para casa. Guardarei todos com muito amor em meu coração.

Aos Meus Amigos

Á minha irmã que me acompanhou durante esses seis anos, Geane Gomes Barreto. Quem diria que Deus traria uma companheira dessas pra vida em amiga? Sou grata por ter você na minha vida, por tudo que já fez por mim e principalmente por sempre estar ao meu lado. Uma verdadeira irmã que levarei para o resto da minha vida, estarei sempre disponível para você. Sua presença na minha jornada foi imprescindível, te amo muito.

Á irmã que o cursinho me deu, Leticia Nardoni Marteli, e que sem a menor dúvida levarei por toda minha vida. Sua amizade é muito especial pra mim, sei que posso contar com você pra tudo e saiba que é recíproco. Obrigada por todos os momentos que vivemos juntas e, por estar comigo nos momentos de dificuldade. Anjo na minha vida, espero que Deus encha sua vida de bênçãos, te amo muito tata.

Á Bruna Borela, minha amiga que o cursinho também trouxe e será uma arquiteta de muito sucesso. Obrigada por todos os momentos felizes que vivemos juntas, tenho orgulho de seu

esforço e dedicação, não tenho dúvidas que seu caminho será abençoado, porque você merece muito!! Te amo minha morena.

Á minha loira linda, Ana Claudia Ervolino, muito obrigada por ser essa pessoa tão agradável e parceira. Adoro sua presença e todos os papéis são muito melhores com você!!! Sentirei sua falta, que seu caminho seja de muito sucesso.

Aos meus amigos do Sesc que passaram a fazer parte da minha rotina, e se tornaram muito especiais na minha vida!! Gisele, Arthur, Rodolfo, Thiago e Luiz, obrigada pela parceria, e parabéns pela qualidade dos profissionais que são.

Á Doutora Wania Pontes

Querida Wania, minha eterna odontopediatra, você foi minha maior inspiração para me tornar dentista, desde criança admirava-me ao vê-la trabalhar e isso foi essencial para que eu descobrisse a minha vocação. Sou muito grata por todos esses anos de cuidado, carinho e atenção conosco, então obrigada!! Você é muito especial e merece todo sucesso e reconhecimento, tanto profissional quanto pessoal. Te adoro muito!!

Ao meu companheiro de vida

João Martins, quanta coisa já vivemos juntos em? Agora estamos literalmente do outro lado do mundo, a comunicação ficou mais dificultada e a distância se faz presente, mas apesar de tudo você é o companheiro que eu escolhi pra minha vida. Na sua defesa a professora Leticia disse que eu tinha sorte de ter você, e ela tem razão, você é uma pessoa dedicada, esforçada e inteligente. Tenho orgulho do homem que és, obrigada por ser porto seguro, por me apoiar sempre e nunca me deixar desistir de nada. Você é excepcional, e merecedor de um caminho de alegria e sucesso, um profissional dedicado e caprichoso. Espero poder viver ao seu lado, para que sua jornada não seja mais só sua, e sim nossa!! Te amo muito, você é uma pessoa muito especial e que o2019 nos traga muitas conquistas!!

Á Minha Família

Ao meu pai, Daniel Alexandre Ferreira, que apesar de morar longe a pelo menos 16 anos, sempre se fez presente em minha vida. Obrigada por acreditar em mim, e por todas e cada uma das cartas e cartões que você me enviava em todo esse tempo. E obrigada por me

presentear com dois tersouros, meus irmãos caçulas Noah e Zach, vocês são muito importantes na minha vida. Amo vocês.

Ao meu irmão mais velho, Calil Chaves Ferreira, que sempre cuidou de mim. Obrigada por ter caminhado ao meu lado não só nessa jornada, mas pela vida toda. Você é um homem trabalhador e esforçado, e sempre torceu por mim. Tenho certeza que será muito feliz, te amo gordo.

Às minha avós, Leide Gonçalves, que é um anjo em minha vida, obrigada por todo amor, carinho e cuidado, você é meu exemplo de como é se doar pela família. Á Irinea Ferreira, famosa vó Néia, obrigada por todo apoio e carinho durante essa jornada. Amo muito vocês, agradeço a Deus por ter vocês na minha vida.

Aos meus tios, tias e primos, que me apoiaram e torceram por mim, obrigada por sonharem ao meu lado e por eu poder compartilhar essa conquista com vocês. Que Deus ilumine e proteja a vida de todos vocês, amo vocês.

Á Deus

Obrigada senhor pela minha vida em primeiro lugar, por me auxiliar em todos os momentos de dificuldade e desespero. Sua presença na minha vida é inenarrável, e eu sou grata por ser tão abençoada. Obrigada ao meu anjo da guarda que vive me livrando de unas peças que a vida me prega. Me perdoe pelos meus erros, e antes de tudo meu pai, me ensine a ser uma pessoa melhor a cada dia.

“Como sou pouco e sei pouco, faço o pouco que me cabe me doando por inteiro.”

Ariano Suassuna

Ferreira, LF. **Plasma rico em plaquetas: uma terapia preventiva para a osteonecrose dos maxilares associada à terapia com bisfosfonatos.** Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2018.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da aplicação local do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo no sítio de extração dental de ratas que apresentam os principais fatores de risco para a osteonecrose dos maxilares associada a terapia medicamentosa (MRONJ). Durante sete semanas ratas senis foram submetidas a tratamento sistêmico com veículo (VEH e VEH-PRP) ou 100 µg/Kg de zoledronato (ZOL e ZOL-PRP) com um intervalo de dois dias entre as aplicações. Após três semanas coletou-se 1,5mL de sangue, via punção cardíaca, e realizou-se a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Em VEH-PRP e ZOL-PRP o sangue foi destinado ao preparo do PRP, o qual foi aplicado no sítio de extração dental. A eutanásia foi realizada aos 28 dias pós-operatórios. Nas amostras do sítio de extração dental e adjacências foi efetuada análise imunoistoquímica para detecção de fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 1 beta (IL-1 β), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), proteína morfogenética óssea 2/4 (BMP-2/4), osteocalcina (OCN) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Em ZOL constatou-se menor imunomarcagem para PCNA, VEGF, BMP2/4, OCN e TRAP. A imunomarcagem para TNF α e IL-1 β em ZOL foi maior que nos demais grupos. Em VEH e ZOL-PRP houve similaridade na marcação para VEGF, BMP2/4 e OCN. A aplicação local de PRP autólogo se mostrou uma terapia preventiva viável, segura e efetiva para restabelecer a capacidade das células envolvidas no processo de reparação tecidual do sítio de extração dental e evitar a MRONJ durante tratamento com dose oncológica de zoledronato.

PALAVRAS CHAVES: Osteonecrose dos Maxilares Associada a Terapia Medicamentosa, plasma rico em plaquetas, prevenção, alvéolo dental, cicatrização da ferida.

Ferreira, LF. **Platet Rich Plasma: a preventive therapy to the medication-related osteonecrosis of the jaw.** Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2018.

Abstract

This study evaluated the effects of local application of autologous platelet-rich plasma (PRP) on the tooth extraction site of rats presenting the main risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). For seven weeks, senile rats were submitted to systemic treatment with vehicle (VEH and VEH-PRP) or 100 µg/Kg of zoledronate (ZOL and ZOL-PRP) every two days. After three weeks were collected 1,5 ml of blood via cardiac puncture, and the first lower left molar was extracted. The blood was used for the PRP preparation, and in the VEH-PRP and ZOL-PRP it was applied at the tooth extraction site and adjacencies. Euthanasia was performed at 28 days postoperative. Immunohistochemical analyses were carried out in histological sections from the tooth extraction site to indentify the immunolabeling pattern for tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin 1 beta (IL-1 β), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), vascular endothelial growth factor (VEGF), bone morphogenetic protein 2/4 (BMP2/4), osteocalcin (OCN) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). ZOL showed a higher immunolabeling for TNF α and IL-1 β . In addition, ZOL presented lower immunolabeling for PCNA, VEGF, BMP2/4, OCN and TRAP. VEH and ZOL-PRP showed similarities in the imunolabeling for VEGF, BMP2/4 and OCN. Local application of autologous PRP showed a viable preventive therapy, which is safe and effective to restore tissue repair capacity of the tooth extraction site and prevent MRONJ during treatment with zoledronate.

KEYWORDS: Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw, platelet rich plasma, prevention, tooth socket, wound healing.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Design experimental. (A): Esquema ilustrando os procedimentos experimentais realizados durante o estudo. (B): Instalação da ligadura ao redor do primeiro molar inferior esquerdo para indução da periodontite experimental. (C): Periodontite experimental após três semanas da instalação da ligadura. (D): Procedimento cirúrgico da extração dentária. (E): Aspecto clínico do alvéolo dental antes da aplicação do PRP. (F): Aspecto do PRP ativado. (G): Aspecto clínico do alvéolo dental depois da aplicação do PRP. 38
- Figura 2 - Padrão de imunomarcção para TNF α e IL-1 β no alvéolo dental. 39
A – B: Gráfico apresentando a imunomarcção para TNF α (A) e IL-1 β (B) no tecido do alvéolo dental nos diferentes grupos experimentais 28 dias após extração dentária. C – J: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TNF α (C, E, G, I) e IL-1 β (D, F, H, J) no grupo VEH (C, D), VEH-PRP (E, F), ZOL (G,H), e ZOL-PRP (I,J). Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação a VEH; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação a VEH-PRP; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL. Amplificação do original: 1000x. Barra de escala: 25 μ m.
- Figura 3 - Padrão de imunomarcção para PCNA e VEGF no alvéolo dental. 40
A – B: Gráfico apresentando a imunomarcção para PCNA (A) e VEGF (B) no tecido do alvéolo dental nos diferentes grupos experimentais 28 dias após extração dentária. C – J: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para PCNA (C, D, G, H) e VEGF (E, F, I, J) no grupo VEH (C, E), VEH-PRP (D, F), ZOL (G,I), e ZOL-PRP (H,J). Símbolos: setas pretas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação a VEH; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação a VEH-PRP; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL.

diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL. Amplificação do original: 1000x. Barra de escala: 25 µm.

