



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba

**HALEF DIEGO TURINI**

**Avaliação da suplementação com ômega-3 como terapia  
preventiva a ocorrência de osteonecrose dos maxilares associada  
ao uso de zoledronato**

**Araçatuba – SP  
2023**

**HALEF DIEGO TURINI**

**Avaliação da suplementação com ômega-3 como terapia  
preventiva a ocorrência de osteonecrose dos maxilares associada  
ao uso de zoledronato**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. Edilson Ervolino

**Araçatuba – SP  
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

T938a Turini, Halef Diego.  
Avaliação da suplementação com ômega-3 como  
terapia preventiva a ocorrência de osteonecrose dos  
maxilares

associada ao uso de zoledronato / Halef Diego

Turini. – Araçatuba, 2023

60 f.: il.; tab., graf.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual  
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Juliano Milanezi de Almeida

Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Periodontite 2. Osteonecrose 3. Difosfonatos I.T.

Black D6

CDD 617.64

*A Deus, por ser tão bom e misericordioso para comigo. Muito obrigado Senhor, por estar sempre ao meu lado, me dando forças e coragem para os dias de luta. Somente Tu sabes das minhas dores existenciais e renúncias diárias. Sem Ti nada disso seria possível, por isso te louvo, agradeço e dou graças. Tu és o meu melhor amigo e confidente, o meu Bom Pastor. Muito obrigado por me acalantar nos momentos de tristeza. Devo a minha vida a Ti e vivo os Teus propósitos. Gratidão!*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, *Marina e Urubatã*, por sempre acreditarem em mim e viverem os meus sonhos. Sei que muitas vezes vocês deixaram os seus planos de lado, em prol dos meus. Vocês são os meus maiores exemplos de trabalho, amor, carinho, honestidade, sinceridade, companheirismo, meu Porto Seguro e melhores amigos. Não existem palavras que possam expressar a minha gratidão nesse momento. Essa conquista também é de vocês. Se algum dia eu a for metade do que vocês são, estarei feliz. Meus sinceros agradecimentos e amo vocês infinitamente. Muito, muito obrigado, de coração. Vocês são os melhores pais do mundo!

A minha querida irmã, *Beatriz*, na qual tenho uma conexão muito forte e indestrutível. Você foi um presente que a vida me deu. Muito obrigado pela amizade sincera, companheirismo e todo o amor. Minha amiga de todas as horas e confidente. Não existem palavras capazes de descrever o que sinto por você. Tenho muito orgulho e torço muito por você. Seja feliz! Amo você!

A minha avó, *Geni*, por todo o carinho e preocupação para comigo. Você é um exemplo de amor sincero. Minha segunda mãe, amiga e confidente. Obrigado pelos conselhos e por sempre me socorrer com prontidão, através de uma palavra de conforto. Nossa conexão é eterna. Amo você imensamente!

Ao meu avô, *Antônio (in memoriam)*, por todo amor e carinho. O senhor foi um exemplo de homem trabalhador, honesto, amoroso e brincalhão. Infelizmente não nos despedimos, mas tenho certeza de que estaremos juntos em breve. Cuide de mim aí de cima. Amo você!

Aos meus avós, *Hélio e Doraci*, por todo amor, carinho e hospitalidade. Vocês são incríveis e possuem uma energia contagiante. Amo vocês!

Aos meus tios, *Ana Keila e Evertom*, a minha segunda família. Vocês são pessoas especiais e iluminadas, que moram no meu coração. Exemplos de amor, carinho, alegria, companheirismo, trabalho e honestidade. Nossa conexão é intensa, de outras vidas, e sou grato por isso. Muito obrigado por sempre me receberem de braços abertos. Quando estou com vocês, me sinto em casa. Amo vocês!

A minha irmã de coração e alma, *Déborah*, você é especial e sabe disso. Nossa conexão é inexplicável. Muito obrigado por diversas vezes deixar as suas dores de lado para acolher as minhas. Minha melhor amiga e confidente. Você é um dos melhores presentes que a vida me deu. Não existem palavras capazes de descrever o que sinto por você. Exemplo de trabalho, honestidade, comprometimento, amor, empatia e alegria. O seu coração é gigante e você é o meu orgulho. Amo você infinitamente!

A minha prima e irmã de coração, *Victória*, por todo amor e carinho. Você é uma pessoa incrível e guerreira, que admiro imensamente. Obrigado por estar sempre ao meu lado, me ouvindo e aconselhando. Amo você!

Aos meus primos, *Maria Clara, Ângelo e Maria Eduarda*, por toda a torcida e energias positivas durante o meu trajeto. Amo vocês!

Aos meus tios, *Welitom, Sônia, Wiliam, Viviane, Ana Cláudia e Luiz*, pela torcida, amor e carinho. Vocês são especiais. Gratidão, amo vocês!

As minhas primas, *Nayra, Isabela, e Pamela*, pelas boas energias e vibrações. Vocês são pessoas singulares, na qual tenho um imenso carinho. Obrigado pela amizade sincera, amor e companheirismo. Amo vocês!

A minha amiga, *Karina*, pela amizade sincera, amor e companheirismo diário, mesmo que distante. Você foi um presente que a graduação me deu e sou muito feliz por tê-la em minha vida. Obrigado pelos conselhos, por sempre me ouvir, pelas risadas e por sua alegria contagiante. Muito obrigado! Amo você!

Aos meus amigos, *Natan, Karine, Nicolly e Debora*, companheiros de Residência e presentes que a vida me deu. Sou muito grato e feliz por tê-los comigo. Obrigado por toda a energia positiva, amizade sincera e companheirismo. Vocês são incríveis! Amo vocês!

Aos meus professores, *Maria Beatriz Bergonse Pereira Pedriali, Fernanda Akemi Nakanishi Ito, Luciana Prado Maia Andraus, Alberto João Zortéa, Evelise Ono, Jefferson Tanaka, Cecília Luiz Pereira Stábile, Eloisa Helena Aranda Garcia de Souza e Elisa Emi Tanaka Carloto*. Vocês são excepcionais,

minhas inspirações diárias. Exemplos de docentes comprometidos com o ensino. Obrigado por todo o conhecimento transmitido. Admiro vocês!

A minha querida professora e amiga, *Priscila Paganini Costa Tioffi*, pelo aceite em compor a banca avaliadora do meu Mestrado, e não somente por isso... Professora você é um exemplo de docente, possui uma didática incrível e um coração enorme. Muito obrigado por me acompanhar desde o terceiro ano da graduação, bem como, durante a minha Residência em Periodontia. Agradeço por todos os seus ensinamentos e conselhos, você é uma de minhas inspirações diárias. Gratidão! Admiro você imensamente!

A minha eterna casa, *Universidade Estadual de Londrina – UEL e a Clínica Odontológica Universitária - COU*, por me receberem de braços abertos, onde pude adquirir todo o meu conhecimento profissional e evoluir como ser humano. Gratidão por todas as oportunidades. Vocês moram no meu coração!

A minha segunda casa, *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA*, pelo acolhimento, oportunidades e subsídios para a realização da minha pós-graduação. Carrego você em meu coração!

Ao meu orientador, *Prof. Juliano Milanezi de Almeida*, por me receber em sua equipe e em seu laboratório de braços abertos, além de todo o conhecimento transmitido. Professor, o senhor é um docente incrível, com uma didática singular. Sempre preocupado com os seus alunos. Muito obrigado por toda a orientação e paciência para comigo durante a minha pós-graduação. Se todos os professores fossem como o senhor, o mundo acadêmico seria muito melhor. Você possui a minha admiração e é uma de minhas inspirações. Muito obrigado pela oportunidade única. Sem o senhor não teria conseguido. Gratidão!

Ao meu co-orientador, *Prof. Edilson Ervolino*, por me receber em sua sala e em seu laboratório de forma única. O senhor nasceu para a docência, possui uma didática maravilhosa. Muito obrigado pela paciência, pela prontidão em me atender, por acolher e me ajudar com os processos laboratoriais, com análise dos resultados e por sempre me estender a mão nos momentos de dificuldade. Você é realmente incrível e admiro o senhor grandemente. Você é uma de minhas inspirações diárias. Gratidão!

Ao professor, *Francisley Ávila Souza*, por deixar os seus afazeres de lado para contribuir com a minha formação, através do meu Exame Geral de Qualificação (EGQ) e da minha defesa do Mestrado. Professor, muito obrigado pelo acolhimento singular e pela prontidão de sempre. O senhor possui a minha admiração. Gratidão!

As professoras, *Daniela Ponzoni, Roberta Okamoto e Mariza Akemi Matsumoto* pela prontidão em me acolher, deixando os seus afazeres de lado, para contribuir com a minha formação, seja através do meu Exame Geral de Qualificação (EGQ) ou da minha defesa. Vocês possuem a minha admiração. Muito obrigado!

Ao meu amigo, *Otávio Augusto Pacheco Vitória*, companheiro de todas as horas durante a minha pós-graduação. Você é uma pessoa de personalidade singular, que admiro muito. Agradeço por toda a ajuda e prontidão. Você foi essencial na minha formação e em todos os processos realizados. Muito obrigado! Amo você!

A minha amiga, *Bianca Rafaeli Piovezan*, companheira de todas as horas e minha “tutora”. Agradeço a amizade sincera e todo o carinho para comigo. Tenho enorme admiração por você. Muito obrigado por toda ajuda e todos os conselhos. Dona do melhor brownie e bolo de cenoura. Com você o meu trajeto se tornou mais leve e agradável. Gratidão! Amo você!

A *Elisa Mara de Abreu Furquim*, por me acolher antes mesmo do início do meu Mestrado. Muito obrigado por toda a ajuda e colaboração. Seja feliz! Admiro você!

A minha amiga, *Giovanna Fortunato*, minha companheira. Agradeço imensamente pela sua amizade sincera e todo o carinho para comigo. Você é um presente que a FOA/UNESP me deu. A sua companhia e a sua ajuda foram fundamentais durante a minha pós-graduação. Você tem uma luz, uma energia e um coração incrível. Amo você!

A minha amiga, *Gabriela Carrara Simionato e família*, que me acolheram com tanto carinho no Natal de 2021. Gabi, você é incrível, empática, tem uma energia tremenda e um coração do tamanho do mundo. Agradeço imensamente a sua amizade, a sua companhia e toda a ajuda durante o meu Mestrado. Você mora no meu coração e torço muito por ti. Amo você!

Aos demais colegas de equipe, *Henrique Rinaldi Matheus e Luiz Guilherme Fiorin*, por toda ajuda e prontidão. Muito obrigado!

A todos *os alunos de iniciação científica ou não do Departamento de Periodontia e aos alunos da graduação*. Muito obrigado por contribuírem com a minha formação, por acreditarem em mim, pela colaboração e ajuda durante as etapas do meu projeto de pesquisa. Vocês foram fundamentais e não teria conseguido sem vocês.

A todos os *técnicos-administrativos* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, vocês foram fundamentais e, sem vocês, não teria conseguido.

Por fim, agradeço a *todos* que participaram da minha caminhada de forma direta ou indireta. Muito obrigado!

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Gratidão!*

***Muito obrigado!***

*“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”.*

*(Los Hermanos)*

Turini HD. Avaliação da suplementação com ômega-3 como terapia preventiva a ocorrência de osteonecrose dos maxilares associada ao uso de zoledronato [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2023.

## RESUMO

Foi feita a seleção de 60 ratas ovariectomizadas que foram distribuídas seguindo uma tabela gerada por um programa computacional. Consistiu em apenas 01 grupo, com periodontite experimental induzida (PE) (n=60), subdividido em 04 subgrupos que receberam: Grupo Veículo (VEI) (n=15): quatro semanas após início da administração de VEI via intraperitoneal, os animais tiveram a PE induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Quatorze dias após indução, foi iniciada a administração de VEI via gavagem gástrica (diária). A exodontia foi realizada 01 dia após início da administração de VEI via gavagem gástrica. A eutanásia ocorreu no 35º dia após a exodontia. Grupo Zoledronato (ZOL) (n=15): quatro semanas após início da terapia com ZOL via intraperitoneal, os animais tiveram a PE induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Quatorze dias após indução, foi iniciada a administração de VEI via gavagem gástrica (diária). A exodontia foi realizada 01 dia após início da administração de VEI via gavagem gástrica. A eutanásia ocorreu no 35º dia após a exodontia. Grupo Ômega-3 (VEI/ $\omega$ 3) (n=15): quatro semanas após início da administração de VEI via intraperitoneal, os animais tiveram a PE induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Quatorze dias após indução, foi iniciada a suplementação com  $\omega$ 3 via gavagem gástrica (diária). A exodontia foi realizada 01 dia após início da suplementação. A eutanásia ocorreu no 35º dia após a exodontia. Grupo Zoledronato/ $\omega$ 3 (ZOL/ $\omega$ 3) (n=15): quatro semanas após início da terapia com ZOL via intraperitoneal, os animais tiveram a PE induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Quatorze dias após indução, foi iniciada a suplementação com  $\omega$ 3 via gavagem gástrica (diária). A exodontia foi realizada 01 dia após início da suplementação com  $\omega$ 3. A eutanásia ocorreu no 35º dia após a exodontia. Todas as aplicações de ZOL foram feitas com um intervalo de três dias, entretanto, a suplementação de  $\omega$ 3 ou VEI foram diárias, durante dez semanas e 36 dias respectivamente. Após 35 dias da exodontia, os animais foram submetidos a eutanásia pela administração de dose letal de tiopental (150 mg/kg). As mandíbulas coletadas foram divididas em duas partes e processadas de acordo com as análises propostas. As hemimandíbulas esquerdas foram utilizadas para processamento histológico para as análises histométrica, onde foi avaliado a porcentagem de tecido ósseo vital neoformado e a porcentagem de tecido ósseo não-vital. Análises imunoistoquímicas dos biomarcadores na região de alvéolo dentário (TRAP, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ,

entre outros) foram realizados. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ( $p < 0,05$ ) em programa computacional especializado (Bioestat® 5.0). A suplementação com  $\omega 3$  parece ser benéfica frente a osteonecrose dos maxilares associada ao uso de ZOL, diminuindo a severidade dessa condição.

