



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

MARIA EDUARDA DE FREITAS SANTANA OLIVEIRA

**EFEITO DE DIFERENTES TERAPIAS LOCAIS NA PREVENÇÃO DA
OSTEONECROSE DOS MAXILARES EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS. ESTUDO *IN VIVO***

**ARAÇATUBA - SP
2024**



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

MARIA EDUARDA DE FREITAS SANTANA OLIVEIRA

**EFEITO DE DIFERENTES TERAPIAS LOCAIS NA PREVENÇÃO DA
OSTEONECROSE DOS MAXILARES EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS. ESTUDO *IN VIVO***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (Unesp), para obtenção do Título de Mestre em Odontologia (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial).

Orientador: Prof. Dr. Francisley Ávila Souza

**ARAÇATUBA - SP
2024**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

O48e

Oliveira, Maria Eduarda de Freitas Santana.

Efeito de diferentes terapias locais na prevenção da
osteonecrose dos maxilares em ratas ovariectomizadas :
estudo in vivo / Maria Eduarda de Freitas Santana Oliveira. -
Araçatuba, 2024

50 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Francisley Ávila Souza

1. Osteoporose 2. Osteonecrose 3. Ovariectomia 4. Di-
fosfonatos 5. Alvéolo dental I. T.

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

*Dedico este trabalho a minha mãe, **Elisângela de Freitas Santana**, que entendeu minha ausência minha durante a execução deste trabalho e esteve ao meu lado me apoiando e incentivando em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Á **Deus**, por sempre estar presente em minha vida, guiando meus passos e me presenteando com inúmeras bênçãos. Obrigada por acalmar meu coração nos períodos de tempestade, por ouvir minhas preces e renovar a cada dia minha esperança e minha fé para continuar lutando por meus objetivos. Tenho certeza que sem Sua benção nada disso seria possível!

Aos meus avôs maternos, **Euclides Rodrigues Santana** e **Arlete de Freitas Santana**, por toda a base que sempre me deram, o que sempre me motivou a ir mais longe, a vocês tenho gratidão eterna e todo amor do mundo, sem vocês como alicerce eu não seria nada. Obrigado por tudo.

A minha mãe, **Elisângela de Freitas Santana**, os meus mais sinceros agradecimentos. Eu nunca terei palavras suficientes para agradecer todo o zelo em minha educação e todo o amor a qual fui criada. Mãe, a senhora é a mulher mais forte e determinada que eu conheço, sou muito honrada em ser sua filha. Obrigada por acreditar em mim e nos meus sonhos. Só cheguei até aqui por vocês e farei minha parte para ir mais além, para honrar todo o esforço dedicado a mim! Agradeço também ao **André Henrique** pelo apoio e amor dedicado a senhora!

A minha irmã, **Maria Gabriela de Freitas Santana Miranda**, obrigada por sempre estar ao meu lado, até brigando as vezes, sem você com certeza minha vida não seria completa, te amo. Obrigada por me presentear com meus sobrinhos que tanto amo, **Luna e Eliseu**, eles são presentes de Deus em nossas vidas.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Francisley Ávila Souza**, obrigada por me acolher em seu grupo de pesquisa. Que sorte a minha de ter como meu orientador, obrigada pelo companheirismo, confiança e carinho para comigo. Obrigada pela paciência, por todos os conhecimentos compartilhados, por ser um exemplo de pessoa e profissional. Te admiro imensamente e tenho muito respeito pelo senhor.

Ao **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior**, obrigada por todos os ensinamentos acadêmicos, clínicos e hospitalares. O senhor é um exemplo de dedicação, responsabilidade e competência. Expresso aqui minha gratidão por poder aprender com o senhor.

Ao **Prof. Dr. André Luis da Silva Fabris**, agradeço pela paciência e apoio no meu desenvolvimento científico e clínico. Agradeço imensamente por cada oportunidade que me proporcionou, por cada conselho e pelo carinho. Você é muito especial para mim.

A **Profa. Dra. Roberta Okamoto**, sou grata por todo auxílio na elaboração deste trabalho, pelo carinho e atenção que sempre dispõe, pela senhora tenho muita admiração e respeito. A senhora é uma pesquisadora incrível!

Aos professores **Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Profa. Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Profa. Dra. Daniela Ponzoni, Profa. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi e Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani**, que diretamente ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento da minha formação, agradeço pelo carinho, atenção, amizade e convívio. Sou imensamente grata pela oportunidade de aprender com vocês.

A **Profa. Dra. Luciana Estevam Simonato**, não tenho palavras para expressar o quão grata sou! Foi minha professora, mãe e amiga. Um exemplo de ética, seriedade e docência. Obrigada ter me dado a oportunidade de te conhecer e aprender com você. Te admiro e respeito. Quem me derá um dia ser um pouquinho como você. Muito obrigada por tudo!