Figura 4 - Padrão de imunomarcção para BMP2/4 e OCN no alvéolo dental. A – B: Gráfico apresentando a imunomarcção para BMP2/4 (A) e OCN (B) no tecido do alvéolo dental nos diferentes grupos experimentais 28 dias após extração dentária. C – J: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para BMP2/4 (C, E, G, I) e OCN (D, F, H, J) no grupo VEH (C, D), VEH-PRP (E, F), ZOL (G,H), e ZOL-PRP (I,J). Símbolos: setas pretas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação a VEH; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação a VEH-PRP; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL. Amplificação do original: 1000x. Barra de escala: 25 µm. 41

Figura 5 - Padrão de imunomarcção para TRAP no alvéolo dental. A – B: Gráfico apresentando a imunomarcção para células TRAP positivas (A) e células TRAP positivas acopladas a matriz óssea (B) no tecido do alvéolo dental nos diferentes grupos experimentais 28 dias após extração dentária. C – F: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP no grupo VEH (C), VEH-PRP (D), ZOL (E), e ZOL-PRP (F). Símbolos: setas pretas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação a VEH; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação a VEH-PRP; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL. Amplificação do original: 1000x. Barra de escala: 25 µm. 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

AAOMS – Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial

BPs – Bisfosfonatos

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

cm² – Centímetros quadrados

EDTA – Ácido etilenodiaminotetra-acético

Fig – Figura

FOA – Faculdade de Odontologia de Araçatuba

mm² – Milímetros quadrados

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mg/Kg – Miligramas por quilogramas

MRONJ – Osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa

PBS – Tampão fosfato alcalino

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

PE – Periodontite experimental

ROI – Região de interesse

< – Menor

μl – Microlitro

μm – Micrometro

μg/Kg – Micrograma por quilograma

tc – Tecido conjuntivo

te – Tecido epitelial

to – Tecido ósseo

x – vezes

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Certificado da Comissão de Ética em uso de animais (CEUA). 43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1. Animais.....	20
2.2. Delineamento experimental.....	20
2.3. Anestesia.....	20
2.4. Grupos experimentais	20
2.5. Periodontite experimental induzida por ligadura.....	21
2.6. Plano de tratamento medicamentoso	21
2.7. Protocolo de preparação PRP	21
2.8. Exodontia.....	22
2.9. Aplicação local do PRP	22
2.10. Eutanásia e obtenção das amostras	22
2.11. Análise qualitativa e quantitativa das plaquetas	22
2.12. Processamento histológico das amostras	23
2.13. Análise dos resultados	24
2.14. Região de interesse (ROI).....	24
2.15. Análise imunoistoquímica de TNF α e IL-1 β na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental.....	25
2.16. Análise imunoistoquímica de PCNA e VEGF na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental.....	26
2.17. Análise imunoistoquímica de BMP2/4 e OCN no tecido ósseo do sítio de extração dental.....	26
2.18. Análise imunoistoquímica de TRAP no sítio de extração dental	26
2.19. Análise estatística	26
3. RESULTADOS	28
3.1. Aspectos qualitativos e quantitativos das amostras de PRP.....	28
3.2. Padrão de imunomarcção para TNF α , IL-1 β , PCNA, VEGF, BMP2/4, OCN e TRAP.....	28
3.3. Imunomarcção para TNF α e IL-1 β na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental	28
3.4. Imunomarcção para PCNA e VEGF na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental	28
3.5. Imunomarcção para BMP2/4 e OCN no sítio de extração dental	28
3.6. Imunomarcção para TRAP no sítio de extração dental.....	29

4. DISCUSSÃO.....	30
5. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
FIGURA 1.....	38
FIGURA 2.....	39
FIGURA 3.....	40
FIGURA 4.....	41
FIGURA 5.....	42
ANEXOS.....	43

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Os bisfosfonatos (BPs) são drogas antirreabsortivas (Rogers et al., 2011; Cremers & Papapoulos, 2011) muito efetivas no tratamento de doenças ósseas líticas tais como osteoporose, doença de Paget, osteogênese imperfeita, hiperparatireoidismo primário, mieloma múltiplo, assim como, no controle de dor óssea, modulação de hipercalcemia e contenção da progressão de metástase óssea em neoplasias malignas osteotrópicas (Macedo et al., 2017; Soares et al., 2016; Drake et al., 2008). A osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (MRONJ) é umas das reações adversas ocasionadas pelo uso dos BPs, a qual seu tratamento e prevenção constituem um grande desafio na área da odontologia. A American Association of Oral and Maxillofacial Surgery (AAOMS) define a MRONJ como presença de osso exposto na região maxilofacial, por um período maior que oito semanas, em pacientes submetidos à tratamento prévio ou atual com droga antireabsortiva e que não possuem história prévia de radioterapia nos maxilares (Ruggiero et al., 2014).

A incidência da MRONJ é de 1:100.000 – 1:10.000 quando se faz uso oral de BPs em dose osteoporótica, todavia, quando se faz uso de BPs administrados por via intravenosa em dose oncológica essa incidência é de 1:100 – 1:10 (Khosla et al., 2007). Os BPs associados com a maioria dos casos de MRONJ são os nitrogenados administrados por via intravenosa, dentre os quais se destaca o mais potente desta classe, o zoledronato. Os pacientes mais acometidos por esta condição são do sexo feminino, com idade avançada e que são submetidos à terapia adjuvante com BPs para tratamento oncológico, predominantemente de mieloma múltiplo, câncer de mama e câncer de próstata. A mandíbula é o osso mais afetado e os dois principais fatores de risco locais são extração dentária e presença de doença periodontal (McGowan et al., 2017; Otto et al., 2012).

Marx (2003) foi quem primeiramente descreveu a MRONJ. Atualmente, mesmo depois de anos de investigação, sua etiopatogenia ainda não foi totalmente elucidada. Dentre os supostos fatores etiopatogênicos destacam-se: a severa inibição da atividade osteoclástica, o que impossibilitaria a remodelação óssea, e resultaria no acúmulo de tecido ósseo não vital; a ação tóxica sobre as células da mucosa bucal, o que reduziria a capacidade de reparação dos tecidos moles, conseqüentemente ocasionaria o comprometimento do tecido ósseo subjacente;

o efeito antiangiogênico, que resultaria tanto na necrose avascular do tecido ósseo quanto no comprometimento da reparação tecidual; a maior susceptibilidade à infecção uma vez que ocorre aumento na adesão e colonização de bactérias ao tecido ósseo sob terapia com bisfosfonato quando o mesmo fica exposto na cavidade bucal (Aghaloo et al., 2015; Badel et al., 2013; Migliorati et al., 2011; Allen et al., 2009).

A limitada compreensão da etiopatogenia restringe sobremaneira a prevenção e o tratamento da MRONJ, os quais não obedecem uma conduta padrão. Como prevenção tem sido predominantemente empregada a antibioticoterapia (Bermúdez-Bejarano et al., 2017), todavia, esta pode se mostrar falha (Ji et al., 2012). O tratamento tem sido efetuado por diferentes abordagens clínicas, as quais têm se baseado no estadiamento clínico da doença. A terapia tem sido medicamentosa e/ou cirúrgica (El-Rabbany et al., 2017; Hayashida et al., 2017; Rollason et al., 2016). A terapia medicamentosa consiste predominantemente no uso prolongado de agentes antimicrobianos. A terapia cirúrgica vai da conservadora à agressiva e consiste desde curetagem e/ou sequestrotomia até ressecção dos maxilares. O tratamento geralmente é longo, afeta a qualidade de vida dos pacientes, pode falhar ou resultar em sequelas (El-Rabbany et al., 2017; Hayashida et al., 2017; Rollason et al., 2016).

As propriedades biológicas apresentadas pelo plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo o colocam como uma potencial terapia preventiva para MRONJ. O PRP consiste em uma elevada concentração de plaquetas contida em um pequeno volume de plasma sanguíneo (Marx et al., 2004; Marx et al., 1998;). As plaquetas ativadas, retidas em uma matriz de fibrina, são uma fonte de moléculas bioativas capazes de promover ativação, proliferação e diferenciação de uma variedade de tipos celulares (Cohn et al., 2015).

Estudos mostram que o PRP é capaz de acelerar o processo de reparação tanto de tecido ósseo (Albanese et al., 2013; Alsousou et al. 2013; Griffin et al., 2009; Plachokova et al., 2008), quanto de tecidos moles, como tecido epitelial e conjuntivo (Chicharro-Alcántara et al., 2018; Anitua et al., 2012; Nikolidakis & Jansen, 2008; Petrunaro, 2001). Além disso, tem sido reportado que a utilização de PRP tem ação anti-inflamatória (El-Sharkawy et al., 2007) e efeito antimicrobiano (Fabbro et al., 2016). Embora o emprego do debridamento cirúrgico em associação com aplicação de PRP autólogo no tratamento de casos graves da MRONJ tenha sido bem sucedido (Del Fabbro et al., 2015), sua efetividade como terapia preventiva para esta condição ainda foi pouco explorada. Ervolino et al. (2018), em um estudo empregando avaliação clínica do sítio de extração dental, avaliação histológica do processo de

reparo alveolar e avaliação histométrica da quantidade de tecido ósseo vital e de tecido ósseo não vital no sítio cirúrgico, reportou que a aplicação de PRP autólogo no sítio de extração dental de ratas senis tratadas com zoledronato melhorou o processo de reparação tecidual e consequentemente evitou o desencadeamento da MRONJ. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da aplicação local do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo no sítio de extração dental de ratas que apresentam os principais fatores de risco para a osteonecrose dos maxilares associada a terapia medicamentosa (MRONJ). Tal avaliação consistiu em analisar no sítio de extração dental a imunomarcagem para o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) e interleucina 1 beta ($IL-1\beta$), as principais citocinas com atividade pró-inflamatória; antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), um marcador de proliferação celular; fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e proteína morfogenética óssea 2/4 (BMP-2/4), os principais fatores de crescimento que regulam a angiogênese e a osteoblastogênese/atividade osteoblástica, respectivamente; osteocalcina (OCN), um biomarcador de osteoblastos e; fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), um marcador de osteoclastos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizadas vinte e oito ratas fêmeas (*Rattus norvegicus* – Wistar) senis (20 meses) com peso corporal compreendido entre 350 – 450g. Os animais foram obtidos no Biotério Central de Criação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (FOA - UNESP) e posteriormente serão mantidos no Biotério de Experimentação da Disciplina de Histologia e Embriologia da FOA-UNESP sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, acondicionamento em caixas plásticas, onde terão livre acesso ao alimento e à água. Serão tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento. O protocolo experimental seguiu as normas estabelecidas pelo “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA – UNESP (00581-2013).