**Palavras-chave:** Periodontite. Osteonecrose. Difosfonatos.

Turini HD. Evaluation of supplementation with omega-3 as a preventive therapy for the occurrence of osteonecrosis of the jaws associated with the use of zoledronate [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2023.

## **ABSTRACT**

A selection of 60 ovariectomized rats was selected and distributed according to a table generated by a computer program. It consists of only 01 group, with experimentally induced periodontitis (EP) (n=60), subdivided into 04 subgroups that received: Vehicle Group (VEI) (n=15): four weeks after the start of intraperitoneal administration of VEI, the animals had PE induced in the lower left first molar. Fourteen days after induction, administration of VEI via gastric gavage (daily) was initiated. The extraction was performed 01 day after the beginning of the administration of VEI via gastric gavage. Euthanasia occurred on the 35th day after tooth extraction. Zoledronate (ZOL) group (n=15): four weeks after the start of intraperitoneal ZOL therapy, the animals had PE induced in the lower left first molar. Fourteen days after induction, administration of VEI via gastric gavage (daily) was initiated. The extraction was performed 01 day after the beginning of the administration of VEI via gastric gavage. Euthanasia occurred on the 35th day after tooth extraction. Omega-3 group (VEI/ $\omega$ 3) (n=15): four weeks after the start of intraperitoneal administration of VEI, the animals had PE induced in the lower left first molar. Fourteen days after induction, supplementation with  $\omega$ 3 via gastric gavage (daily) was initiated. The extraction was performed 01 day after the start of supplementation. Euthanasia occurred on the 35th day after tooth extraction. Zoledronate/omega-3 (ZOL/ $\omega$ 3) group (n=15): four weeks after the start of intraperitoneal ZOL therapy, the animals had PE induced in the lower left first molar. Fourteen days after induction, supplementation with  $\omega$ 3 via gastric gavage (daily) was initiated. The extraction was performed 01 day after the start of supplementation with  $\omega$ 3. Euthanasia occurred on the 35th day after tooth extraction. All ZOL applications were performed with an interval of three days, however,  $\omega$ 3 or VEI supplementation were daily, for ten weeks and 36 days respectively. After 35 days of extraction, the animals were euthanized with the administration of a lethal dose of thiopental (150 mg/kg). The collected mandibles were divided into two parts and processed according to the proposed analyses. The left hemimandibles were used for histological processing for histometric analysis, where the percentage of newly formed vital bone tissue and the percentage of non-vital bone tissue were evaluated. Immunohistochemical analyzes of biomarkers in the tooth socket region (TRAP, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , among others) were performed. The data obtained were submitted to statistical analysis ( $p < 0.05$ ) in a

specialized computer program (Bioestat® 5.0). Supplementation with  $\omega 3$  appears to be beneficial in the face of osteonecrosis of the jaws associated with the use of ZOL, reducing the severity of this condition.

**Keywords:** Periodontitis. Osteonecrosis. Diphosphonates.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 – Esquema ilustrando o delineamento experimental durante todo o período de execução da pesquisa 22
- Figura 02 – Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de TNF- $\alpha$  no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls 28
- Figura 03 – Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de IL-1 $\beta$  no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls 29
- Figura 04 – Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de OCN no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls 30
- Figura 05 – Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de VEGF no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls 31
- Figura 06 – Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de TRAP no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls 32
- Figura 07 – Gráfico evidenciando a porcentagem de TONF no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; Análise de Variância (ANOVA); Pós-teste de Tukey 33
- Figura 08 – Gráfico evidenciando a porcentagem de TONV nas adjacências do sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; Análise de Variância (ANOVA); Pós-teste de Tukey 34
- Figura 09 – Imunomarcção de TNF- $\alpha$  no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para TNF- $\alpha$  no sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 1000x. 30 $\mu$ m 35
- Figura 10 – Imunomarcção para IL-1 $\beta$  no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para IL-1 $\beta$  no sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 1000x. 30 $\mu$ m 36

- Figura 11 – Imunomarcção para OCN no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para OCN no sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 1000x. 30 $\mu$ m 38
- Figura 12 – Imunomarcção para VEGF no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para VEGF no sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 1000x. 30 $\mu$ m 39
- Figura 13 – Imunomarcção para TRAP no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para TRAP no sítio de extração dental 25 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 1000x. 15 $\mu$ m 40
- Figura 14 – Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando as características histológicas do(s) tecido(s) que preenche(m) o interior dos alvéolos dentais aos 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI- $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Coloração: HE. 200x. 100 $\mu$ m 42
- Figura 15 – Aspecto histológico do tecido ósseo imediatamente adjacente ao sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando as características histológicas do tecido ósseo nas imediações do alvéolo dental aos 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Coloração: HE. 200x. 100 $\mu$ m 43

## LISTA DE SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ALA	Ácido alfa-linolênico
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
AT	Área total
BP	Bisfosfonato(s)
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclo-oxigenase
DAB	Tetracloridrato de diaminobenzidina
DHA	Ácido docosa-hexaenóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPA	Ácido eicosapentaenóico
g	Gramas
GL	Gay Lussac
HE	Hematoxilina e eosina
HRP	Estreptavidina conjugada com a peroxidase endógena
IL-1 $\beta$	Interleucina um beta
IR	Imunomarcção
JAK/STAT	Transdutor de sinal tirosina quinase janus e ativador de transcrição
kg	Quilo
LCn3PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ( $\omega$ 3)
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrieno(s)
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MaR	Maresina(s)
MaR1 e MaR2	Maresina 1 e 2
MCTR1, MCTR2 e MCTR3	Conjugados de maresinas para a regeneração de tecidos 1, 2 e 3
mg	Miligrama
ml	Mililitros
NF- $\kappa$ $\beta$	Fator nuclear kappa beta
OCN	Osteocalcina

OMS	Organização mundial da saúde
ONM	Osteonecrose dos maxilares
ONM-BPs	Osteonecrose dos maxilares associada a terapia com bifosfonatos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCTR1, PCTR2 e PCTR3	Conjugados de protectinas para a regeneração de tecidos 1, 2 e 3
PE	Periodontite experimental
PG	Prostaglandina(s)
PGE2/PGE3/PGE5	Prostaglandina E2, E3 e E5
pH	Potencial de hidrogênio
PLA2	Fosfolipase A2
PTC/PD1/PDX	Protectina, subtipo D1 e subtipo DX
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa
RANK/RANKL/OPG	Sistema receptor ativador do fator nuclear kappa ligante a osteoprotegerina
Rv	Resolvina(s)
RvD1 – D6/ RvE1 – E3	Resolvinas grupo D1 – D6 e resolvinas grupo E1 – E3
RvTR1, RvTR2 e RvTR3	Conjugados de resolvina para a regeneração de tecidos 1, 2 e 3
TMH	Terapia modulatória do hospedeiro
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TONF	Porcentagem de tecido ósseo vital neoformado
TONV	Porcentagem de tecido ósseo não-vital
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TX	Tramboxano(s)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEI	Veículo
ZOL	Zoledronato
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\omega\text{3}$	Ômega-3

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1 Animais	21
2.2 Cálculo amostral	21
2.3 Grupos e períodos experimentais	21
2.4 Delineamento experimental	22
2.5 Sedação e anestesia	22
2.6 Ovariectomia	23
2.7 Verificação do ciclo estral	23
2.8 Protocolo de administração de ZOL ou VEI	23
2.9 Indução da PE	24
2.10 Protocolo de administração de $\omega 3$ ou VEI	24
2.11 Exodontia	24
2.12 Eutanásia e coleta das amostras	24
2.13 Processamento tecidual	25
2.14 Colorações	25
2.15 Processamento imunoistoquímico	25
2.16 Análise dos resultados	26
2.17 Análise histométrica de TONF e TONV	26
2.18 Análise imunoistoquímica	26
2.19 Análise estatística	27
3 RESULTADOS	28
3.1 TNF- $\alpha$ no sítio de extração dental	28
3.2 IL-1 $\beta$ no sítio de extração dental	29
3.3 ONC no sítio de extração dental	30
3.4 VEGF no sítio de extração dental	31
3.5 TRAP no sítio de extração dental	32
3.6 Porcentagem de TONF no sítio de extração dental	33
3.7 Porcentagem de TONV nas adjacências sítio de extração dental	33
4 DISCUSSÃO	45
5 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50



## 1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BPs) são uma classe de drogas utilizadas em uma gama ampla de especialidades da área da saúde como a oncologia, ortopedia e a odontologia. Normalmente são prescritos para o tratamento de doenças como osteoporose, doença de Paget, osteogênese imperfeita, mieloma múltiplo, ou para controle da progressão de metástases ósseas, hipercalcemia e dor óssea em neoplasias malignas osteotrópicas, tais como tumores de mama, próstata, pulmão e rim (DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008).

O zoledronato (ZOL) têm emergido e esse fármaco altera o metabolismo ósseo atuando pela inibição da via do mevalonato, através de sua interação e consequente inativação da enzima farnesil difosfato sintase (DUNFORD *et al.*, 2001). Dessa forma, não há a formação de farnesil difosfato e geranyl difosfato, sendo essenciais para prenilação de proteínas denominadas Ras, Rho e Rac, que atualmente são tidas como os alvos do efeito dessa classe de BPs (LUCKMAN *et al.*, 1998).

Essas proteínas estão relacionadas com a inibição da osteoclastogênese (ABE *et al.*, 2012), com a indução de apoptose prematura em osteoclastos ativos, especialmente com significativas alterações na dinâmica do citoesqueleto dessas células, impossibilitando a formação da zona clara e da zona pregueada nos osteoclastos, as quais são essenciais para a interação da célula com a matriz óssea e para a formação do microambiente propício para o início da atividade reabsortiva (COXON; ROGERS, 2003; ORY *et al.*, 2008). A reação adversa ocasionada pelo uso dos BPs, com destaque na odontologia, é a osteonecrose dos maxilares associada a terapia com BPs (ONM-BPs) (OTTO *et al.*, 2011).

A ONM-BPs é definida como a presença de osso exposto na região maxilofacial por um período maior que oito semanas, em pacientes que faziam ou fazem uso de BPs e que não possuíam/possuem história prévia de radioterapia nos maxilares. Em pacientes que fazem uso do ZOL pela via intravenosa, ou sua associação com outros BPs, prescritos para complementação da terapia oncológica, a incidência da ONM-BPs atinge de 01 a 12% dos pacientes e, como os BPs têm efeito cumulativo, essa incidência pode atingir 21% dos pacientes após o terceiro ano de uso desse tipo de fármaco (GÓMEZ FONT; MARTÍNEZ GARCÍA; OLMOS MARTÍNEZ, 2008).

A ONM-BPs acomete com maior frequência o gênero feminino (73%), com idade avançada (em média 66 anos e uma variação entre 42 e 90 anos de idade – pós menopausa),

que fazem ou fizeram uso crônico de BPs administrados pela via intravenosa (96,8%), especificamente o ZOL (47,6%) ou este em associação com outros BPs (24,6%). Há uma predileção pela ocorrência na mandíbula, especificamente na região dos pré-molares e molares (70,6%). A extração dentária ou a combinação de exodontia com procedimentos endodônticos ou periodontais (63,6%) estão entre os potentes fatores desencadeantes da ONM-BPs (OTTO *et al.*, 2011).

Os possíveis fatores etiopatológicos que atualmente são apontados como os desencadeantes da ONM-BPs são: a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos; o efeito citotóxico dos BPs sobre as células dos tecidos que compõem a mucosa bucal; o potente efeito antiangiogênico dos BPs; e o favorecimento a infecção induzida pelos BPs (ALLEN; BURR, 2009; MIGLIORATI *et al.*, 2011; SHANNON *et al.*, 2011; SIDDIQI; PAYNE; ZAFAR, 2009). Estudos clínicos têm mostrado que a exodontia de dentes com comprometimento periodontal e/ou periapical é o principal fator de risco local para a ONM-BPs (KANG *et al.*, 2013; RUGGIERO *et al.*, 2014).

O tratamento da ONM-BPs tem sido efetuado por diferentes abordagens: estadiamento clínico da doença, compreendendo desde bochechos com digluconato de clorexidina 0,12%, antibioticoterapia, até desbridamento cirúrgico da lesão, que em alguns casos pode consistir em mandibulectomia ou maxilectomia parcial (BAGAN *et al.*, 2006; BERENSON *et al.*, 1998; PIRES *et al.*, 2005; WOO; HELLSTEIN; KALMAR, 2006).

A terapia modulatória do hospedeiro (TMH) consiste na utilização de medicamentos sistêmicos ou locais como adjuntos a terapia convencional. A TMH tem por objetivo diminuir a inflamação e a destruição tecidual, favorecendo a saúde e a possível regeneração. Uma opção de TMH é a utilização sistêmica de óleos de peixes. Os óleos de peixes são ricos em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFAs), em especial o  $\omega$ 3 (LCn3PUFAs). O  $\omega$ 3 é constituído pelos ácidos eicosapentaenóico (EPA), docosa-hexaenóico (DHA) e alfa-linolênico (ALA) (BHATAVADEKAR; WILLIAMS, 2009; SALVI; LANG, 2005; WILLIAMS, 2008).