Aos **Prof. Dr. Fábio Roberto Batista de Souza**, agradeço por cada conselho que já me deu, desde antes do mestrado. Sem dúvidas, você é uma das inspirações para que eu chegasse até aqui.

A **Luana Ferreira Oliveira e Caroline Liberato Marchioli**, pelo trabalho desenvolvido durante a graduação e por permanecerem em minha rotina no mestrado. Agradeço pela contribuição em minha pesquisa e pela troca clínica e hospitalar. Agradeço pelos inúmeros momentos de risadas, choros e conselhos. Agradeço pelo amparo que sempre encontro em vocês. Nos entendemos! Torço genuinamente pelo sucesso e felicidade de vocês! Seguiremos juntas!

Ao **Henrique Hadad** por tornar meus dias na pós-graduação mais leves e felizes. Nossas tardes de muito trabalho e cafés serão guardadas na minha memória com muito carinho. Hoje posso dizer que você é meu amigo, professor e conselheiro. Vou sentir muita saudade da nossa convivência diária, nossas festinhas e encontros no Bola 7. Obrigada por tudo!

A **Laís Kawamata de Jesus** sou imensamente grata por sua amizade, durante todas as dificuldades você estava do meu lado me dando incentivo e ensinando. Obrigada por todos os

conselhos e apoio, por aguentar meus momentos de desespero (que foram muitos) e sempre me dizer que tudo daria certo no final. Obrigada por tudo!

A **Maísa Pereira da Silva** por ter me acolhido desde o momento em que entrei na pós-graduação. Agradeço pela sua ajuda e dedicação no desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada pelos momentos em que compartilhamos risadas, conversas e conhecimento. Obrigada por tudo!

Ao **Harrisson Lucho Mamani Valeriano** que se tornou meu grande amigo. Obrigada por estar ao meu lado na reta final do mestrado, dando suporte e me acalmando. Te desejo muito sucesso! Vou sentir saudades.

A **Letícia Gabriela Rodrigues**, nossa caçula, só tenho a te agradecer, por sempre me ajudar, ser companheira e amiga. Trabalhar com você tem feito nossos dias leves e divertidos. Tenho muito orgulho da sua evolução dentro do grupo de pesquisa e da pós-graduação.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa **Ana Flávia Piqueira Santos** e **Paulo Matheus Honda Tavares**, agradeço pela ajuda de vocês em cada etapa do desenvolvimento desta pesquisa. Muito obrigada.

Aos meus colegas da pós-graduação **Izabela Zol**, **Nathália Santos Sanches**, **Paula Buzo Frigério**, **Laura Vidotto Paludetto**, **Vinícius Ganzaroli**, **Murilo Carvalho**, **Nathália Duarte** e **Monique Costa Gonçalves** muito obrigada pelo companheirismo e pela troca de experiência, é muito enriquecedor dividir a minha formação com pessoas tão especiais. Em especial, meus agradecimentos a Naty por me ensinar como realizar o ciclo estral e a ovariectomia.

Aos alunos de iniciação científica, **Luís Fernando Alves**, **Kézia Barbosa**, **Lilian Matos**, **Júlia Bão**, **Maria Fernanda Bessi**, **Beatriz Costa**, **Beatriz Medeiros**, **Anna Luisa Perri**, **Ana Laura Galvão** e **Brittnie Johnson**, pela seriedade e comprometimento com as pesquisas. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba** – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho (FOA / UNESP)” na pessoa do atual diretor Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na pessoa do atual Coordenador Prof. Ass. Wirley Gonçalves Assunção.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** –Código de Financiamento 001, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Aos funcionários da FOA/UNESP, em especial **Renato, Marco, Paulo Cristiane e Elis** obrigada pela paciência de nos ensinar e auxiliar nos processos acadêmicos.

Ao **Sr. João** por ser sempre solícito a nos ajudar com os animais e a pesquisa.

Aos animais que serviram com suas vidas à ciência, possibilitando a execução dessa pesquisa.

Epígrafe

*“Eu te desejo a paz de uma andorinha
No voo perfeito, contemplando o mar
E que a fé movedora de qualquer montanha
Te renove sempre, te faça sonhar”*

(Flávia Wanceslau, Te desejo)

Oliveira MEFS. Efeito de diferentes terapias locais na prevenção da osteonecrose dos maxilares em ratas ovariectomizadas: estudo *in vivo* [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2024.