2.2. Delineamento experimental

2.3. Anestesia

Os procedimentos cirúrgicos (instalação da ligadura, punção cardíaca, exodontia e eutanásia) foram executados sob anestesia com cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil).

2.4. Grupos experimentais

As ratas foram distribuídas aleatoriamente nos grupos: VEH, VEH-PRP, ZOL e ZOL-PRP. Um dia antes do início do tratamento medicamentoso foi instalada uma ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. Iniciou-se um protocolo de tratamento medicamentoso com sete semanas de duração que consistiu na administração intraperitoneal de veículo (VEH and VEH-PRP) ou zoledronato (ZOL and ZOL-PRP) a cada intervalo de dois dias. Após três semanas coletou-se 1,5mL de sangue, via punção cardíaca, e em seguida realizou-se a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. O sangue coletado dos grupos

VEH-PRP e ZOL-PRP foi destinado ao preparo do PRP. Em VEH e ZOL não foi efetuado nenhum tratamento local. Em VEH-PRP e ZOL-PRP foi aplicado PRP autólogo no sítio de extração dental. Decorridos 28 dias pós-operatórios foi efetuada a eutanásia (Fig. 1).

2.5. Periodontite experimental induzida por ligadura

Foi instalada uma ligadura de algodão (fio de algodão #24; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. A ligadura foi mantida durante três semanas com o intuito de induzir periodontite experimental (PE) (Statkiewicz et al. 2018), (Fig. 1, B-C).

2.6. Plano de tratamento medicamentoso

O plano de tratamento medicamentoso teve duração de 7 semanas. A administração de veículo ou zoledronato (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) ocorreu pela via intraperitoneal obedecendo um intervalo de dois dias entre as injeções. O veículo consistiu de 0,45mL de solução de cloreto de sódio 0,9%. A dose de zoledronato foi de 100µg/Kg, a qual foi diluída em 0,45 ml do veículo. O plano de tratamento medicamentoso e a dose de zoledronato consistiram em uma adaptação para o rato do protocolo empregado para complementação de terapia oncológica de humanos (Statkiewicz et al. 2018).

2.7. Protocolo de preparação PRP

Foi coletado 1,5 ml de sangue, via punção cardíaca, em seringa contendo 0,15ml de citrato de sódio 3.2%. A preparação do PRP foi realizada através de uma adaptação do protocolo de Sonnleitner et al. (2000). As amostras foram centrifugadas a 160 G por 20 minutos a 22°C para a separação da parte do plasma sanguíneo que contém as plaquetas. Esta foi removida e novamente centrifugada a 400 G por 15 minutos a 22 °C. O plasma pobre em plaquetas foi descartado. Com auxílio de uma micropipeta foram coletados 100µl de PRP. A centrifugação foi realizada em centrífuga refrigerada (Hermle Centrífuga Z323K, Hermle Labortechnik GmbH, Alemanha) e a manipulação das amostras foi executada em capela de fluxo laminar (Cabina de Fluxo Laminar Vertical Veco®, Veco do Brasil Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda., Brasil).

2.8. Exodontia

Após a remoção da ligadura, foi executada a anti-sepsia da cavidade bucal, sindesmotomia, luxação e extração do primeiro molar inferior esquerdo com a utilização de instrumentais odontológicos adaptados (Fig. 1, G). Imediatamente após a exodontia, as bordas das feridas cirúrgicas foram suturadas com fio de seda 4-0 (Johnson e Johnson) (esta manobra foi realizada para auxiliar o processo de reparo alveolar e para assegurar a contenção do gel de PRP ativado no interior do alvéolo).

2.9. Aplicação local do PRP

O volume de PRP foi submetido à ativação com cloreto de cálcio a 10% (ScienceLab, TX, EUA) (Fig. 1, F) e com auxílio de uma micropipeta com ponteira adaptada foi depositado no centro do alvéolo dental, de modo que tanto a raiz mesial quanto a raiz distal do sítio de extração dental ficasse preenchida por quantidades equivalentes de PRP (Fig. 1, G).

2.10. Eutanásia e obtenção das amostras

Após 28 dias da axodontia, os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com solução 0,9% de cloreto de sódio acrescida de 0,1% de heparina (100 ml), seguida de solução fixadora (800 ml) constituída de 4% de formaldeído (Sigma, Saint Louis, MO, USA) em tampão fosfato salino (PBS – Sigma, Saint Louis, MO, USA), 0,1M, 4°C, pH 7,4 (Fig. 12). As hemimandíbulas foram cuidadosamente dissecadas e submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora durante 72 horas.

2.11. Análise qualitativa e quantitativa das plaquetas

Amostras contendo 25µl de sangue e 25µl de PRP de cada rata foram empregadas para a confecção de esfregaço citológico que foi corado com mistura do tipo Romanovsky (Panótico Rápido LB, LaborClin, Brasil). Tais amostras foram submetidas à análise quantitativa e qualitativa das plaquetas em microscopia óptica.

2.12. Processamento histológico das amostras

As amostras foram desmineralizadas em 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma Chemical®) em PBS por 60 dias. Em seguida as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (70° - 80° - 90° - 95° - 100° - 100° - 100° GL), diafanizadas em xilol, impregnadas e incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo com 4 µm de espessura. A microtomia foi executada seguindo o plano sagital e a confecção das secções histológicas progrediu da face vestibular para face lingual da hemimandíbula. Foram coletados os cortes seriados da porção do alvéolo dental anteriormente ocupada pelas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior. As secções histológicas foram montadas em lâminas de vidro silanizadas.

Para análise imunohistoquímica, as secções histológicas foram divididas em sete lotes e submetidas à técnica da imunoperoxidase indireta. Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 95° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato (Diva decloaker, Biocare Medical, Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunohistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em sete lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-PCNA do rato gerado em camundongo (SC-7269, Santa Cruz Biotechnology), anti-VEGF do rato gerado em camundongo (SC-7269, Santa Cruz Biotechnology), anti-BMP2/4 do rato gerado em cabra (SC-15065, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-OCN do rato gerado em cabra (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), e anti-TRAP do rato gerado em cabra (SC-30833, Santa Cruz Biotechnology®). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 90 minutos e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 90 minutos (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit, Dako Laboratories, CA, EUA). Foi realizada a contracoloração com Hematoxilina de Harris nas amostras imunomarcadas para TRAP. As amostras

imunomarcadas para TNF α e IL-1 β não foram submetidas à contracoloração para que não houvesse interferência na análise de densidade óptica de imunomarcagem. As amostras imunomarcadas para PCNA foram contracoradas com *fast green* e as imunomarcadas para VEGF, BMP2/4, OCN e TRAP foram contracoradas com Hematoxilina de Harris. Os cortes foram então desidratados em etanol, diafanizados em xilol e, recobertos com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, EUA) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos mesmos procedimentos, suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

2.13. Análise dos resultados

As análises imunoistoquímicas foram efetuadas por um histologista certificado e blindado aos tratamentos. Para cada marcador foi utilizada uma secção histológica da porção central do alvéolo.

2.14. Região de interesse (ROI)

No presente estudo foram consideradas ROI (I), ROI (II) e ROI (III) de acordo com a imunomarcagem efetuadas.

A ROI (I) englobava uma visão panorâmica do sítio de extração dental e adjacências. Consistiu de uma área de 4mm x 4mm que englobava a porção do alvéolo anteriormente ocupado pela raiz mesial e pela raiz distal do primeiro molar inferior esquerdo e suas adjacências. O seu limite distal consistiu de uma linha situada paralelamente a superfície da dentina coronária e radicular do segundo molar inferior esquerdo, a partir da qual se estendia para a mesial por 4mm. O seu limite coronário consistiu de uma linha situada paralelamente ao limite amelo-cementário do segundo molar inferior esquerdo, a partir da qual se estendia para apical por 4mm (Statkiewicz et al. 2018).

A ROI (II) englobava amostras do tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental. Consistiu de duas áreas de 250 μ m x 250 μ m situadas no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental. A situação de tais áreas seguiu uma linha localizada no centro do tecido conjuntivo, perpendicular ao longo eixo dos dentes e que dividia tal tecido em seu sentido corono-apical. Outras duas linhas foram empregadas, uma paralela ao centro

da porção do alvéolo anteriormente ocupada pela raiz mesial e outra paralela ao centro da porção do alvéolo anteriormente ocupado pela raiz distal do primeiro molar inferior. A intersecção de tais linhas determinava o centro das duas áreas analisadas (Statkiewicz et al. 2018).