O EPA e DHA merecem destaque e são sintetizados em quantidades mínimas pelo organismo humano, sendo a sua suplementação dietética extremamente importante. Alimentos como o salmão, a cavala e frutos do mar são fontes ricas em EPA e DHA (CALDER, 2009; DAWSON *et al.*, 2014; MEYER *et al.*, 2003; YATES; CALDER; ED RAINGER, 2014). O EPA e o DHA apresentam ação anti-inflamatória para diversas doenças. Em ratos, o  $\omega$ 3

demonstrou diminuir significativamente os osteoclastos e sua atividade osteoclástica, relacionada a reabsorção óssea alveolar. O  $\omega 3$  age nos fosfolipídios de membrana inibindo a enzima fosfolipase A2 (PLA2), comprometendo a síntese de ácido araquidônico (AA) disponível para as vias ciclo-oxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), reduzindo dessa forma, os seus produtos pró-inflamação como o leucotrieno B4 (LTB4) e a prostaglandina E2 (PGE2) (BAGGA *et al.*, 2003; CALDER, 2006; KELLEY *et al.*, 1998; PETERSON *et al.*, 1998; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998).

Além disso, o  $\omega 3$  sintetiza mediadores lipídicos pró-resolução como as resolvinas, lipoxinas, maresinas, protectinas, conjugados de resolvina, conjugados de protectinas e conjugados de maresinas. Estudos apontam que o  $\omega 3$  também compete pelo substrato das vias LOX e COX, inibindo a síntese de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-1 $\beta$ , PGE2 e LTB4, ou seja, moléculas que favorecem a inflamação, além de comprometer vias de sinalização celular como o fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa\beta$ ), a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), o transdutor de sinal tirosina quinase janus e ativador de transcrição (JAK/STAT) e o sistema receptor ativador do fator nuclear kappa ligante a osteoprotegerina (RANK/RANKL/OPG) (BAGGA *et al.*, 2003; CALDER, 2006; KELLEY *et al.*, 1998; PETERSON *et al.*, 1998; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998).

O  $\omega 3$  circulante é capaz de inibir a diferenciação, ativação e função dos osteoclastos, o que acontece devido ao baixo nível de RANKL disponível, derivado da baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias. O RANKL em quantidades pequenas é impedido de se ligar ao seu receptor RANK pela ação da OPG, não havendo ativação do NF- $\kappa\beta$  e de outras vias de sinalização celular como o MAPK e o JAK/STAT. Com isso, os pré-osteoclastos não se diferenciam em osteoclastos ativos e a reabsorção óssea alveolar fica comprometida (RAHMAN; BHATTACHARYA; FERNANDES, 2008; SUN *et al.*, 2003).

Dentro do contexto da ONM-BPs, não apenas a resposta do hospedeiro pode ser um fator significativo. A presença de micro-organismos é um fator crítico para o desencadeamento da ONM-BPs (BOFF *et al.*, 2014). Recentemente, Ribeiro-Vidal *et al.*, (2020) observou que tanto o DHA quanto o EPA têm atividade antimicrobiana significativa contra as seis espécies bacterianas incluídas no seu modelo para estudo do biofilme. Sendo assim, além da modulação positiva das moléculas chaves relacionadas com a ONM-BPs (mencionadas acima), o  $\omega 3$  tem potencial para atuar reduzindo os patógenos presentes no sítio da extração dentária. Estas características podem ser vislumbradas como potenciais para

atingir equilíbrio molecular e homeostase durante o processo de reparação alveolar, prevenindo a ocorrência de ONM-BPs (RIBEIRO-VIDAL *et al.*, 2020). O propósito do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com o  $\omega 3$  na prevenção de ONM associada ao uso do ZOL.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental foi enviado para a avaliação e homologação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Câmpus de Araçatuba, dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os guias *ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)* (KILKENNY et al., 2010).

### 2.1 Animais

No presente estudo foram utilizadas 60 ratas ovariectomizadas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 400g, com 04 meses de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Câmpus de Araçatuba, que foram mantidas sob as condições de ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de 22° C ( $\pm 2^\circ$  C), sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de 55% ( $\pm 05\%$ ) e acondicionamento em gaiolas plásticas com maravalha, ração e água *ad libitum*.

### 2.2 Cálculo amostral

Para determinação do tamanho amostral, dois pontos foram considerados: 01 – estudos prévios com metodologia semelhante realizados em nosso laboratório; e 02 – Foi realizado um estudo piloto e determinada a diferença mínima entre as médias obtidas de cada tratamento. Foi determinado o poder do teste de 80% com valor de  $\alpha$  de 05% (ERVOLINO *et al.*, 2019). Estes dados foram submetidos ao BioEstat® 5.0 (BioEstat® 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil), que determinou um número mínimo de 08 repetições/animais por tratamento em cada período. Considerando as perdas em animais modificados sistemicamente, o número de animais em cada período experimental foi estabelecido em  $n=10$ .

### 2.3 Grupos e períodos experimentais

Todas a ratas ovariectomizadas foram submetidas ao acompanhamento do ciclo estral antes do início do experimento, as ratas que estavam com ciclo menstrual ativo foram desprezadas do experimento.

Grupo VEI (n=15): quatro semanas após início da administração de VEI via intraperitoneal (a cada 03 dias), os animais tiveram a PE induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Quatorze dias após indução, foi iniciada a administração de VEI via gavagem gástrica (diária). A exodontia foi realizada 01 dia após início da administração de VEI via gavagem gástrica. A eutanásia ocorreu no 35° dia após a exodontia;

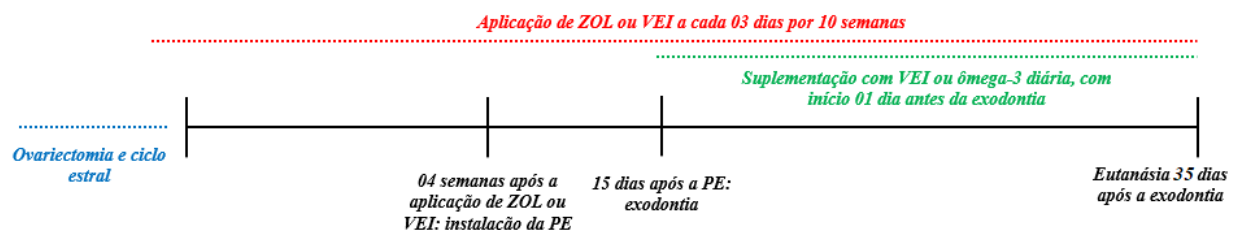
Grupo VEI/ $\omega$ 3 (n=15): quatro semanas após início da administração de VEI via intraperitoneal (a cada 03 dias), os animais tiveram a PE induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Quatorze dias após indução, foi iniciada a suplementação com  $\omega$ 3 via gavagem gástrica (diária). A exodontia foi realizada 01 dia após início da suplementação. A eutanásia ocorreu no e 35° dia após a exodontia;

Grupo ZOL (n=15): quatro semanas após início da terapia com ZOL via intraperitoneal (a cada 03 dias), os animais tiveram a PE induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Quatorze dias após indução, foi iniciada a administração de VEI via gavagem gástrica (diária). A exodontia foi realizada 01 dia após início da administração de VEI via gavagem gástrica. A eutanásia ocorreu no 35° dia após a exodontia;

Grupo ZOL/ $\omega$ 3 (n=15): quatro semanas após início da terapia com ZOL via intraperitoneal (a cada 03 dias), os animais tiveram a PE induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Quatorze dias após indução, foi iniciada a suplementação com  $\omega$ 3 via gavagem gástrica (diária). A exodontia foi realizada 01 dia após início da suplementação. A eutanásia ocorreu no 35° dia após a exodontia.

## 2.4 Delineamento experimental

**Figura 01 - Esquema ilustrando o delineamento experimental durante todo o período de execução da pesquisa.** *Fonte: Autor, 2023.*



## 2.5 Sedação e anestesia

Todos os procedimentos experimentais envolvendo dor ou desconforto para os animais foram realizados sob sedação e anestesia geral, obtidos pela associação de cloridrato de cetamina (80 mg/kg, Dopalen®, Ceva, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (02%, Anasedan®, Ceva, SP, Brasil).

## **2.6 Ovariectomia**

Após o preparo da área cirúrgica (tricotomia e antissepsia), com auxílio de lâmina de bisturi número 15, incisões bilaterais de aproximadamente 01 cm de extensão foram realizadas para se obter o acesso aos ovários e, através das quais, foram realizados a remoção deles. As suturas internas foram realizadas com fio absorvível (Vicryl® 4-0, Ethicon Products®, Johnson & Johnson®, Somerville, New Jersey, USA) e as suturas externas com fio de seda 4-0 (Ethicon Products®, Johnson & Johnson®, Somerville, New Jersey, USA).

## **2.7 Verificação do ciclo estral**

A verificação do ciclo estral foi realizada por um período de 03 meses após a ovariectomia, até o momento do início do período experimental (LUIZE *et al.*, 2008). Para realização da coleta do lavado vaginal, foi utilizada uma pipeta confeccionada a partir de uma ponteira de polietileno de uma minipipeta (1000 ml, Laborglass®, Belenzinho, SP, Brasil) e látex de garrote, que contém aproximadamente uma gota (0,3 ml) de VEI. As bordas da ponteira foram arredondadas para não machucarem as paredes vaginais dos animais. A ponta da ponteira foi introduzida no orifício vaginal, com cuidado para não estimular a cérvix uterina e uma gota de VEI (água destilada) foi injetada, aspirada e colocada em uma lâmina para visualização ao microscópio, com magnificação de 10 e 40 vezes, sem a necessidade do uso de lamínula. A coleta foi realizada diariamente, no mesmo horário e o ciclo foi acompanhado por um período de 03 meses (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Ao final da 12ª semana, os animais estavam em estágio de diestro, indicando os baixos níveis de estradiol e a não proliferação e exfoliação das células da parede uterina, como visualizadas no período de estro, indicando a interrupção do ciclo (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Todas as ratas foram utilizadas no experimento.

## **2.8 Protocolo de administração de ZOL ou VEI**

O tratamento com VEI ou ZOL foi realizado por via intraperitoneal a cada 03 dias. O veículo consistiu em 0,45 ml de solução de água destilada. A dose de ZOL foi de 100 mg/kg,

diluída em VEI. Essa dose e o plano de tratamento medicamentoso foram baseados em um protocolo atualmente utilizado para complementar a terapia oncológica em humanos (SILVA *et al.*, 2015), adaptado para ratos (ERVOLINO *et al.*, 2019).

## **2.9 Indução da PE**

A PE foi induzida pelo posicionamento de um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão número 24; Coats Corrente®, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo de todos os animais, sendo mantido em posição por meio de nó cirúrgico (ALMEIDA *et al.*, 2008; JOHNSON, 1975).

## **2.10 Protocolo de administração de $\omega 3$ ou VEI**

A administração de VEI (água destilada) ou  $\omega 3$  foi realizada por meio de gavagem gástrica, diariamente. Os animais pertencentes aos grupos VEI/ $\omega 3$  e ZOL/ $\omega 3$  receberam uma dose de 40 mg/kg de  $\omega 3$  em VEI apropriado (AZUMA *et al.*, 2021), enquanto os animais pertencentes aos grupos VEI e ZOL receberam 0,2 ml de água destilada para serem submetidos ao mesmo estresse causado pela gavagem gástrica.

## **2.11 Exodontia**

Um dia após o início da suplementação, a ligadura foi removida e foi realizada exodontia do primeiro molar inferior esquerdo de todos os animais. Para isso, os animais foram posicionados adequadamente em mesa cirúrgica, onde foi executada a antisepsia da cavidade bucal, sindesmotomia, luxação e extração do primeiro molar inferior esquerdo, através da utilização de instrumentais odontológicos adaptados. Imediatamente após a exodontia, as bordas das feridas cirúrgicas foram suturadas com fio de poliglactina-910 (Vicryl® 4-0, Ethicon Products®, Johnson & Johnson®, Somerville, New Jersey, USA).

## **2.12 Eutanásia e coleta das amostras**

Foram realizadas eutanásias por meio de superdosagem anestésica (150 mg/kg de tiopental - Cristália®, Itapira, São Paulo, Brazil) no 35º dia após a exodontia dos primeiros molares inferiores esquerdos, consistindo em 15 animais por grupo/período. As hemimandíbulas foram removidas e fixadas em solução de formaldeído tamponado 04% por um período de 48 horas.

## **2.13 Processamento tecidual**

Após fixação, as hemimandíbulas esquerdas foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% e, posteriormente, submetidas a processamento histológico convencional e inclusão em parafina. Os cortes histológicos (04 µm de espessura) foram obtidos em uma progressão vestibulo-lingual, paralelamente ao plano sagital.

## **2.14 Colorações**

Três secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise para a análise histométrica de porcentagem de tecido ósseo vital neoformado (TONF) e porcentagem de tecido ósseo não-vital (TONV).

## **2.15 Processamento imunoistoquímico**

Secções adicionais foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°, - 100°, - 100°, - 90° e - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão específico (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 imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 03% de peróxido de hidrogênio por 01 hora e 01% 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 quatro lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ , anti-VEGF, anti-OCN e anti-TRAP. Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 02 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 01 hora (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, 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 procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

## 2.16 Análise dos resultados

As análises microscópicas foram realizadas por operadores calibrados e cegos aos tratamentos. Para a análise histométrica, foram avaliados três cortes histológicos localizados nas porções vestibular, média e lingual do local de exodontia. Um corte histológico da porção média do sítio de extração do dente foi usado para análise histoquímica e imunoistoquímica, como descrito por Ervolino *et al.* (2019).

## 2.17 Análise histométrica de TONF e TONV

A quantidade total de tecido ósseo foi calculada usando um software de análise de imagem (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss®). Em seguida, a porcentagem de osso vital neoformado (TONF) e a porcentagem de tecido ósseo não-vital (TONV) foram calculadas usando o mesmo software. O TONF consistiu em regiões onde mais de dez lacunas de osteócitos vizinhos se apresentavam vazias ou contendo restos de osteócitos necróticos (MARTELLI *et al.*, 2017).

## 2.18 Análise imunoistoquímica

O número de células TRAP-positivas/mm<sup>2</sup> no tecido ósseo vital foram quantificadas usando um software de análise de imagem (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss®). A quantidade de células TRAP-positivas foi expressa como média  $\pm$  desvio padrão.