A ROI (III) englobava concomitantemente amostras do tecido ósseo pré-existente na parede alveolar e tecido ósseo neoformado no interior do alvéolo dental. Consistiu de um área de 250 μm x 250 μm situada na porção apical do alvéolo dental. Tal área englobava parte do tecido ósseo pré-existente na parede alveolar e parte do tecido ósseo neoformado contido no interior da porção do alvéolo dental anteriormente ocupado pelas raízes mesial e distal. O centro desta área ficava posicionado no limite entre o tecido ósseo pré-existente e tecido ósseo neoformado no interior do alvéolo dental.

2.15. Padrão de imunomarcção para TNF α , IL-1 β , PCNA, VEGF, BMP2/4, OCN e TRAP

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de TNF α , IL-1 β , PCNA, VEGF, BMP2/4, OCN e TRAP mostrou especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação. As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom-escura confinada exclusivamente ao núcleo, no caso de PCNA (Fig. 3), confinada exclusivamente ao citoplasma, no caso de TRAP (Fig. 5), e confinada ao citoplasma e em menor escala à matriz extracelular, no caso de TNF α , IL-1 β (Fig. 2), VEGF (Fig. 3), BMP2/4 e OCN (Fig. 4).

2.16. Análise imunoistoquímica de TNF α e IL-1 β na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental

Na ROI (II) foram adquiridas imagens das secções histológicas imunomarcadas com TNF- α e IL-1 β , como descrito anteriormente. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Axiovision 4.8.2 $\text{\textcircled{R}}$, Carl Zeiss) foi demarcada a área correspondente à imunomarcção por meio da ferramenta *limiar de cor*, o que possibilitou a obtenção da densidade óptica de imunomarcção (Statkiewicz et al., 2018), expressa em porcentagem sob a forma de média \pm desvio padrão.

2.17. Análise imunoistoquímica de PCNA e VEGF na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental

Na ROI (II) foram adquiridas imagens das secções histológicas imunomarcadas com PCNA e VEGF, como descrito anteriormente. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Axiovision 4.8.2®, Carl Zeiss) foram quantificadas as células PCNA-positivas e as células VEGF-positivas. A quantidade de células imunomarcadas por mm² foi expressa sob a forma de média ± desvio padrão.

2.18. Análise imunoistoquímica de BMP2/4 e OCN no tecido ósseo do sítio de extração dental

Na ROI (III) foram adquiridas imagens das secções histológicas imunomarcadas com BMP2/4 e OCN, como descrito anteriormente. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Axiovision 4.8.2®, Carl Zeiss) foram quantificadas as células BMP2/4-positivas e as células OCN-positivas. A quantidade de células imunomarcadas por mm² foi expressa sob a forma de média ± desvio padrão.

2.19. Análise imunoistoquímica de TRAP no sítio de extração dental

Na ROI (I) foram adquiridas imagens das secções histológicas imunomarcadas com TRAP, como descrito anteriormente. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Axiovision 4.8.2®, Carl Zeiss) foram quantificadas as células TRAP-positivas e as células TRAP-positivas acopladas à matriz óssea. A quantidade de células TRAP-positivas por mm² de tecido ósseo foi expressa sob a forma de média ± desvio padrão.

2.20. Análise estatística

Empregou-se o programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamiruí, Manaus, AM, Brasil). O tamanho da amostra foi calculado para assegurar um poder do teste estatístico de 95% (p<0.05). Para a análise da distribuição dos dados foi empregado o testes de Shapiro-Wilk.

Em seguida empregou-se Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$).

3. RESULTADOS

3.1. Aspectos qualitativos e quantitativos das amostras de PRP

Nos esfregaços de amostras de PRP constatou-se a integridade estrutural das plaquetas. Estabeleceu-se uma comparação da quantidade de plaquetas por mm² contidas nas amostras de sangue e nas amostras de PRP de cada animal. Foram empregadas neste estudo amostras de PRP com quantidade de plaquetas, no mínimo, 3.5 vezes superior aquela contida na amostra do sangue que o deu origem.

3.2. Imunomarcção para TNF α e IL-1 β na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental

No grupo ZOL a densidade óptica de imunomarcção para TNF α e IL-1 β no tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental se mostrou significativamente maior que nos demais grupos experimentais. Não houve diferença estatisticamente significante entre VEH e ZOL-PRP. Em VEH-PRP a imunomarcção para tais citocinas pró-inflamatórias se apresentou significativamente menor que em ZOL-PRP e não diferiu estatisticamente de VEH (Fig. 2).

3.3. Imunomarcção para PCNA e VEGF na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental

No grupo ZOL a quantidade de células PCNA-positivas e VEGF-positivas no tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental se mostrou significativamente menor que em VEH, VEH-PRP e ZOL-PRP. Não houve diferença estatisticamente significante entre VEH e ZOL-PRP. Em VEH-PRP a imunomarcção para PCNA e VEGF se apresentou significativamente maior que em ZOL-PRP e não diferiu estatisticamente de VEH (Fig. 3).

3.4. Imunomarcção para BMP2/4 e OCN no sítio de extração dental

A quantidade de células BMP2/4-positivas e de células OCN-positivas em ZOL foi menor que em VEH, VEH-PRP e ZOL-PRP. Em ZOL-PRP a quantidade de células BMP2/4-positivas e OCN-positivas foi menor que em VEH-PRP. Com relação à imunomarcação para OCN, esta foi maior em VEH-PRP e menor em ZOL-PRP quando comparado com VEH (Fig. 4).

3.5. Imunomarcação para TRAP no sítio de extração dental

A quantidade células TRAP-positivas e a quantidade de células TRAP-positivas acopladas à matriz óssea não diferiu nos grupos tratados com zoledronato, ZOL e ZOL-PPR, e se mostrou menor em relação aos grupos tratados com o veículo, VEH e VEH-PRP (Fig. 5).

4. DISCUSSÃO

Os modelos experimentais tem contribuído para a proposição/avaliação de terapias preventivas e/ou curativas para a MRONJ, constituindo em importante fonte de direcionamento para as pesquisas clínicas. No presente estudo foi adotado um modelo experimental estabelecido por nosso grupo de pesquisa que foi delineado tendo como base estudos epidemiológicos (Mcgowan et al., 2017; Otto et al. 2012). O modelo experimental utilizado reuniu os principais fatores de risco para a MRONJ. Com relação ao fator de risco relacionado ao indivíduo: empregou-se ratas fêmeas senis (20 meses), tendo em vista que a doença acomete com maior frequência mulheres com idade avançada (Mcgowan et al., 2017; Otto et al. 2012). Com relação ao fator de risco relacionado à droga: empregou-se o zoledronato na dose oncológica, o BPs mais potente e relacionado com a maioria dos casos de MRONJ (Mcgowan et al., 2017; Otto et al. 2012). Com relação aos fatores de risco locais: induziu-se a periodontite experimental no primeiro molar inferior e posteriormente extraiu-se o dente, tendo em vista que a extração de dentes com comprometimento periodontal e/ou periapical é apontada como um importante fator precipitante (Otto et al., 2015; Thumbigere-Math et al., 2014).

Del Frabro et al. (2017), em revisão sistemática e metanálise de estudos clínicos, reportaram que a aplicação de PRP autólogo no sítio de extração dental melhora a reparação tanto dos tecidos moles quanto dos tecidos duros, o que corrobora os achados do presente estudo. Os queratinócitos, fibroblastos e osteoblastos são as principais células que, de uma maneira orquestrada, participam do processo de reparo alveolar e estão dentre os principais alvos da ação bioestimulatória do PRP (Albanese et al., 2013; Alsousou et al. 2013; Griffin et al., 2009; Plachokova et al., 2008), quanto de tecidos moles, como tecido epitelial e conjuntivo (Chicharro-Alcántara et al., 2018; Anitua et al., 2012; Nikolidakis & Jansen, 2008; Petrungaro, 2001). Em contrapartida, estudos mostraram que o tratamento com zoledronato exerce efeitos negativos sobre queratinócitos (Pabst et al., 2012; Saracino et al., 2012), fibroblastos (Jung et al., 2018; Scheper et al., 2009) e osteoblastos (Huang et al., 2016; Basso et al., 2013). A ação do zoledronato sobre tais células exerce grande importância tanto no comprometimento da reparação tecidual do sítio de extração dental quanto no desencadeamento da MRONJ (Aghaloo et al., 2015; Badel et al., 2013; Migliorati et al., 2011; Allen et al., 2009), o que está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo. Este estudo mostrou que no grupo ZOL-PRP a aplicação de PRP autólogo no sítio de extração

dental foi capaz de evitar a ocorrência de consequências negativas do zoledronato sobre tais células e tecidos.

Outro ponto de grande importância durante terapia com zoledronato é sua ação sobre a vasculatura e os principais moduladores locais da angiogênese, o que pode comprometer tanto o processo de reparação dos tecidos moles e tecidos duros do sítio de extração, quanto pode desencadear necrose avascular do tecido ósseo alveolar. Estudos mostraram que o zoledronato afeta negativamente a viabilidade (Walter et al., 2011; Zafar et al., 2014), proliferação (Michailidou et al., 2010), migração (Walter et al., 2011; Michailidou et al., 2010), diferenciação (Ziebart et al., 2013) e formação de tubo (Michailidou et al., 2010) de células endoteliais, além disso, aumenta o índice de apoptose em tais células (Walter et al., 2011; Zafar et al., 2014). O zoledronato também reduz a capacidade de migração e de diferenciação de células progenitoras endoteliais (Walter et al., 2011; Ziebart et al., 2013). Santini et al. (2013) demonstraram redução na quantidade de precursores de células endoteliais e células endoteliais no sangue periférico de pacientes sob tratamento com dose oncológica de zoledronato. Outros estudos mostraram que em amostras da mucosa bucal de pacientes com MRONJ ocorreu severa diminuição na angiogênese (Wehrhan et al., 2011) e redução na expressão dos seus principais moduladores locais, dentre eles VEGF (Mozzati et al., 2012), em concordância com o que foi observado no presente estudo. No grupo ZOL-PRP um dos indícios de que a reparação tecidual também foi estimulada por uma atuação favorável do PRP sobre os elementos vasculares foi o aumento na imunomarcagem de VEGF.