Uma análise semiquantitativa da imunomarcação de células TRAP, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , e VEGF, OCN foi realizada de acordo com critérios baseados no trabalho de Gusman *et al.* (2019), que foram caracterizados da seguinte forma:

- Score 00: sem imunomarcação (ausência total de células imunorreativas [IR]);
- Score 01: baixa imunomarcação (IR em  $\sim 1/4$  de células por área);
- Score 02: moderada imunomarcação (IR em  $\sim 1/2$  de células por área);
- Score 03: alta imunomarcação (IR em  $\sim 3/4$  de células por área).

## 2.19 Análise estatística

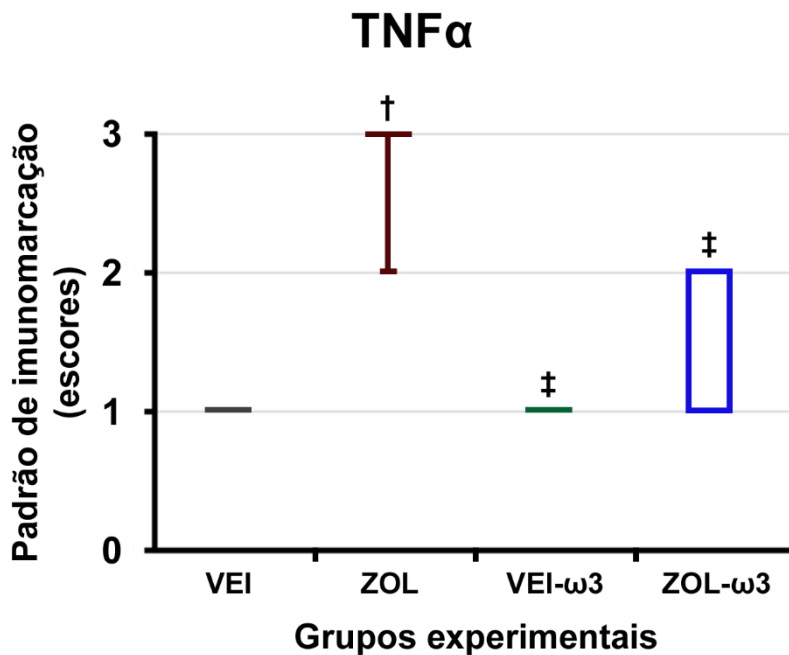
A normalidade e a homocedasticidade foram analisadas pelos testes: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls; Teste de Normalidade de

Shapiro-Wilk; Análise de Variância (ANOVA); Pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 05% ( $p \leq 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 TNF- $\alpha$ no sítio de extração dental

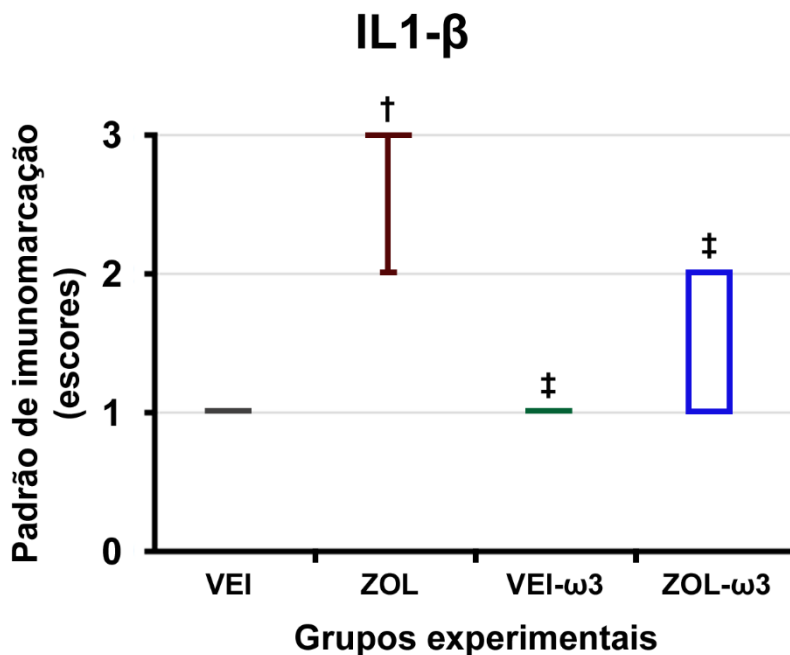
O padrão de imunomarcção para TNF- $\alpha$  no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentado na figura 02. Nos grupos tratados com o veículo, VEI e VEI/ $\omega$ 3, a mediana e o desvio interquartis foi de 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção) e 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), respectivamente. Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL e ZOL/ $\omega$ 3, a mediana e o desvio interquartis foi de 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção) e 2 (1 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), respectivamente. O grupo ZOL apresentou um padrão de imunomarcção para TNF- $\alpha$  maior que os demais grupos experimentais (VEI, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3). O padrão de imunomarcção para TNF- $\alpha$  em ZOL/ $\omega$ 3 foi menor que em ZOL. Não houve diferença estatisticamente significante quando VEI e VEI/ $\omega$ 3 são comparados entre si.



**Figura 02:** Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de TNF- $\alpha$  no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. Símbolos: †, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo ZOL. Fonte: Autor, 2023.

### 3.2 IL-1 $\beta$ no sítio de extração dental

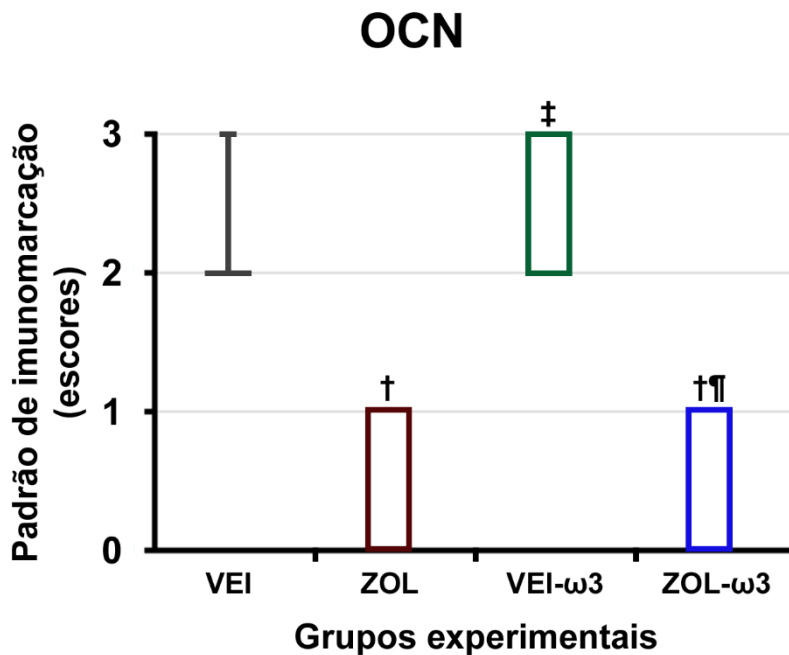
O padrão de imunomarcção para IL-1 $\beta$  no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentado na figura 03. Nos grupos tratados com o veículo, VEI e VEI/ $\omega$ 3, a mediana e o desvio interquartis foi de 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção) e 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), respectivamente. Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL e ZOL/ $\omega$ 3, a mediana e o desvio interquartis foi de 3 (2 – 3; prevaleceu um alto padrão de imunomarcção) e 2 (1 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), respectivamente. O grupo ZOL apresentou um padrão de imunomarcção para IL-1 $\beta$  maior que os demais grupos experimentais (VEI, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3). O padrão de imunomarcção para IL-1 $\beta$  em ZOL/ $\omega$ 3 foi menor que em ZOL. Não houve diferença estatisticamente significativa quando VEI e VEI/ $\omega$ 3 são comparados entre si.



**Figura 03:** Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de IL-1 $\beta$  no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL. Fonte: Autor, 2023.

### 3.3 Análise de OCN no sítio de extração dental

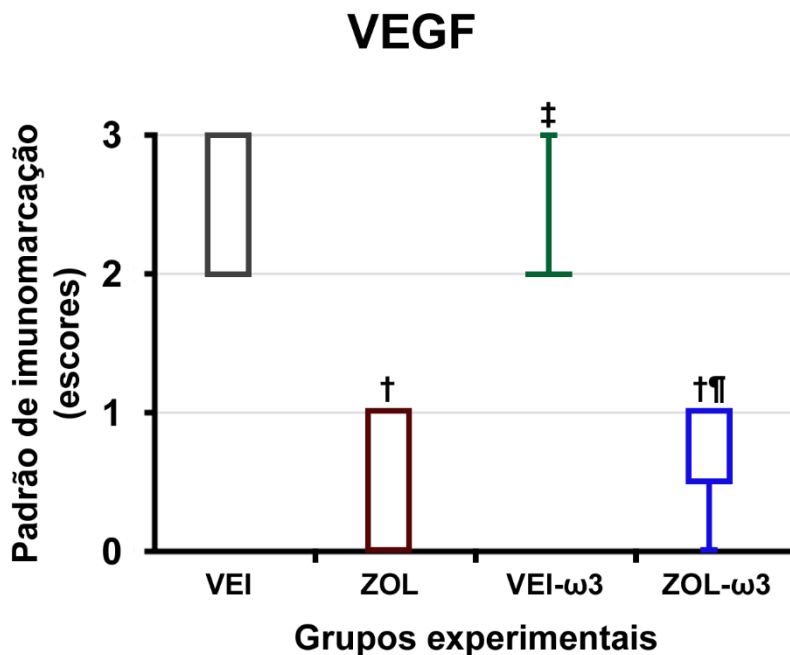
O padrão de imunomarcção para OCN no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentado na figura 4. Nos grupos tratados com o veículo, VEI e VEI/ $\omega$ 3, a mediana e o desvio interquartis foi de 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção) e 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), respectivamente. Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL e ZOL/ $\omega$ 3, a mediana e o desvio interquartis foi de 0 (0 – 1; prevaleceu um padrão nulo de imunomarcção) e 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), respectivamente. O grupo ZOL e o grupo ZOL/ $\omega$ 3 apresentaram um padrão de imunomarcção para OCN menor que os demais grupos (VEI e VEI/ $\omega$ 3). Não houve diferença estatisticamente significativa quando ZOL e ZOL/ $\omega$ 3 são comparados entre si. Na comparação entre VEI e VEI/ $\omega$ 3 também não foi detectada diferença estatisticamente significativa.



**Figura 04:** Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de OCN no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI/ $\omega$ 3. Fonte: Autor, 2023.

### 3.4 VEGF no sítio de extração dental

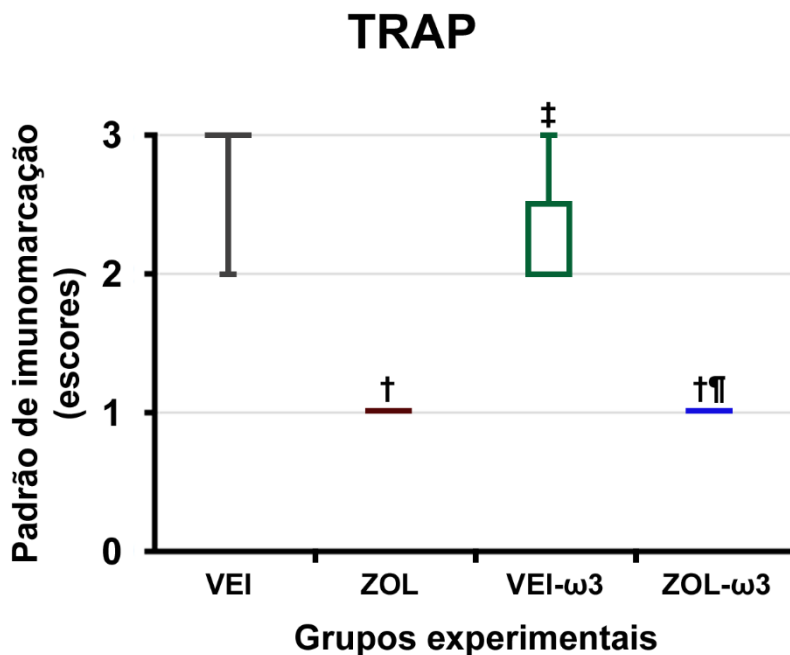
O padrão de imunomarcção para VEGF no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentado na figura 05. Nos grupos tratados com o veículo, VEI e VEI/ $\omega$ 3, a mediana e o desvio interquartis foi de 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção) e 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), respectivamente. Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL e ZOL/ $\omega$ 3, a mediana e o desvio interquartis foi de 0 (0 – 1; prevaleceu um padrão nulo de imunomarcção) e 1 (0 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), respectivamente. O grupo ZOL e o grupo ZOL/ $\omega$ 3 apresentaram um padrão de imunomarcção para VEGF menor que os demais grupos (VEI e VEI/ $\omega$ 3). Não houve diferença estatisticamente significativa quando ZOL e ZOL/ $\omega$ 3 são comparados entre si. Na comparação entre VEI e VEI/ $\omega$ 3 também não foi detectada diferença estatisticamente significativa.



**Figura 05:** Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de VEGF no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; †‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI/ $\omega$ 3. Fonte: Autor, 2023.