Os BPs nitrogenados, como o zoledronato, tem como principal célula alvo de atuação, os osteoclastos (Rogers et al., 2011; Cremers & Papapoulos, 2011). Este medicamento atua bloqueando a ação da enzima farnesil difosfato sintase, que pertence a via do mevalonato (Rogers et al., 2011; Cremers & Papapoulos, 2011). O bloqueio desta via inibe a osteoclastogênese, impede a ativação de osteoclastos maduros e induz apoptose prematura em osteoclastos ativos (Rogers et al., 2011; Cremers & Papapoulos, 2011). Em ZOL e ZOL-PRP foi observada menor quantidade tanto de osteoclastos totais quanto de osteoclastos acoplados à matriz óssea no sítio de extração dental e adjacências, o que confirma a efetividade do tratamento com zoledronato. Embora alguns estudos in vitro demonstrem que o PRP promova a redução na osteoclastogênese (Cenni et al., 2010; Wang et al., 2018), no presente estudo, não se observou alteração na quantidade de osteoclastos ocasionada pelo uso do PRP, supostamente pela diferenças inerentes entre estudos in vitro e in vivo.

Uma outra ação do PRP que provavelmente contribuiu para os resultados observados no presente estudo foi sua ação anti-inflamatória (El-Sharkay et al., 2007) ZOL apresentou maior magnitude da resposta inflamatória local e níveis mais elevados das principais citocinas com atividade pró-inflamatória, TNF α e IL-1 β , no sítio de extração dental. Tais dados estão de acordo Morita et al. (2017), que sugerem uma estreita relação entre os elevados níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1 e IL-6 com a etiopatogenia da MRONJ uma vez que camundongos deficientes para tais citocinas foram resistente ao desenvolvimento de osteonecrose. Em contraposição, foi constatado em ZOL-PRP que a aplicação de PRP promoveu modulação da resposta inflamatória local. Tal ação supostamente tenha sido uma das responsáveis por favorecer o processo de reparação tecidual e evitar a ocorrência da MRONJ pós extração dental.

Entretanto, Barba-Recreo et al. (2015) reportaram que ratos tratados com zoledronato e submetidos à exodontia não exibiram melhora no processo de reparo alveolar após aplicação local de PRP alógeno associado ao recobrimento do sítio de extração dental com retalho mucoperiosteal. O uso do PRP alógeno pode ter colaborado para que não se alcançasse os benefícios deste tipo de terapia. Tais dados e os achados do presente estudo destacam a importância relacionada com a origem do PRP. Além disso, as discrepâncias entre os achados científicos relacionados ao uso do PRP podem estar relacionadas aos diferentes os protocolos de preparação (Jovani-Sancho et al., 2015).

O presente estudo avaliou a utilização local do PRP autólogo como uma terapia preventiva para a MRONJ e, como mencionado anteriormente, são escassos os estudos que tiveram essa finalidade. No entanto, a associação de debridamento cirúrgico da lesão e o uso do PRP autólogo como terapia curativa para a MRONJ foi avaliado em alguns estudos experimentais em animais e em estudos clínicos. Sarkarat et al. (2014), utilizando um modelo experimental em ratos, após exodontia e confirmação clínica do desencadeamento da MRONJ, realizaram a curetagem e o tratamento local com PRP autólogo. Nesse estudo os autores não constataram diferença em relação ao grupo controle no que se refere a regeneração epitelial, neoangiogênese e formação de sequestro ósseo, todavia, a quantidade de tecido ósseo vital no sítio cirúrgico se mostrou maior nos ratos tratados com PRP autólogo. Longo et al. (2014) e Coviello et al. (2012), em estudos clínicos, avaliaram comparativamente a eficácia da terapia cirúrgica isolada e da terapia cirúrgica associada ao uso local de PRP autólogo. Ambos estudos constataram que esta última modalidade terapêutica se mostrou bem

mais efetiva no tratamento da MRONJ, o que corrobora com nossos achados, e sugere que o uso local de PRP autólogo pode ser tanto uma opção terapêutica preventiva quanto curativa.

A ocorrência da MRONJ compromete a qualidade de vida dos pacientes. O tratamento desta condição pode ser extenso, pouco efetivo, atrapalhar o tratamento da doença de base e resultar em graves sequelas (El-Rabbany et al., 2017; Hayashida et al., 2017; Rollason et al., 2016). Por outro lado, o emprego de estratégias terapêuticas preventivas é o ideal em se tratando da MRONJ. Os achados do presente estudo podem se constituir em importante norteador para futuras pesquisas clínicas. Levando-se em consideração os efeitos biomodulatórios, ação antimicrobiana local e a ausência de efeito adverso o emprego local de PRP autólogo pode se constituir em uma terapia preventiva promissora para a MRONJ. Além disso, apesar de utilizar um modelo experimental em animais, os achados do presente estudo podem constituir-se em importante norteador para futuras pesquisas clínicas. Sendo assim, estudos clínicos em humanos visando o estabelecimento de protocolos preventivos, para ser empregado em pacientes que fazem uso de drogas com ação antirreabsortiva e que necessitam de intervenções odontológicas invasivas são necessários.

5. CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, concluiu-se que a aplicação local de PRP autólogo demonstrou ser uma terapia preventiva efetiva para restabelecer a capacidade de reparação tecidual do sítio de extração dental, a qual foi severamente comprometida pelo tratamento com zoledronato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHALOO, T., HAZBOUN, R. & TETRADIS, S. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaws. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am.** 27, 489-496 (2015).
- ALBANESE, A., LICATA, M. E., POLIZZI, B. & CAMPISI, G. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. **Immun Ageing.** 10, e.23 (2013).
- ALLEN, M. R. & BURR, D. B. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. **J Oral Maxillofac Surg.** 67, 61-70 (2009).
- ALSOUSOU, J., ALI, A., WILLETT, K. & HARRISON, P. The role of platelet-rich plasma in tissue regeneration. **Platelets.** 24, 173-182 (2013).
- ANITUA, E., TROYA, M. & ORIVE, G. Plasma rich in growth factors promote gingival tissue regeneration by stimulating fibroblast proliferation and migration and by blocking transforming growth factor- β 1-induced myodifferentiation. **J Periodontol.** 83, 1028-1037 (2012).
- BADEL, T., PAVICIN, I. S., CAREK, A. J., ROSIN-GRGET, K. & GRBESA, D. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate. **Coll Antropol.** 37, 645-651 (2013).
- BARBA-RECREO, P. ET AL. Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model. **J Craniomaxillofac Surg.** 43, 1161-1168 (2015).
- BASSO, F. G., SILVEIRA-TURRIONI, A. P., HEBLING, J. & DE-SOUZA-COSTA, C. A. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. **Gerontology.** 59, 534-541 (2013).
- BERMÚDEZ-BEJARANO, E. B. ET AL. Prophylaxis and antibiotic therapy in management protocols of patients treated with oral and intravenous bisphosphonates. **J Clin Exp Dent.** 9, 141-149 (2017).
- CENNI, E., AVNET, S., FOTIA, C., SALERNO, M. & BALDINI, N. Platelet-rich plasma impairs osteoclast generation from human precursors of peripheral blood. **J Orthop Res.** 28, 792-797 (2010).
- CHICHARRO-ALCÁNTARA, D. ET AL. Platelet rich plasma: new insights for cutaneous wound healing management. **J Funct Biomater.** 9, 10 (2018).
- COHN, C. S. & LOCKHART, E. Autologous platelet-rich plasma: evidence for clinical use. **Curr Opin Hematol.** 22, 527-532 (2015).
- COVIELLO, V. ET AL. Platelet-rich plasma improves wound healing in multiple myeloma bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw patients. **J Biol Regul Homeost Agents.** 26, 151-155 (2012).
- CREMERS, S. & PAPAPOULOS, S. Pharmacology of bisphosphonates. **Bone.** 49, 42-49 (2011).
- DEL FABBRO, M. ET AL. Healing of postextraction sockets preserved with autologous platelet concentrates. A systematic review and meta-analysis. **J Oral Maxillofac Surg.** 75, 1601-1615 (2017).
- DEL FABBRO, M., GALLESIO, G. & MOZZATI, M. Autologous platelet concentrates for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw treatment and prevention. A systematic review of the literature. **Eur J Cancer.** 51, 62-74 (2015).
- DRAKE, M. T., CLARKE, B. L. & KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin Proc.** 83, 1032-1045 (2008).
- EL-RABBANY, M., SGRO, A., LAM, D. K., SHAH, P. S. & AZARPAZHOOH, A. Effectiveness of treatments for medication-related osteonecrosis of the jaw: a systematic review and meta-analysis. **J Am Dent Assoc.** 148, 584-594 (2017).

- EL-SHARKAWY, H. ET AL. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. **J Periodontol.** 78, 661-669 (2007).
- Ervolino, E. **Estratégias terapêuticas preventivas para o osteonecrose dos maxilares associada ao uso de medicamento.** 2018. 158f. Tese (livre docência) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2018.
- FABBRO, M. D., BORTOLIN, M., TASCHIERI, S., CECI, C. & WEINSTEIN, R. L. Antimicrobial properties of platelet-rich preparations. a systematic review of the current pre-clinical evidence. **Platelets.** 27, 276-285 (2016).
- GRIFFIN, X. L., SMITH, C. M. & COSTA, M. L. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review. **Injury.** 40, 158-162 (2009).
- HAYASHIDA, S. ET AL. Evaluation of the treatment strategies for medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) and the factors affecting treatment outcome: a multicenter retrospective study with propensity score matching analysis. **J Bone Miner Res.** 32, 2022-2029 (2017).
- HUANG, X. ET AL. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. **Mol Med Rep.** 13, 613-622 (2016).
- JI, X. ET AL. Antibiotic effects on bacterial profile in osteonecrosis of the jaw. **Oral Dis.** 18, 85-95 (2012).
- JOVANI-SANCHO, M. D., SHETH, C. C., MARQUÉS-MATEO, M. & PUCHE-TORRES, M. Platelet-rich plasma: a study of the variables that may influence its effect on bone regeneration. **Clin Implant Dent Relat Res.** 18, 1051-1064 (2015).
- JUNG, J. ET AL. Effects of an oral bisphosphonate and three intravenous bisphosphonates on several cell types in vitro. **Clin Oral Investig.** 2018 [Epub ahead of print].
- KHOSLA, S. ET AL. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. **J Bone Miner Res.** 22, 1479-1491 (2007).
- LONGO, F. ET AL. Platelet rich plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: personal experience and review of the literature. **Int J Dent.** 2014, e.298945 (2012).
- MACEDO, F. ET AL. Bone metastases: an overview. **Oncol Rev.** 11, e.321 (2017).
- MARX, R. E. ET AL. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 85, 638-646 (1998).
- MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg.** 61, 1115-1117 (2003).
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J Oral Maxillofac Surg.** 62, 489-496. 2004.
- MCGOWAN, K., MCGOWAN, T. & IVANOVSKI, S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. **Oral Dis.** (2017) [Epub ahead of print].
- MICHAILIDOU, M. ET AL. Microvascular endothelial cell responses in vitro and in vivo: modulation by zoledronic acid and paclitaxel? **J Vasc Res.** 47, 481-493 (2010).
- MIGLIORATI, C. A., EPSTEIN, J. B., ABT, E. & BERENSON, J. R. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates in cancer: a narrative review. **Nat Rev Endocrinol.** 7, 34-42 (2011).
- MORITA, M. ET AL. Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following anti-resorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. **Sci Rep.** 7, 46322 (2017).

- MOZZATI, M., GALLESIO, G., ARATA, V., POL, R. & SCOLETTA, M. Platelet-rich therapies in the treatment of intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a report of 32 cases. **Oral Oncol.** **48**, 469-474 (2012).
- NIKOLIDAKIS, D. & JANSEN, J. A. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. **Tissue Eng Part B Rev.** **14**, 249-258 (2008).
- OTTO, S. ET AL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. **J Craniomaxillofac Surg.** **40**, 303-309 (2012).
- OTTO, S. ET AL. Tooth extraction in patients receiving oral or intravenous bisphosphonate administration: a trigger for BRONJ development? **J Craniomaxillofac Surg.** **43**, 847-854 (2015).
- PABST, A. M. ET AL. The influence of bisphosphonates on viability, migration, and apoptosis of human oral keratinocytes--in vitro study. **Clin Oral Investig.** **16**, 87-93 (2012).
- PETRUNGARO, O. S. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. **Compend Contin Educ Dent.** **22**, 729-732 (2001).
- PLACHOKOVA, A. S., NIKOLIDAKIS, D., MULDER, J., JANSEN, J. A. & CREUGERS, N. H. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* **19**, 539-545 (2008).
- ROGERS, M. J., CROCKETT, J. C., COXON, F. P. & MÖNKKÖNEN, J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone.** **49**, 34-41 (2011).
- ROLLASON, V. ET AL. Interventions for treating bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). **Cochrane Database Syst Rev.** **2**, e.CD008455 (2016).
- RUGGIERO, S. L. & DODSON, T. B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaws - 2014 update. **J Oral Maxillofac Surg.** **72**, 2381-2382 (2014).
- SANTINI, D. ET AL. Zoledronic acid induces a significant decrease of circulating endothelial cells and circulating endothelial precursor cells in the early prostate cancer neoadjuvant setting. **Oncology.** **85**, 342-347 (2013).
- SARACINO, S. ET AL. Exposing human epithelial cells to zoledronic acid can mediate osteonecrosis of jaw: an in vitro model. **J Oral Pathol Med.** **41**, 788-792 (2012).
- SARKARAT, F. ET AL. Platelet-rich plasma in treatment of zoledronic acid-induced bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Trauma Mon.** **19**, e.17196 (2014).
- SCHEPER, M. A., BADROS, A., CHAISUPARAT, R., CULLEN, K. J. & MEILLER, T. F. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. **Br J Haematol.** **144**, 667-676 (2009).
- SOARES, A. P. ET AL. Bisphosphonates: pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth development. **Environ Toxicol Pharmacol.** **42**, 212-217 (2016).
- SONNLEITNER, D., HUEMER, P. & SULLIVAN, D. Y. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. **Int J Oral Maxillofac Implants.** **15**, 879-882 (2000).
- STATKIEVICZ, C. ET AL. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *J PHOTOCHEM PHOTOBIOLOG B.* **184**, 7-17 (2018).
- THUMBIGERE-MATH, V. ET AL. Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **J Periodontol.** **85**, 226-233 (2014).

WALTER, C., PABST, A., ZIEBART, T., KLEIN, M. & AL-NAWAS, B. Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. **Oral Dis.** 17, 194-199 (2011).

WANG, D. ET AL. Platelet-rich plasma inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation through activation of Wnt pathway during bone remodeling. **Int J Mol Med.** 41, 729-738 (2018).

WEHRHAN, F. ET AL. Differential impairment of vascularization and angiogenesis in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw-related mucoperiosteal tissue. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 112, 216-221 (2011).

ZAFAR, S. ET AL. Zoledronic acid and geranylgeraniol regulate cellular behaviour and angiogenic gene expression in human gingival fibroblasts. **J Oral Pathol Med.** 43, 711-721 (2014).

ZIEBART, T. ET AL. Investigation of inhibitory effects on EPC-mediated neovascularization by different bisphosphonates for cancer therapy. **Biomed Rep.** 1, 719-722 (2013).

FIGURA 1

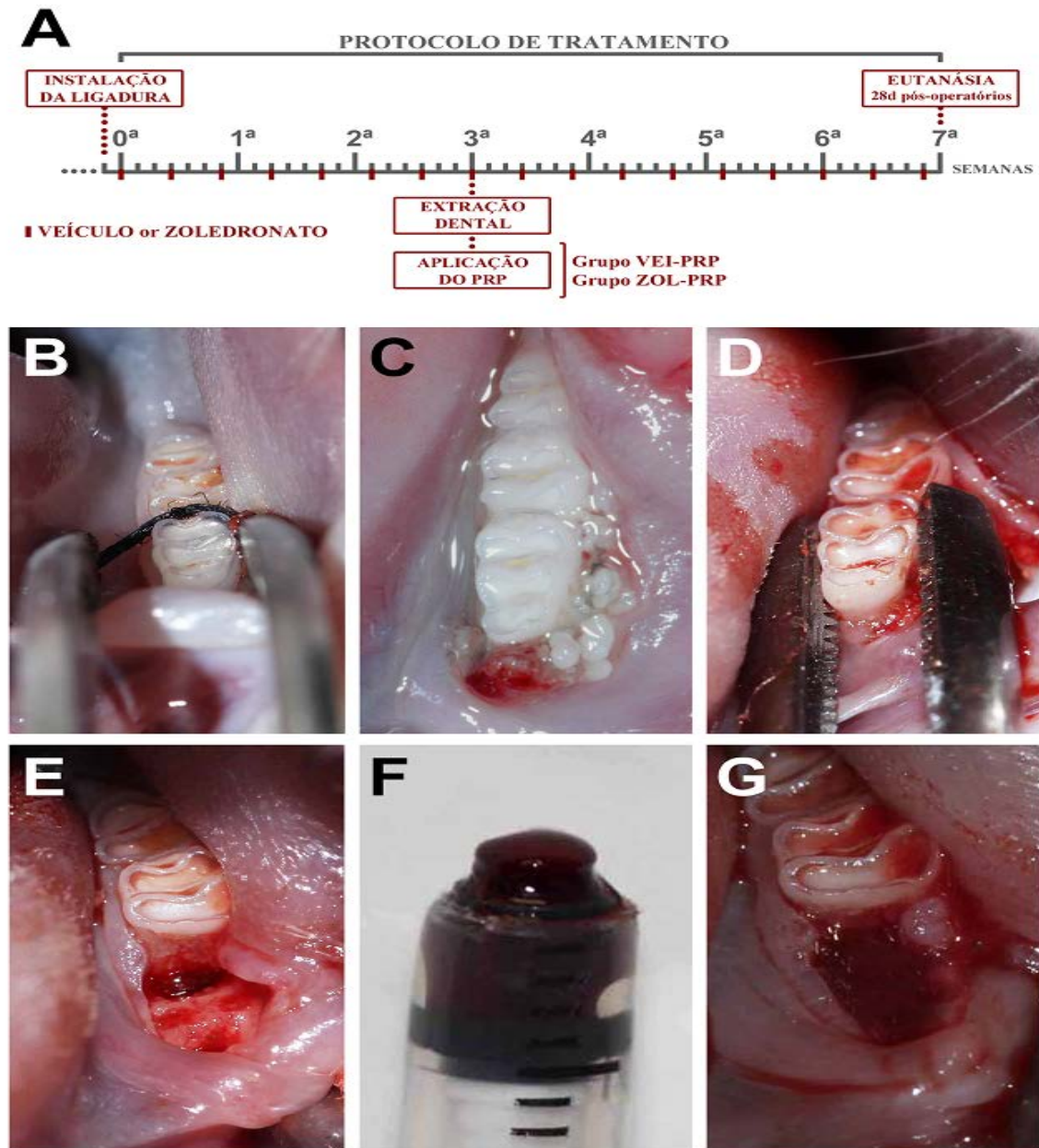


Figura 1 - Design experimental. (A): Esquema ilustrando os procedimentos experimentais realizados durante o estudo. (B): Instalação da ligadura ao redor do primeiro molar inferior esquerdo para indução da periodontite experimental. (C): Periodontite experimental após três semanas da instalação da ligadura. (D): Procedimento cirúrgico da extração dentária. (E): Aspecto clínico do alvéolo dental antes da aplicação do PRP. (F): Aspecto do PRP ativado. (G): Aspecto clínico do alvéolo dental depois da aplicação do PRP.