### 3.5 TRAP no sítio de extração dental

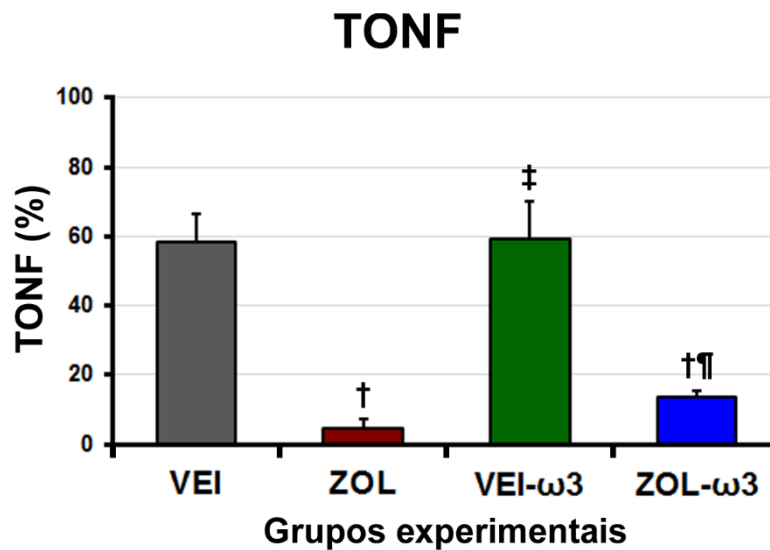
O padrão de imunomarcção para TRAP no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentado na figura 06. Nos grupos tratados com o veículo, VEI e VEI/ $\omega$ 3, a mediana e o desvio interquartis foi de 2 (1 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção) e 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), respectivamente. Nos grupos tratados com o zoledronato, ZOL e ZOL/ $\omega$ 3, a mediana e o desvio interquartis foi de 1 (1 – 1; prevaleceu um padrão nulo de imunomarcção) e 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), respectivamente. O grupo ZOL e o grupo ZOL/ $\omega$ 3 apresentaram um padrão de imunomarcção para TRAP menor que os demais grupos (VEI e VEI/ $\omega$ 3). Não houve diferença estatisticamente significativa quando ZOL e ZOL/ $\omega$ 3 são comparados entre si. Na comparação entre VEI e VEI/ $\omega$ 3 também não foi detectada diferença estatisticamente significativa.



**Figura 06:** Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de TRAP no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI/ $\omega$ 3. Fonte: Autor, 2023.

### 3.6 Porcentagem de TONF no sítio de extração dental

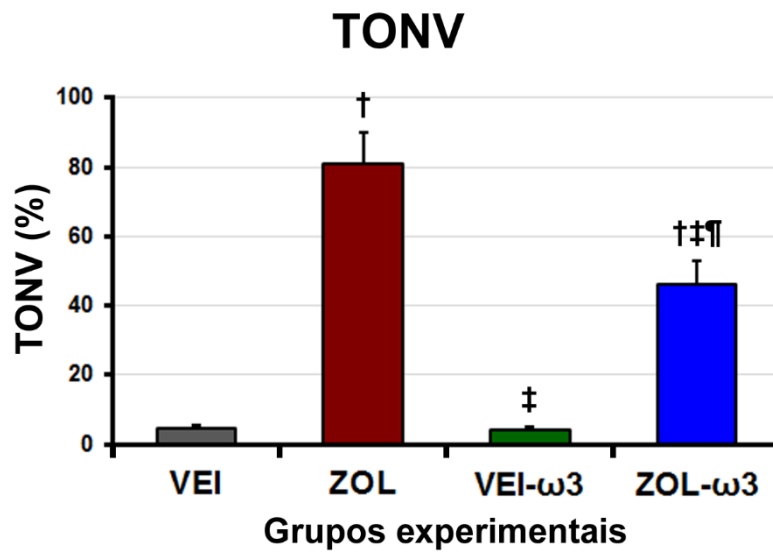
A porcentagem de TONF no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentado na figura 07. Os grupos tratados com zoledronato (ZOL e ZOL/ $\omega$ 3) apresentaram menor porcentagem de TONF quando comparados com os grupos tratados com o veículo (VEI e VEI/ $\omega$ 3). A porcentagem de TONF em VEI e VEI/ $\omega$ 3 não apresentou diferença estatisticamente significativa. Não houve diferença estatisticamente significativa quando ZOL e ZOL/ $\omega$ 3 foram comparados entre si.



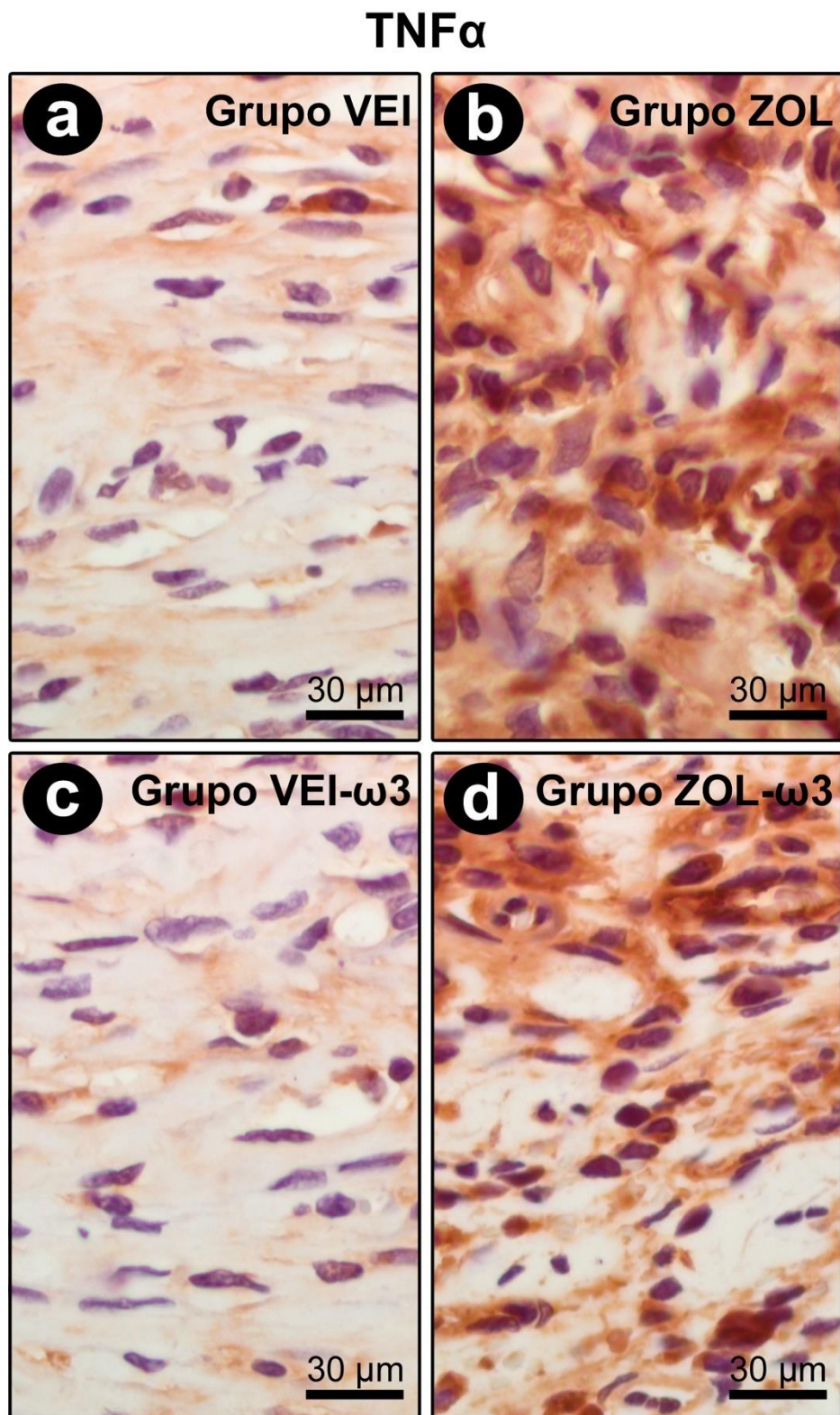
**Figura 07:** Gráfico evidenciando a porcentagem de TONF no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; Análise de Variância (ANOVA); Pós-teste de Tukey. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; †‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI/ $\omega$ 3. Fonte: Autor, 2023.

### 3.7 Porcentagem de TONV nas adjacências sítio de extração dental

A porcentagem de TONV no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentado na figura 08. O grupo ZOL apresentou maior porcentagem de TONV quando comparados com os demais grupos experimentais (VEI, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3). A porcentagem de TONV em ZOL/ $\omega$ 3 foi maior que nos grupos tratados com o veículo (VEI e VEI/ $\omega$ 3). Não houve diferença estatisticamente significativa quando VEI e VEI/ $\omega$ 3 foram comparados entre si.

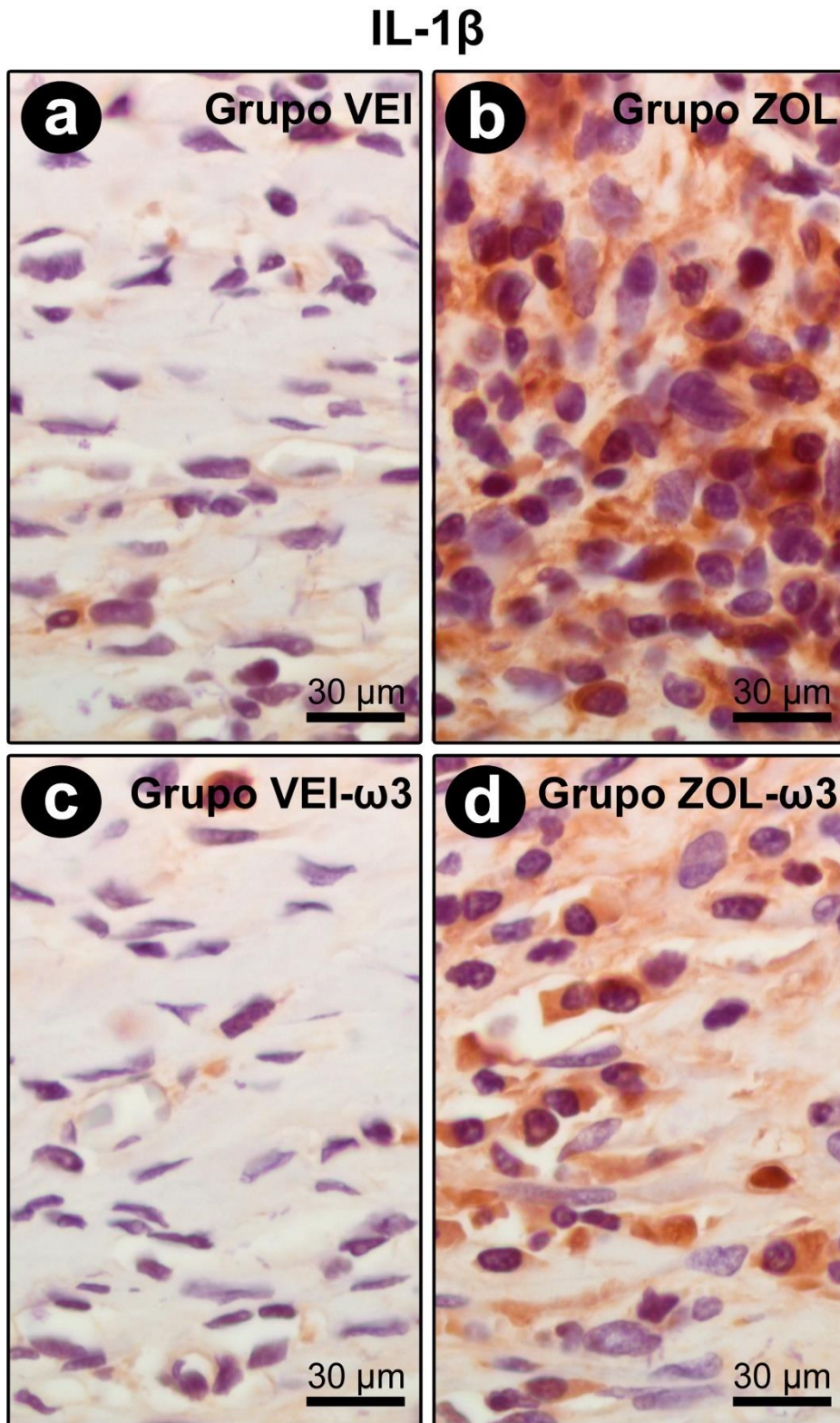


**Figura 08:** Gráfico evidenciando a porcentagem de TONV nas adjacências do sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; Análise de Variância (ANOVA); Pós-teste de Tukey. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VEI/ $\omega$ 3. Fonte: Autor, 2023.



**Figura 09:** Imunomarcção para TNF- $\alpha$  no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para TNF- $\alpha$  no sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3

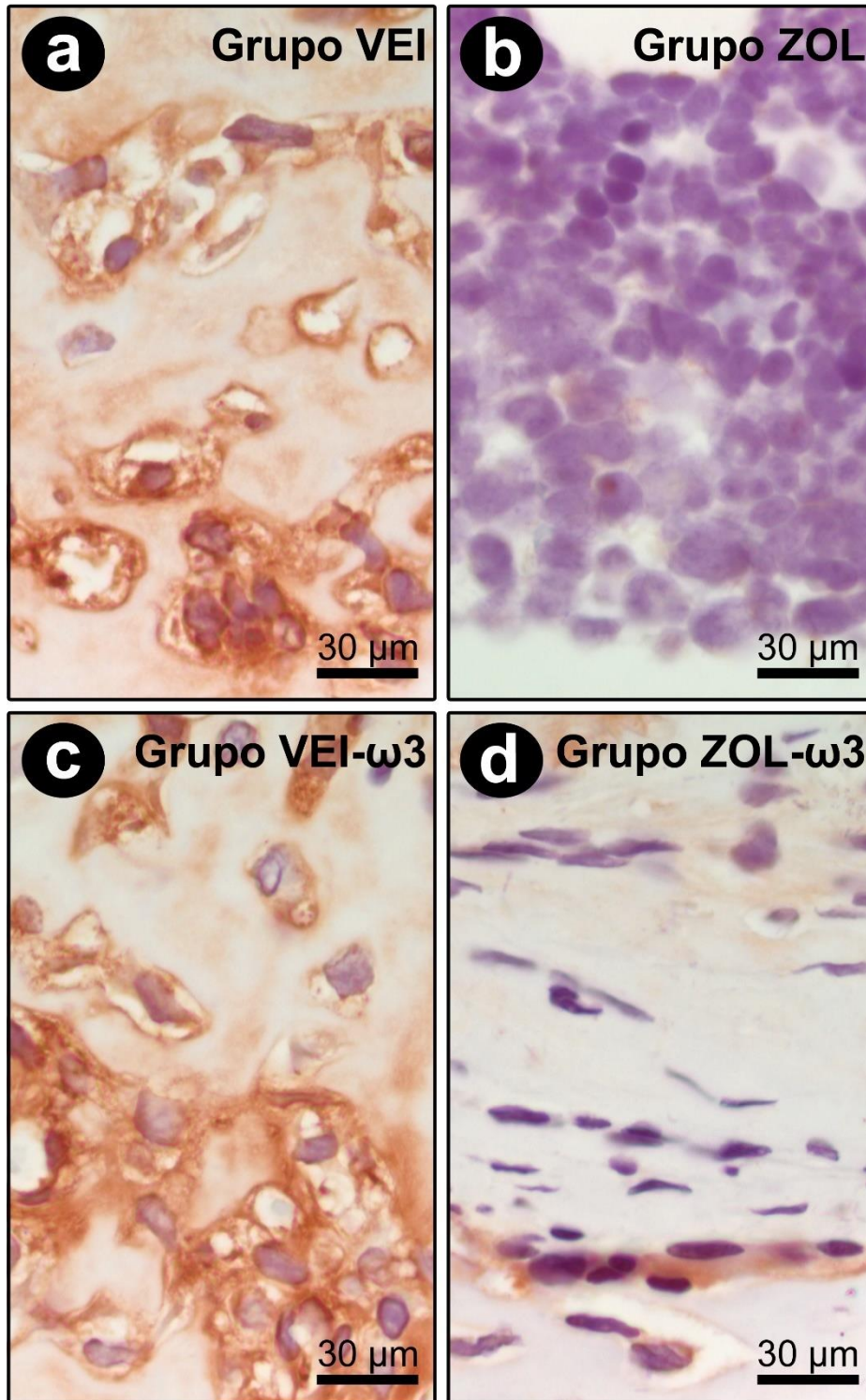
(d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 30 $\mu$ m. Fonte: Autor, 2023.



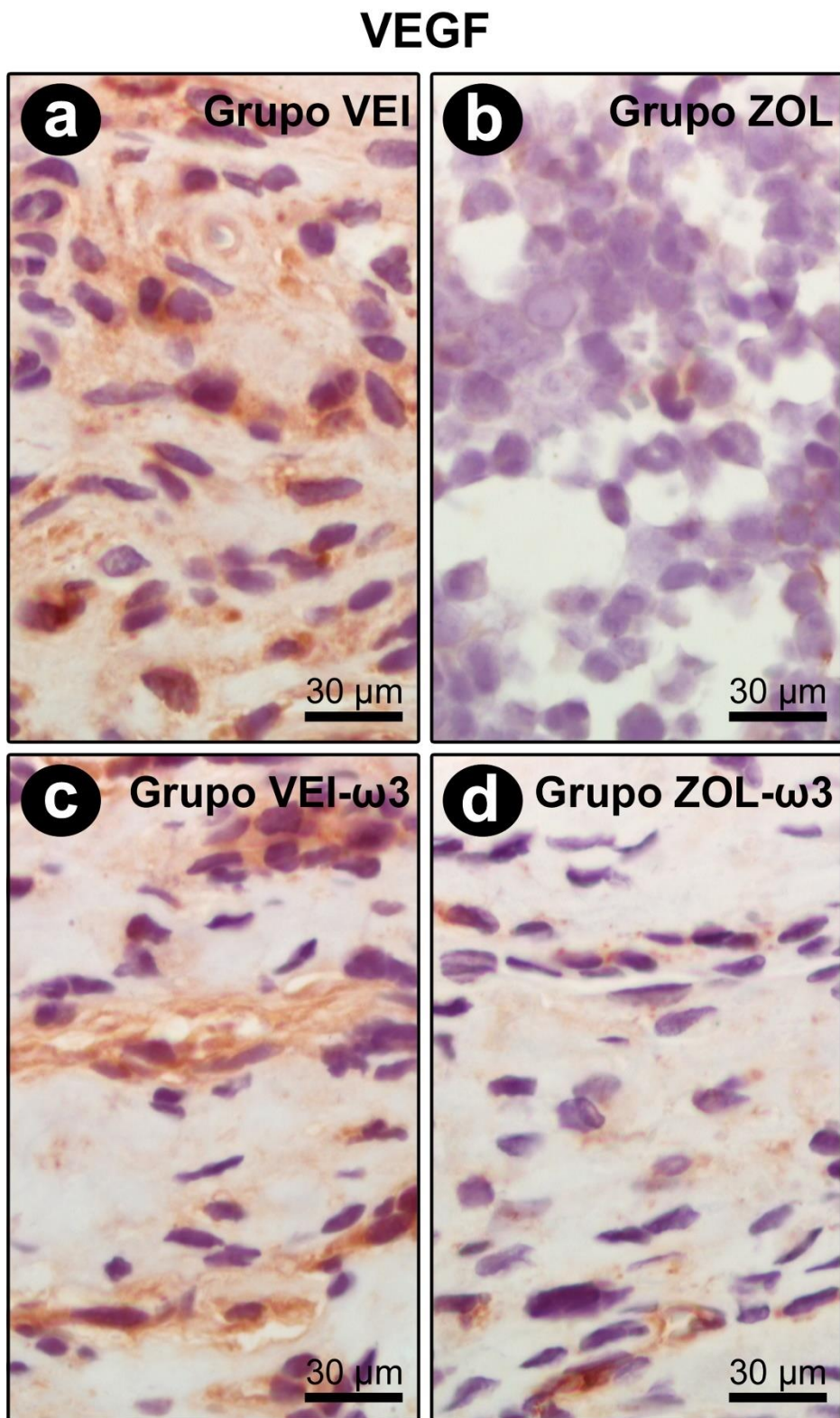
**Figura 10:** Imunomarcção para IL-1 $\beta$  no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para IL-1 $\beta$  no

sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 30 $\mu$ m. Fonte: Autor, 2023.

## OCN

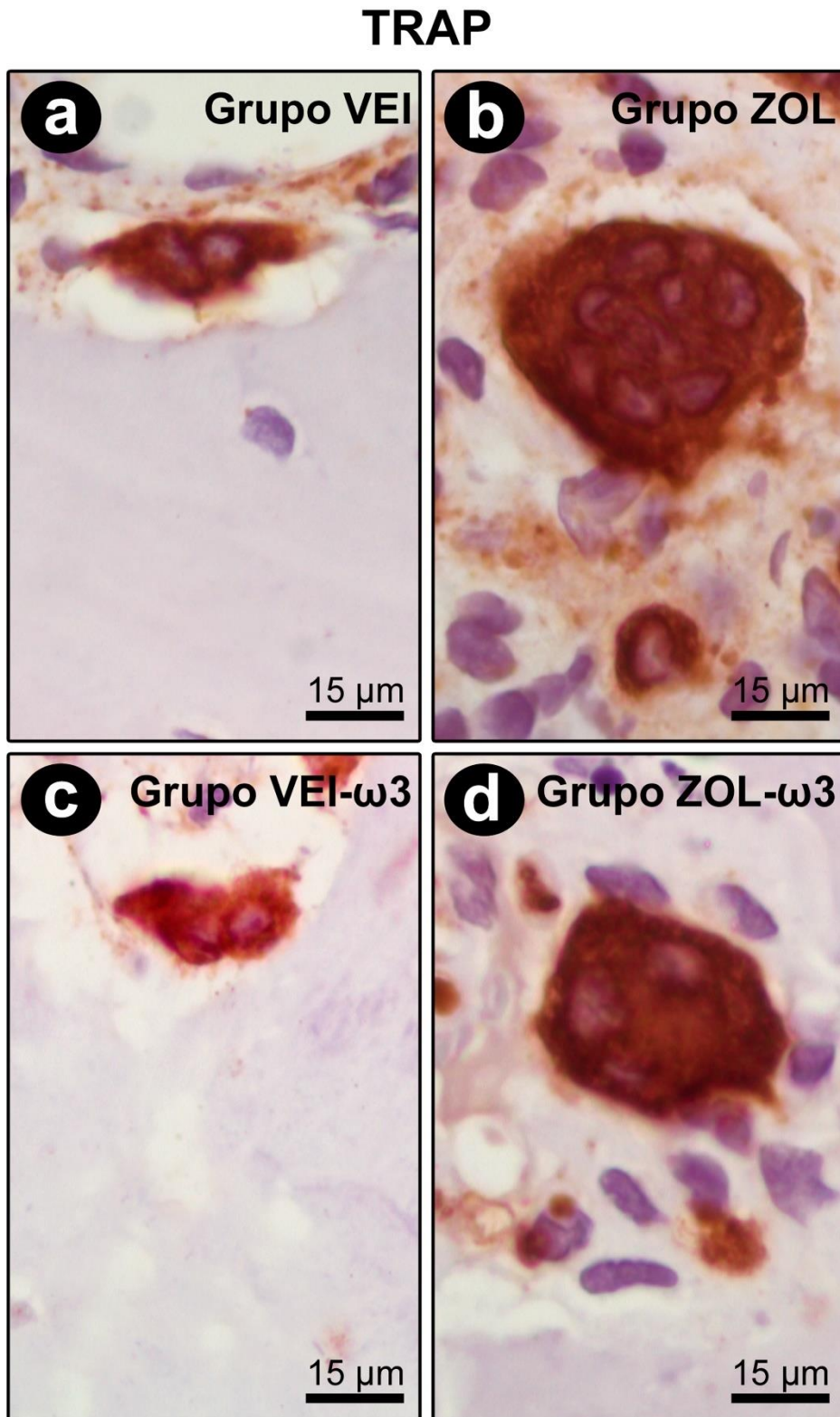


**Figura 11:** Imunomarcacão para OCN no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcacão para OCN no sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloracão: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 30 $\mu$ m. Fonte: Autor, 2023.



**Figura 12:** Imunomarcção para VEGF no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para VEGF no sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3

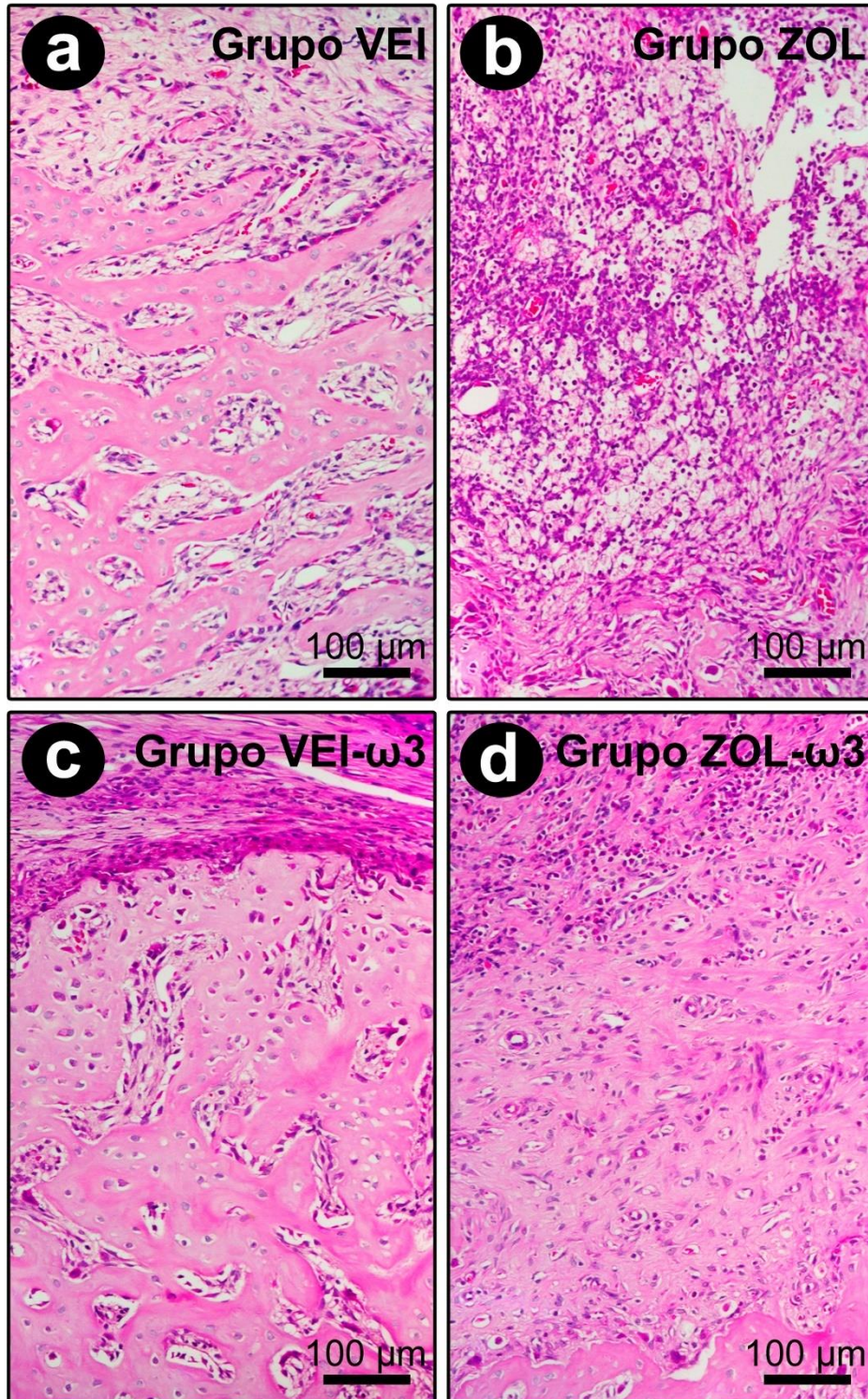
(d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 30µm. Fonte: Autor, 2023.