FIGURA 2

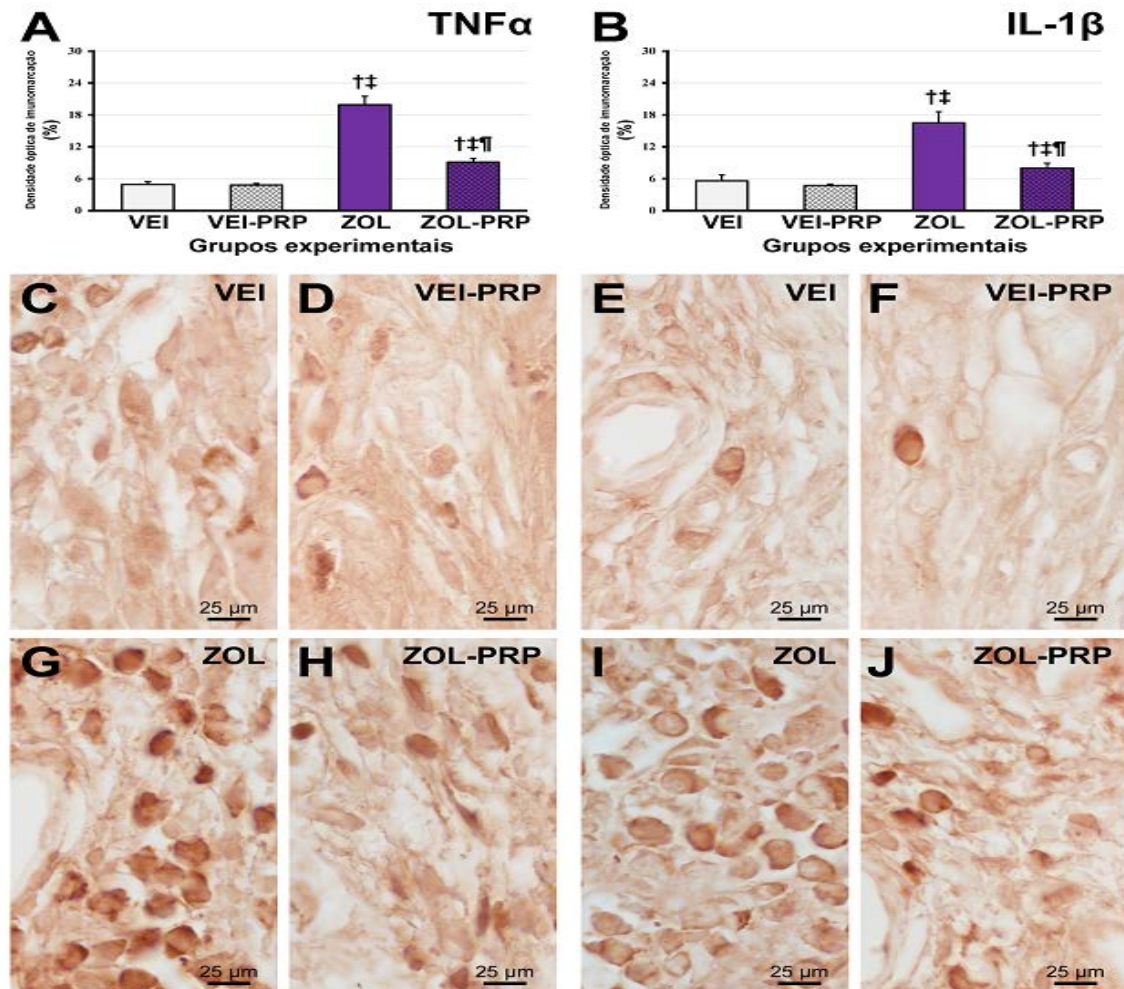


Figura 2 - Padrão de imunomarcacão para TNF α e IL-1 β no alvéolo dental. A – B: Gráfico apresentando a imunomarcacão para TNF α (A) e IL-1 β (B) no tecido do alvéolo dental nos diferentes grupos experimentais 28 dias após extração dentária. C – J: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para TNF α (C, E, G, I) e IL-1 β (D, F, H, J) no grupo VEI (C, D), VEI-PRP (E, F), ZOL (G,H), e ZOL-PRP (I,J). Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação a VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação a VEI-PRP; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL. Amplificacão do original: 1000x. Barra de escala: 25 μ m.

FIGURA 3

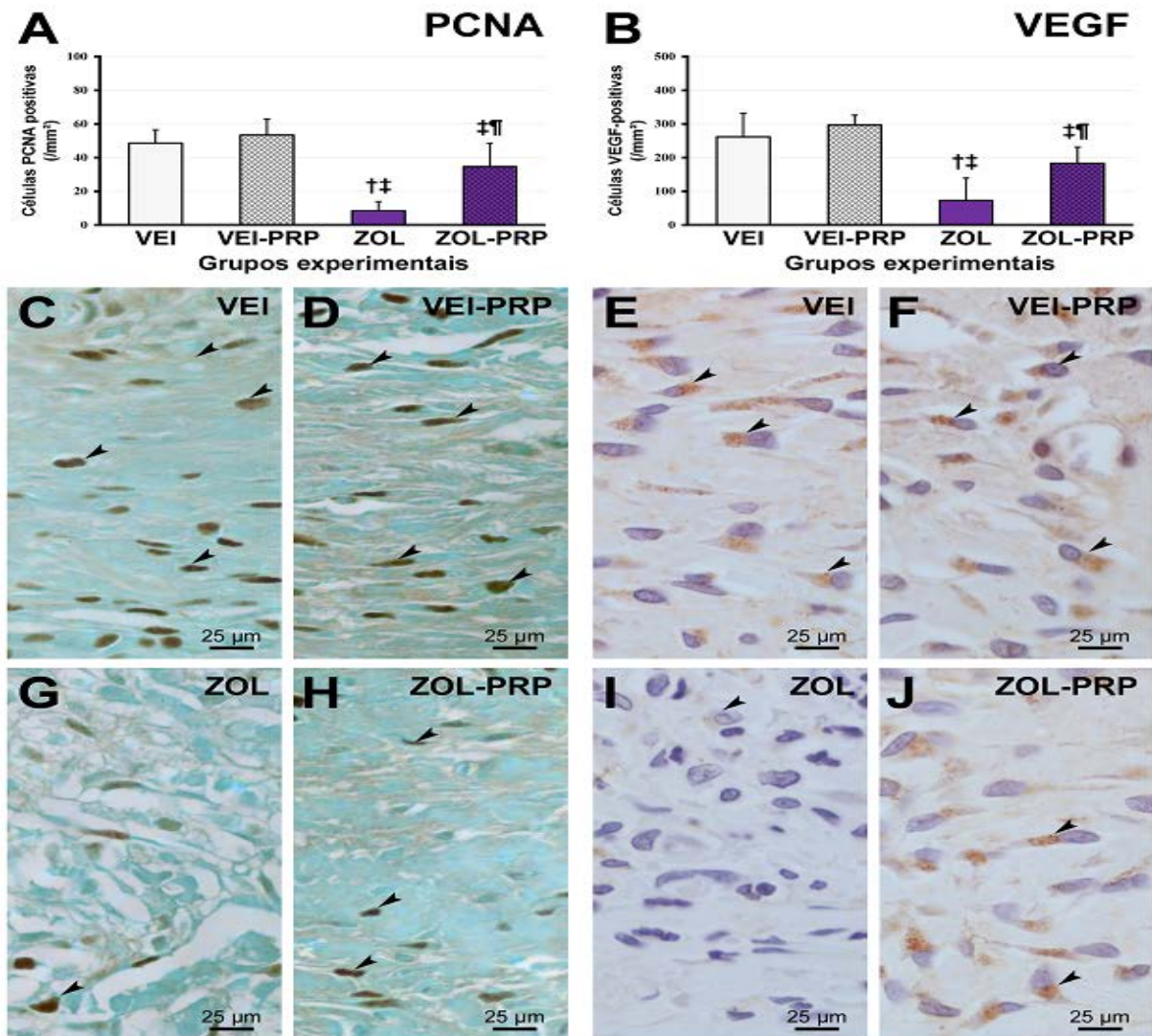


Figura 3 - Padrão de imunomarcção para PCNA e VEGF no alvéolo dental. A – B: Gráfico apresentando a imunomarcção para PCNA (A) e VEGF (B) no tecido do alvéolo dental nos diferentes grupos experimentais 28 dias após extração dentária. C – J: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para PCNA (C, D, G, H) e VEGF (E, F, I, J) no grupo VEH (C, E), VEH-PRP (D, F), ZOL (G,I), e ZOL-PRP (H,J). Símbolos: setas pretas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação a VEH; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação a VEH-PRP; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL. Amplificação do original: 1000x. Barra de escala: 25 μm.