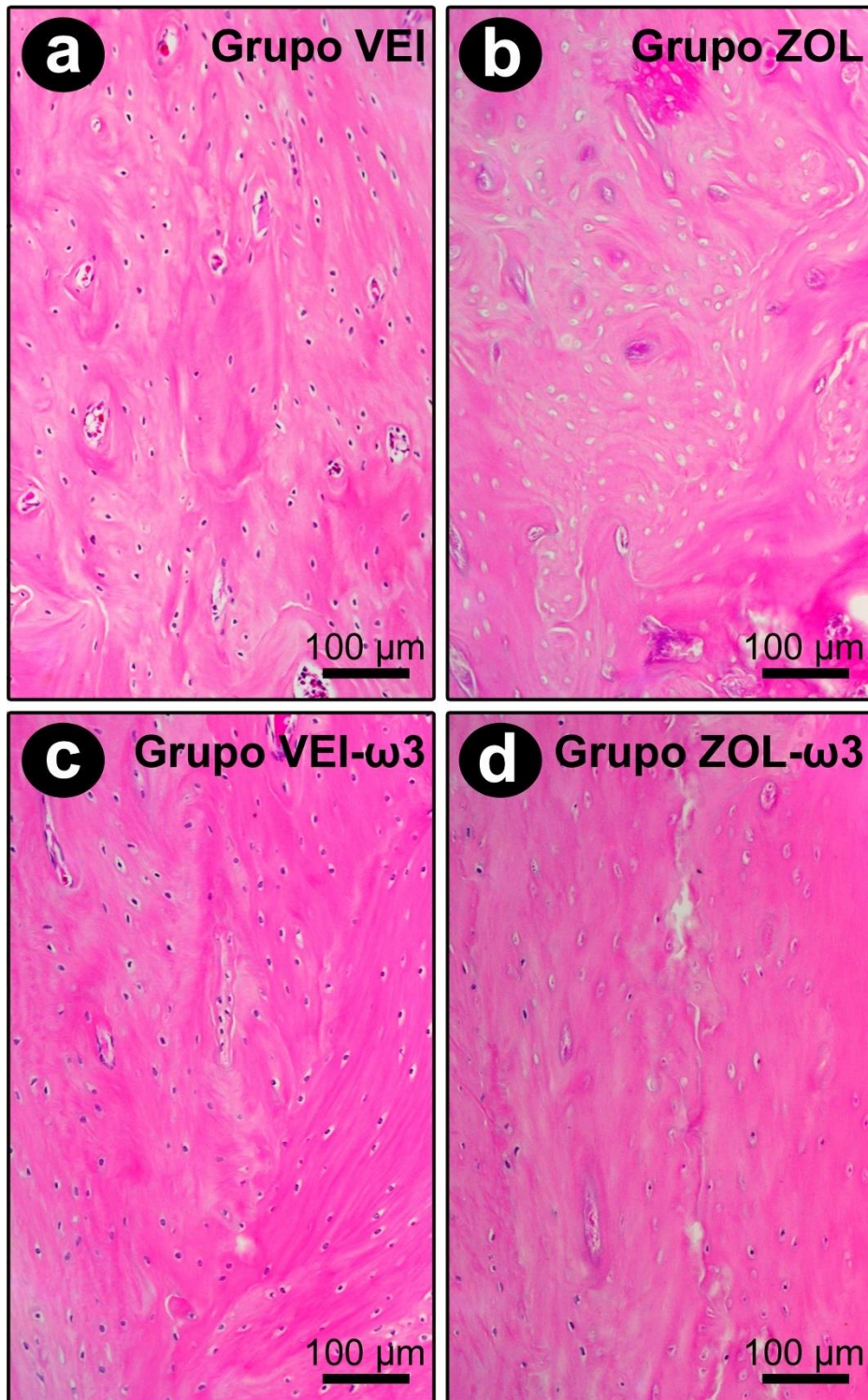
**Figura 13:** Imunomarcção para TRAP no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para TRAP no

sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 15 $\mu$ m. Fonte: Autor, 2023.

## TONF



**Figura 14:** Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando as características histológicas do(s) tecido(s) que preenche(m) o interior dos alvéolos dentais aos 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 $\mu$ m. Fonte: Autor, 2023.

**TONV**

**Figura 15:** Aspecto histológico do tecido ósseo imediatamente adjacente ao sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando as características histológicas do tecido ósseo nas imediações do alvéolo dental aos 35 dias pós-

operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 $\mu$ m. Fonte: Autor, 2023.

## 4 DISCUSSÃO

Foram utilizadas 60 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) ovariectomizadas, resultando com baixos níveis de estrógeno, confirmado o ciclo de diestro. A ONM-BPs acomete com maior frequência o gênero feminino (73%), com idade avançada (pós-menopausa) (OTTO *et al.*, 2011). O nosso estudo foi composto por quatro grupos: VEI, VEI/ $\omega$ 3; ZOL e ZOL/ $\omega$ 3. A PE e a exodontia foram realizadas no primeiro molar inferior esquerdo. Estudos clínicos têm mostrado que exodontia de dentes com comprometimento periodontal e/ou periapical é o principal fator de risco local para a ONM-BPs. A ONM-BPs ocorre com maior frequência na mandíbula, especificamente na região dos pré-molares e molares (KANG *et al.*, 2013; RUGGIERO *et al.*, 2014; OTTO *et al.*, 2011).

A administração de  $\omega$ 3 foi via gavagem gástrica visto que o EPA e o DHA são sintetizados em quantidades mínimas pelo organismo, sendo a sua suplementação dietética extremamente importante (CALDER, 2009; DAWSON *et al.*, 2014; MEYER *et al.*, 2003; YATES; CALDER; ED RAINGER, 2014). O ZOL e o VEI foram administrados nos animais via intraperitoneal. Em pacientes que fazem o uso do ZOL pela via intravenosa, ou sua associação com outros BPs, prescritos para complementação da terapia oncológica, a incidência da ONM-BPs atinge de 01 a 12% dos pacientes e, como os BPs têm efeito cumulativo, esta incidência pode atingir 21% dos pacientes após o terceiro ano de uso deste tipo de fármaco. A adesão a outros BPs pela via oral é deficiente (GÓMEZ FONT; MARTÍNEZ GARCÍA; OLMOS MARTÍNEZ, 2008).

Os BPs são utilizados em muitas especialidades da área da saúde para a prevenção de metástase óssea, hipercalcemia e dor óssea em neoplasias malignas osteotrópicas (DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008). O ZOL tem se destacado e atua inibindo a osteoclastogênese. (DUNFORD *et al.*, 2001). Na odontologia, a ONM-BPs é uma condição relativamente rotineira e merece destaque, estudos clínicos têm mostrado que a exodontia de dentes com comprometimento periodontal e/ou periapical é o principal fator de risco local para a ONM-BPs (presença de micro-organismos no sítio de extração dental) (KANG *et al.*, 2013; RUGGIERO *et al.*, 2014; BOFF *et al.*, 2014). O  $\omega$ 3 é uma opção de TMH devido a sua ação anti-inflamatória. Ele atua produzindo resolvinas e lipoxinas que inativam as vias COX e LOX e seus subprodutos, como o TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-1 $\beta$ , PGE2 e LTB4, comprometendo várias vias de sinalização celular, como o RANK/RANKL/OPG e inibindo o crescimento de

microrganismos (ação antimicrobiana) (BAGGA *et al.*, 2003; CALDER, 2006; KELLEY *et al.*, 1998; PETERSON *et al.*, 1998; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998; BOFF *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, a análise semiquantitativa foi feita com um software de análise de imagem (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss) para a imunomarcação de TRAP, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , VEGF e OCN em mm<sup>2</sup>. As proteínas que tiveram diferença estatisticamente significativa foram: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . No estudo de Rees *et al.* (2006) foi identificado que uma ingestão de EPA de 1,35 g/dia por 03 meses não foi suficiente para diminuir produção de PGE2 por células mononucleares estimuladas por LPS, enquanto a ingestão de EPA de 2,7 g/dia diminuiu significativamente a produção de PGE2 e outras citocinas pró-inflamatórias. Isso sugere que a ingestão de EPA deve ser em torno de 1,35 a 2,7 g/dia para um efeito anti-inflamatório desejável.

Neste estudo, foi verificado que o grupo ZOL apresentou uma maior imunomarcação para TRAP, quando comparado aos demais grupos. No grupo ZOL/ $\omega$ 3, a imunomarcação dessa proteína pró-inflamatória foi menor, quando comparado ao grupo ZOL. Já no grupo VEI e VEI/ $\omega$ 3 não houve diferença estatisticamente significativa, quando comparados entre si. Este resultado sugere que, com a adesão da suplementação com  $\omega$ 3 (grupo ZOL/ $\omega$ 3), a inflamação ocorre de forma menos intensa, quando comparado ao grupo ZOL isolado. A literatura aponta que a suplementação de EPA e DHA resulta em um aumento do conteúdo de EPA e DHA nos fosfolipídios de células envolvidas na inflamação. Esse processo ocorre de forma temporal e dose-dependente. A incorporação do EPA e DHA ocorre em parte devido a presença do AA, dessa forma não há substrato suficiente para a produção de eicosanóides (YAQOUB *et al.*, 2000; HEALY *et al.*, 2000; REES *et al.*, 2006; BROWNING *et al.*, 2012; WALKER *et al.*, 2015).

O grupo ZOL apresentou uma maior imunomarcação para IL-1 $\beta$ , quando comparado aos demais grupos. No grupo ZOL/ $\omega$ 3, a imunomarcação dessa proteína pró-inflamatória foi menor, quando comparado ao grupo ZOL somente. Já nos grupos VEI e VEI/ $\omega$ 3 não houve diferença estatisticamente significativa, quando comparados entre si. Sendo assim, o EPA e o DHA (grupo ZOL/ $\omega$ 3), quando administrados via gavagem gástrica, resultam em um menor padrão de inflamação, comparando ao grupo ZOL isolado. De acordo com Kang (2014) o  $\omega$ 3 apresenta atividade anti-inflamatória e protetora dos tecidos. Acredita-se que o efeito anti-inflamatório do  $\omega$ 3 ocorre não apenas por competir com a formação de eicosanóides (vias COX e LOX) do AA, mas também por fornecer metabólitos alternativos com atividade menos

potente do que a dos mediadores derivados do AA. Portanto, há uma redução de mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo, TNF- $\alpha$  e IL-6 (SCHMITZ; ECKER, 2008; BAGGA *et al.*, 2003; TERANO; SALMON; MONCADA, 1984; CALDER 2007).

Além disso, o uso de PUFAs libera uma série de mediadores bioativos pró-resolutivos especializados como as resolvinas da série E (RvE1 – E3), resolvinas da série D (RvD1 – D6), protectinas (PD1 e PDX), maresinas (MaR1 e MaR2), conjugados de resolvina para regeneração de tecidos (RvTR1, RvTR2 e RvTR3), conjugados de protectina na regeneração de tecidos (PCTR1, PCTR2 e PCTR3) e conjugados de maresina na regeneração tecidual (MCTR1, MCTR2 e MCTR3) (SERHAN; LEVY, 2018; KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2018). O  $\omega$ 3 e seus mediadores pró-resolutivos (RvE1 – E3, MaR1, MaR2, PD1, PDX e RvD1 – D6) são potenciais candidatos para novas terapêuticas, com o intuito de promover a saúde e a homeostasia tecidual (ISOBE; ARITA, 2014; SERHAN, 2017). Hong *et al.* (2003) observaram que a síntese de Rv é aumentada ao alimentar roedores de laboratório com uma dieta rica em EPA e DHA. As RvE1, RvD1 e PD1 inibem a migração transendotelial de neutrófilos, evitando assim a infiltração de neutrófilos em locais de inflamação. A RvD1 inibe a produção de IL-1 $\beta$  e a PD1 inibe a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1, diminuindo assim a inflamação (BANNENBERG; SERHAN, 2010; SERHAN; VAN DYKE; CHIANG, 2008; HONG *et al.*, 2003).

De um modo geral, a adesão da suplementação com  $\omega$ 3 (grupo ZOL/ $\omega$ 3), diminuiu a severidade do processo inflamatório, quando comparado ao grupo ZOL de forma única. A literatura aponta que AA juntamente com o oxigênio molecular, através da COX, LOX e citocromo P450 resultam na formação de moléculas pró-inflamatórias, sendo as prostaglandinas (PG), os leucotrienos (LT) e os tramboxanos (TX) (CALDER, 2020; CHRISTIE; HARWOOD, 2020). O EPA é substrato para COX, LOX e citocromo P450 resultando na produção de eicosanóides derivados do EPA. Contudo, a estrutura desses eicosanóides é diferente daqueles derivados do AA. Os eicosanóides derivados do EPA são biologicamente menos potentes. Assim, o EPA geralmente resulta na diminuição da produção de eicosanóides potentes de AA e no aumento da produção de eicosanóides fracos de EPA (CALDER, 2015; WADA *et al.*, 2007).

Além disso, os efeitos benéficos do  $\omega$ 3 obtidos em nosso estudo, frente a menor imunomarcagem de TRAP e IL-1 $\beta$  também podem ser explicados pelo fato de que o DHA e o EPA tornam as membranas celulares mais fluidas, afetando o comportamento de várias

proteínas de membrana – jangadas lipídicas – com a redução da transmissão de LPS ou ácidos graxos saturados para dentro da célula. Com isso, a ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios como NF- $\kappa$ B é reduzida, diminuindo a expressão de citocinas, quimiocinas, agentes de adesão molecular e enzimas inflamatórias.