FIGURA 4

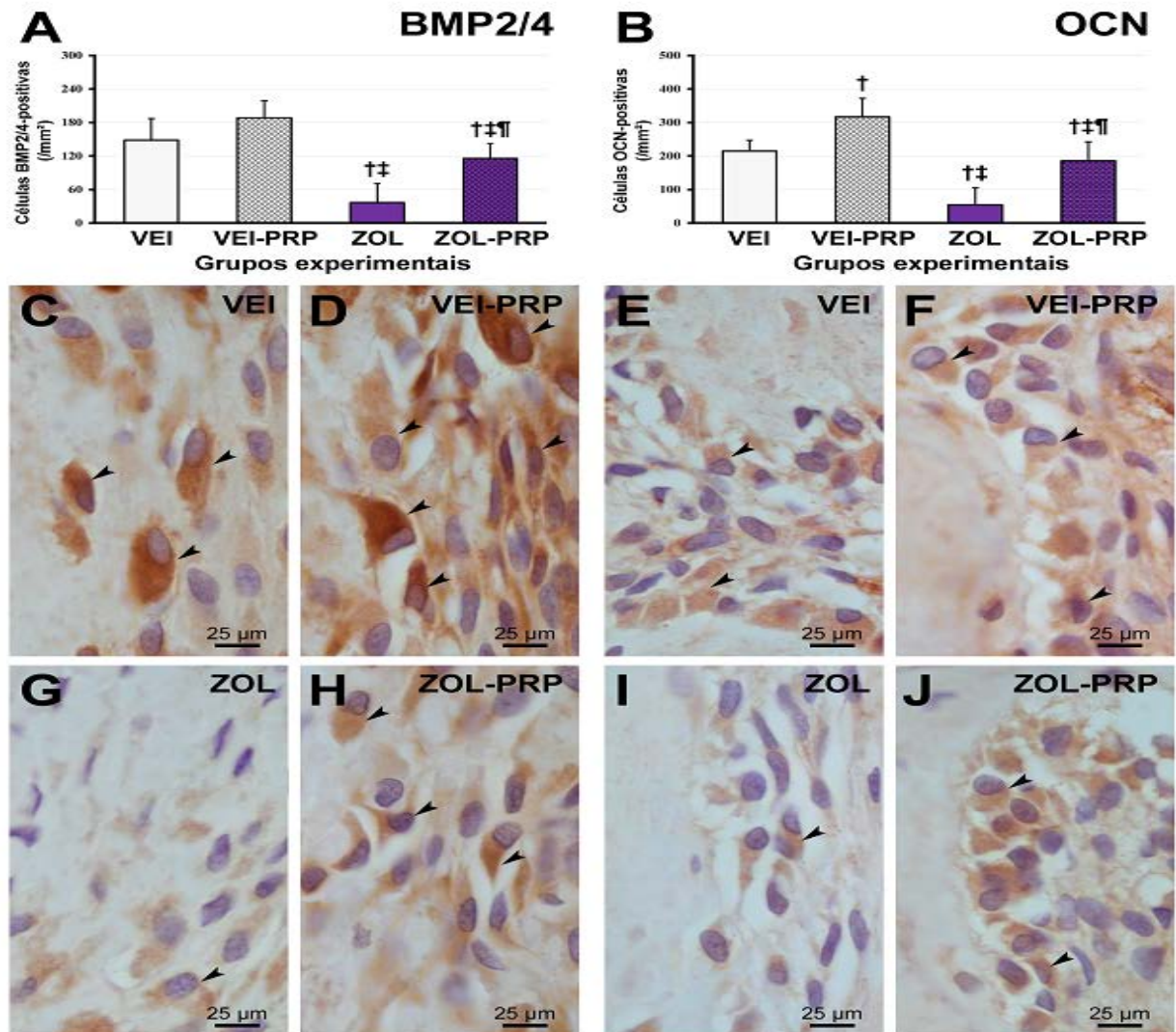


Figura 4 - Padrão de imunomarcção para BMP2/4 e OCN no alvéolo dental. A – B: Gráfico apresentando a imunomarcção para BMP2/4 (A) e OCN (B) no tecido do alvéolo dental nos diferentes grupos experimentais 28 dias após extração dentária. C – J: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para BMP2/4 (C, E, G, I) e OCN (D, F, H, J) no grupo VEI (C, D), VEI-PRP (E, F), ZOL (G,H), e ZOL-PRP (I,J). Símbolos: setas pretas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação a VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação a VEI-PRP; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL. Amplificação do original: 1000x. Barra de escala: 25 µm.

FIGURA 5

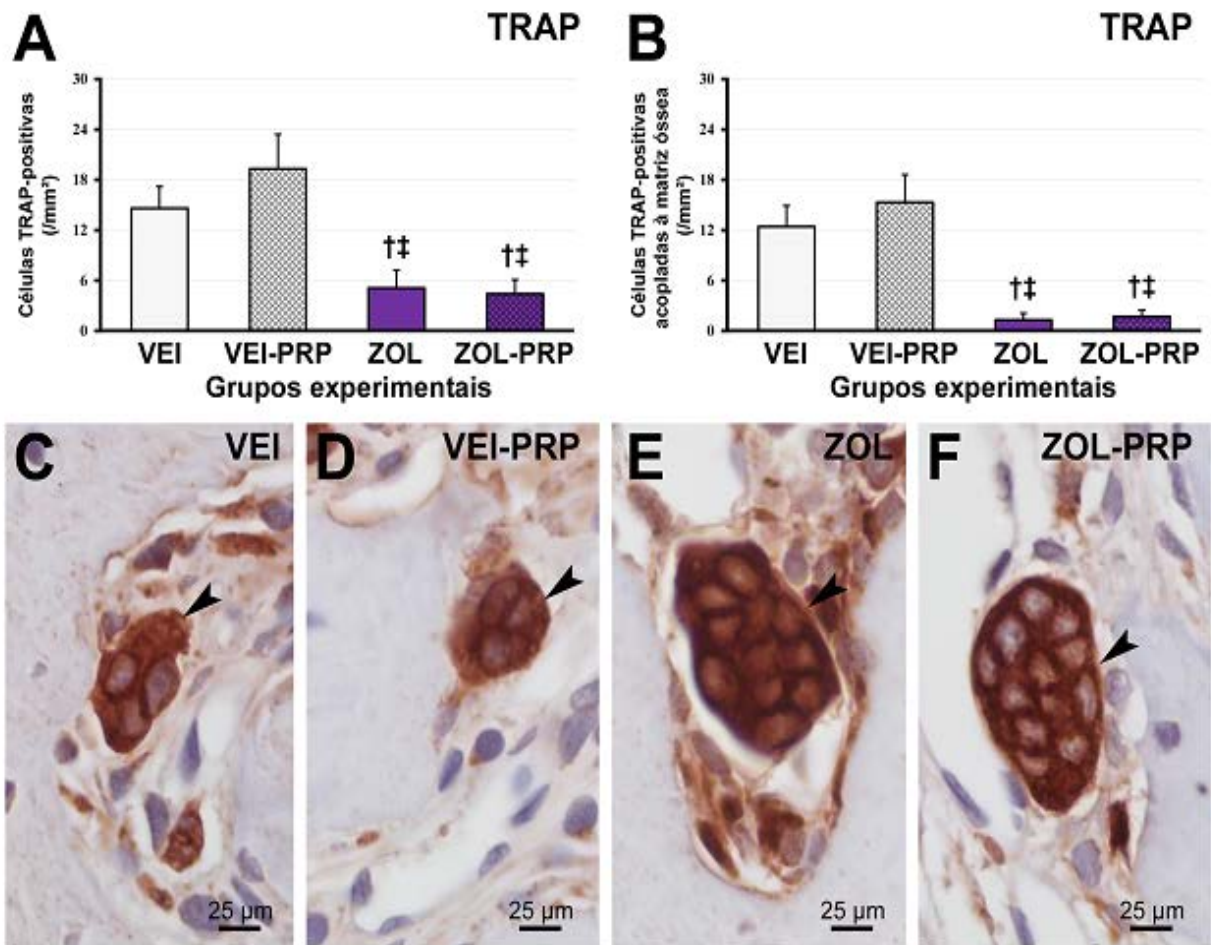


Figura 5 - Padrão de imunomarcção para TRAP no alvéolo dental. A – B: Gráfico apresentando a imunomarcção para células TRAP positivas (A) e células TRAP positivas acopladas a matriz óssea (B) no tecido do alvéolo dental nos diferentes grupos experimentais 28 dias após extração dentária. C – F: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP no grupo VEH (C), VEH-PRP (D), ZOL (E), e ZOL-PRP (F). Símbolos: setas pretas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação a VEH; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação a VEH-PRP; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação a ZOL. Amplificação do original: 1000x. Barra de escala: 25 μm.

ANEXOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Efeito do zoledronato sobre o processo de reparo alveolar em ratos: estudo envolvendo os principais fatores de risco para o desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares e avaliação de diferentes terapias preventivas" sob responsabilidade do Pesquisador EDILSON ERVOLINO e colaboração de Valdir Gouveia Garcia, Cláudio Aparecido Casatti, Letícia Helena Theodoro, Juliano Milanezi de Almeida, Maria José Hitomi Nagata, João Paulo Mardegan Issa, Rita Cássia Menegatti Dorneles, Luan Felipe Toro, Thamires Priscila Cavazana, João Martins de Mello Neto e João Vicente Feres-Rodrigues está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-00581-2013.

CERTIFICATE

We certify that the research "Effect of zoledronate during the alveolar healing process in rats: study involving the major risk factors for developing osteonecrosis of the jaws and evaluation of different preventive therapies", process number FOA-00581-2013, under responsibility of EDILSON ERVOLINO and with collaboration of Valdir Gouveia Garcia, Cláudio Aparecido Casatti, Letícia Helena Theodoro, Juliano Milanezi de Almeida, Maria José Hitomi Nagata, João Paulo Mardegan Issa, Rita Cássia Menegatti Dorneles, Luan Felipe Toro, Thamires Priscila Cavazana, João Martins de Mello Neto and João Vicente Feres-Rodrigues agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

Profa. Dra. Mary Marcondes
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br