O EPA e o DHA podem atuar como ligantes e ativadores de fatores de transcrição anti-inflamatórios, como os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma, além de atuarem como substratos para a síntese de eicosanóides e mediadores lipídicos docosanóides. Os eicosanóides formados a partir do EPA, como a PGE3 e LTB5 geralmente apresentam pró-inflamatória fraca (CALDER, 2015; CALDER, 2020). As evidências até o momento indicam que o fornecimento de DHA e EPA por meio de cápsulas, nutrição oral, suplementos ou fórmulas enterais ou parenterais podem ajudar a regular o ambiente inflamatório (CHEN *et al.*, 2017).

Em relação a análise histométrica de TONV, o grupo ZOL foi o que expressou maior imunomarcação, quando comparado aos demais grupos. Na análise histométrica, a área total de TONV foi menor no grupo ZOL/ $\omega$ 3, quando comparado ao grupo ZOL isolado. Nos grupos VEI e VEI/ $\omega$ 3 não houve diferença estatisticamente significativa. Tal resultado sugere que a suplementação de  $\omega$ 3 (grupo ZOL/ $\omega$ 3) atua de forma benéfica frente a área total de TONV, ou seja, diminuindo tal condição.

Contudo, o  $\omega$ 3 demonstrou diminuir a inflamação exacerbada e danos ao tecido ósseo (BHATTACHARYA *et al.*, 2007; NAKANISHI; ITSUKA; TSUKAMOT, 2013; SAKAGUCHI; MORITA; MUROTA, 1994; SUN *et al.*, 2008). Nakanishi; Itsuka; Tsukamot (2013) observaram em seu estudo que uma dieta composta em 05% de óleo de peixe suprimiu a atividade osteoclástica e a grande expressão de NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6 e RANKL, diminuindo assim, a inflamação crônica e os danos irreversíveis ao tecido ósseo.

## **5 CONCLUSÃO**

A suplementação com  $\omega 3$ , via gavagem gástrica, não preveniu a ocorrência da ONM-BPs. Entretanto, reduziu a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e área total de TONV, diminuindo assim, severidade dessa condição. Contudo, a suplementação com  $\omega 3$  parece ser benéfica para os pacientes que utilizam o ZOL.

## REFERÊNCIAS

1. Abe K, Yoshimura Y, Deyama Y, Kikuri T, Hasegawa T, Tei K, et al. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med*. 2012;29(6):1007-15. doi: 10.3892/ijmm.2012.952.
2. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(5 Suppl):61-70. doi: 10.1016/j.joms.2009.01.007.
3. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol*. 2008;79(11):2156-65. doi: 10.1902/jop.2008.080103.
4. Azuma MM, Cardoso CBM, Samuel RO, Pipa CB, Bomfim SRM, Narciso LG, et al. Omega-3 fatty acids alter systemic inflammatory mediators caused by apical periodontitis. *J Endod*. 2021;47(2):272-7. doi: 10.1016/j.joen.2020.11.015.
5. Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Hernandez S, Poveda R, Sanchis JM, et al. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncol*. 2006;42(3):327-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.08.001.
6. Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):1751-6. doi: 10.1073/pnas.0334211100.
7. Bannenberg G, Serhan CN. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(12):1260-73. doi: 10.1016/j.bbailip.2010.08.002.
8. Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, Dimopoulos MA, Bordoni R, George S, et al. Long-term pamidronate treatment of advanced multiple myeloma patients reduces skeletal events. Myeloma Aredia Study Group. *J Clin Oncol*. 1998;16(2):593-602. doi: 10.1200/JCO.1998.16.2.593.
9. Bhatavadekar NB, Williams RC. New directions in host modulation for the management of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2009;36(2):124-6. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01354.x.

10. Bhattacharya A, Rahman M, Sun D, Fernandes G. Effect of fish oil on bone mineral density in aging C57BL/6 female mice. *J Nutr Biochem*. 2007;18(6):372-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.07.002.
11. Boff RC, Salum FG, Figueiredo MA, Cherubini K. Important aspects regarding the role of microorganisms in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Arch Oral Biol*. 2014;59(8):790-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.002.
12. Browning LM, Walker CG, Mander AP, West AL, Madden J, Gambell JM, et al. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(4):748-58. doi: 10.3945/ajcn.112.041343.
13. Calder PC. Eicosanoids. *Essays Biochem*. 2020;64(3):423-41. doi: 10.1042/EBC20190083.
14. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):469-84. doi: 10.1016/j.bbaliip.2014.08.010.
15. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6 Suppl):1505S-1519S. doi: 10.1093/ajcn/83.6.1505S.
16. Calder PC. n-3 PUFA and inflammation: from membrane to nucleus and from bench to bedside. *Proc Nutr Soc*. 2020:1-13. doi: 10.1017/S0029665120007077.
17. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*. 2009;91(6):791-5. doi: 10.1016/j.biochi.2009.01.008.
18. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017;9(6):7204-18. doi: 10.18632/oncotarget.23208.
19. Christie WW, Harwood JL. Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators. *Essays Biochem*. 2020;64(3):401-21. doi: 10.1042/EBC20190082.
20. Coxon FP, Rogers MJ. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int*. 2003;72(1):80-4. doi: 10.1007/s00223-002-2017-2.
21. Dawson DR 3rd, Branch-Mays G, Gonzalez OA, Ebersole JL. Dietary modulation of the inflammatory cascade. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):161-97. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00458.x.

22. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(9):1032-45. doi: 10.4065/83.9.1032.
23. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;296(2):235-42.
24. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone.* 2019; 120:101-13. doi: 10.1016/j.bone.2018.10.014.
25. Gusman DJR, Ervolino E, Theodoro LH, Garcia VG, Nagata MJH, Alves BES, et al. Antineoplastic agents exacerbate periodontal inflammation and aggravate experimental periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2019;46(4):457-69. doi: 10.1111/jcpe.13101.
26. Healy DA, Wallace FA, Miles EA, Calder PC, Newsholm P. Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids.* 2000;35(7):763-8. doi: 10.1007/s11745-000-0583-1.
27. nHong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem.* 2003;278(17):14677-87. doi: 10.1074/jbc.M300218200.
28. Isobe Y, Arita M. Identification of novel omega-3 fatty acid-derived bioactive metabolites based on a targeted lipidomics approach. *J Clin Biochem Nutr.* 2014;55(2):79-84. doi: 10.3164/jcbn.14-18.
29. Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res.* 1975;10(6):332-45. doi: 10.1111/j.1600-0765.1975.tb00042.x.
30. Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Atti E, Dry SM, et al. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res.* 2013;28(7):1631-40. doi: 10.1002/jbmr.1894.
31. Kang JX. Fat-1 transgenic mice: a new model for omega-3 research. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007;77(5-6):263-7. doi: 10.1016/j.plefa.2007.10.010.

32. Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, Mackey BE. Arachidonic acid supplementation enhances synthesis of eicosanoids without suppressing immune functions in young healthy men. *Lipids*. 1998;33(2):125-30. doi: 10.1007/s11745-998-0187-9.
33. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8(6):e1000412. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412.
34. Krishnamoorthy N, Abdunour RE, Walker KH, Engstrom BD, Levy BD. Specialized Proresolving Mediators in Innate and Adaptive Immune Responses in Airway Diseases. *Physiol Rev.*;98(3):1335-70. doi: 10.1152/physrev.00026.2017.
35. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res*. 1998;13(4):581-9. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.4.581.
36. Luize DS, Bosco AF, Bonfante S, Almeida JM. Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23(2):207-14.
37. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002;62(4A):609-14. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008.
38. Martelli SJR, Damian MF, Gomes APN, Schinestsck AR, Silva AER, Vasconcelos ACU. Comparison of effects of zoledronic acid and clodronate on the bone structure: imaginological and histomorphometrical study in vivo. *J Oral Pathol Med*. 2017;46(8):632-636. doi: 10.1111/jop.12546.
39. Meyer BJ, Mann NJ, Lewis JL, Milligan GC, Sinclair AJ, Howe PR. Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*. 2003;38(4):391-8. doi: 10.1007/s11745-003-1074-0.
40. Migliorati CA, Epstein JB, Abt E, Berenson JR. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates in cancer: a narrative review. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(1):34-42. doi: 10.1038/nrendo.2010.195.
41. Nakanishi A, Iitsuka N, Tsukamoto I. Fish oil suppresses bone resorption by inhibiting osteoclastogenesis through decreased expression of M-CSF, PU.1, MITF and RANK in ovariectomized rats. *Mol Med Rep*. 2013;7(6):1896-903. doi: 10.3892/mmr.2013.1446.

42. Ory S, Brazier H, Pawlak G, Blangy A. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *Eur J Cell Biol.* 2008;87(8-9):469-77. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.03.002.
43. Otto S, Sotlar K, Ehrenfeld M, Pautke C. Osteonecrosis of the jaw as a possible rare side effect of annual bisphosphonate administration for osteoporosis: a case report. *J Med Case Rep.* 2011; 5:477. doi: 10.1186/1752-1947-5-477.
44. Peterson LD, Jeffery NM, Thies F, Sanderson P, Newsholme EA, Calder PC. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. *Lipids.* 1998;33(2):171-80. doi: 10.1007/s11745-998-0193-y.
45. Pires FR, Miranda A, Cardoso ES, Cardoso AS, Fregnani ER, Pereira CM, et al. Oral avascular bone necrosis associated with chemotherapy and bisphosphonate therapy. *Oral Dis.* 2005;11(6):365-9. doi: 10.1111/j.1601-0825.2005.01130.x.
46. Rahman MM, Bhattacharya A, Fernandes G. Docosahexaenoic acid is more potent inhibitor of osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells than eicosapentaenoic acid. *J Cell Physiol.* 2008;214(1):201-9. doi: 10.1002/jcp.21188.
47. Rees D, Miles EA, Banerjee T, Wells SJ, Roynette CE, Wahle KW, et al. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2):331-42. doi: 10.1093/ajcn/83.2.331.
48. Ribeiro-Vidal H, Sánchez MC, Alonso-Español A, Figuero E, Ciudad MJ, Collado L, et al. Antimicrobial activity of EPA and DHA against oral pathogenic bacteria using an in vitro multi-species subgingival biofilm model. *Nutrients.* 2020;12(9):2812. doi: 10.3390/nu12092812.
49. Sakaguchi K, Morita I, Murota S. Eicosapentaenoic acid inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1994;50(2):81-4. doi: 10.1016/0952-3278(94)90151-1.
50. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:108-29. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00785. x.
51. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2008;47(2):147-55. doi: 10.1016/j.plipres.2007.12.004.

52. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):349-61. doi: 10.1038/nri2294.
53. Serhan CN, Chiang N. Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(4):632-40. doi: 10.1016/j.coph.2013.05.012.
54. Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J Clin Invest*. 2018;128(7):2657-69. doi: 10.1172/JCI97943.
55. Serhan CN. Discovery of specialized pro-resolving mediators marks the dawn of resolution physiology and pharmacology. *Mol Aspects Med*. 2017; 58:1-11. doi: 10.1016/j.mam.2017.03.001.
56. Shannon J, Shannon J, Modelevsky S, Grippo AA. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *J Am Geriatr Soc*. 2011;59(12):2350-5. doi: 10.1111/j.1532-5415.2011.03713.x.
57. Siddiqi A, Payne AG, Zafar S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a medical enigma? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Sep;108(3): e1-8. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.04.027.
58. Silva PG, Ferreira Junior AE, Teófilo CR, Barbosa MC, Lima Júnior RC, Sousa FB, et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Arch Oral Biol*. 2015;60(9):1237-45. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.05.015.
59. Sun D, Krishnan A, Zaman K, Lawrence R, Bhattacharya A, Fernandes G. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res*. 2003;18(7):1206-16. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.7.1206.
60. Terano T, Salmon JA, Moncada S. Effect of orally administered eicosapentaenoic acid (EPA) on the formation of leukotriene B<sub>4</sub> and leukotriene B<sub>5</sub> by rat leukocytes. *Biochem Pharmacol*. 1984;33(19):3071-6. doi: 10.1016/0006-2952(84)90611-7.
61. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998; 38:97-120. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97.
62. Wada M, DeLong CJ, Hong YH, Rieke CJ, Song I, Sidhu RS, et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem*. 2007;282(31):22254-66. doi: 10.1074/jbc.M703169200.

63. Walker CG, West AL, Browning LM, Madden J, Gambell JM, Jebb SA, et al. The pattern of fatty acids displaced by EPA and DHA following 12 months supplementation varies between blood cell and plasma fractions. *Nutrients*. 2015;7(8):6281-93. doi: 10.3390/nu7085285.
64. Williams RC. Host modulation for the treatment of periodontal disease. *Compend Contin Educ Dent*. 2008;29(3):160-8.
65. Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med*. 2006;144(10):753-61. doi: 10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00009.
66. Yaqoob P, Pala HS, Cortina-Borja M, Newsholme EA, Calder PC. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur J Clin Invest*. 2000;30(3):260-74. doi: 10.1046/j.1365-2362.2000.00623.x.
67. Yates CM, Calder PC, Ed Rainger G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol Ther*. 2014;141(3):272-82. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.10.010.

## ANEXOS

### ANEXO A – Comitê de Ética



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 de Pesquisa intitulado **“Avaliação da suplementação com ômega-3 como terapia preventiva à ocorrência osteonecrose dos maxilares associada ao uso de zoledronato”**, Processo FOA nº 0299-2021, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Junho de 2021.

**VALIDADE DESTES CERTIFICADO:** 03 de Junho de 2024.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 03 de Julho de 2024.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **“Evaluation of omega-3 supplementation as a preventive therapy to the occurrence osteonecrosis of the jaws associated with the use of zoledronate”**, Protocol FOA nº 0299-2021, under the supervision of Juliano Milanezi de Almeida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 24, 2021.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** June 03, 2024.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** July 03, 2024.

**Prof. Associado João Carlos Callera**  
Coordenador da CEUA  
CEUA 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