RESUMO

O objetivo deste projeto foi avaliar o efeito do óleo ozonizado, do β -TCP, da doxíciclina e da aPDT como prevenção da OMIM após exodontia do primeiro molar inferior direito de ratas ovariectomizadas tratadas com ácido zolendrônico. Foram utilizadas 56 ratas Wistar adultas ovariectomizadas, as quais foram tratadas com 36 aplicações de 0,066 mg/kg de ácido zoledrônico (ZOL) por via intraperitoneal durante 12 semanas, seguido da exodontia de seus molares inferiores direitos. Imediatamente após a exodontia, os animais receberam terapias locais no alvéolo dentário. Os animais foram divididos em sete grupos (n=8) de acordo com as terapias estabelecidas: Sal (não foi aplicado ZOL) e não recebeu terapia; OVX-S (Soro Fisiológico – não foi aplicado ZOL) e não recebeu terapia; OVX-Z (Ácido Zoledrônico – foi aplicado ZOL) e não recebeu terapia; GO (Óleo Ozonizado), os animais receberam uma aplicação local de óleo ozonizado; GB (β -Tricálcio Fosfato) os animais foram tratados com o preenchimento do alvéolo pelo biomaterial em pasta; GP (aPDT) os animais foram tratados com terapia fotodinâmica antimicrobiana; GD (Doxiciclina) os animais foram tratados com o preenchimento do alvéolo por gel de doxíciclina a 10%. Aos 28 dias após a exodontia os animais foram eutanasiados para a avaliação através: 1) análise clínica, 2) análise microtomográfica e 3) análise histológica. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística com $p < 0,05$. A avaliação clínica demonstrou cicatrização normal dos tecidos moles nos animais do Grupo Doxíciclina e Grupo Ozônio. Houve ainda, presença de osso exposto/necrótico principalmente no grupo OVX-Z. A análise microtomográfica mostrou diferenças estatísticas entre os grupos nos parâmetros de BV ($p < 0,001$), Tb.N ($p < 0,001$) e Tb.Sp ($p = 0,004$). Enquanto que nos parâmetros de BV/TV ($p = 0,207$), Tb.Th ($p = 0,091$) e Po.tot ($p = 0,091$) não foram observadas diferenças estatísticas. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o ácido zoledrônico induziu a OMIM, prejudicando o processo de reparo alveolar após a exodontia. As terapias locais foram capazes de estimular o processo de reparo alveolar, principalmente quando aplicado os tratamentos com gel de doxíciclina 10% e óleo ozonizado, minimizando as consequências do ácido zoledrônico.

Palavra-chave: Osteoporose. Osteonecrose. Ovariectomia. Bifosfonatos. Alvéolo Dental.

Oliveira MEFS. Effect of different local therapies on the prevention of osteonecrosis of the jaw in ovariectomized rats: in vivo study [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2024.

ABSTRACT

The objective of this project was to evaluate the effect of ozonized oil, β -TCP, doxycycline and aPDT as prevention of OMIM after extraction of the right lower first molar in ovariectomized rats treated with zoledronic acid. Fifty-six ovariectomized adult Wistar rats were used, which were treated with 36 applications of 0.066 mg/kg of zoledronic acid (ZOL) intraperitoneally for 12 weeks, followed by extraction of their lower right molars. Immediately after extraction, the animals received local therapies in the tooth socket. The animals were divided into seven groups (n=8) according to the established therapies: Salt (ZOL was not applied) and did not receive therapy; OVX-S (Saline – no ZOL was applied) and did not receive therapy; OVX-Z (Zoledronic Acid – ZOL was applied) and did not receive therapy; GO (Ozonized Oil), the animals received a local application of ozonized oil; GB (β -Tricalcium Phosphate) the animals were treated by filling the socket with paste biomaterial; GP (aPDT) animals were treated with antimicrobial photodynamic therapy; GD (Doxycycline) animals were treated by filling the socket with 10% doxycycline gel. At 28 days after extraction, the animals were euthanized for evaluation through: 1) clinical analysis, 2) microtomographic analysis and 3) histological analysis. The data obtained were subjected to statistical analysis with $p < 0.05$. Clinical evaluation demonstrated normal healing of soft tissues in animals in the Doxycycline Group and Ozone Group. There was also the presence of exposed/necrotic bone mainly in the OVX-Z group. The microtomographic analysis showed statistical differences between the groups in the parameters of BV ($p < 0.001$), Tb.N ($p < 0.001$) and Tb.Sp ($p = 0.004$). While in the parameters of BV/TV ($p = 0.207$), Tb.Th ($p = 0.091$) and Po.tot ($p = 0.091$) no statistical differences were observed. Within the limits of this study, it can be concluded that zoledronic acid induced OMIM, impairing the alveolar repair process after tooth extraction. Local therapies were able to stimulate the alveolar repair process, especially when treatments with 10% doxycycline gel and ozonated oil were applied, minimizing the consequences of zoledronic acid.

Keywords: Osteoporosis. Osteonecrosis. Ovariectomy. Bisphosphonates. Dental Alveolus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo das fases do ciclo estral. A) Proestro - células epiteliais; B) Estro - células queratinizadas; C) Metaestro - revela células epiteliais, queratinizadas e leucócitos; D) Diestro - células epiteliais, leucócios e muco; E) Few – poucas células epiteliais, leucócios e muco

21

Figura 2 - Modelo Cirúrgico – Imagem ilustrativa e representativa do procedimento cirúrgico para ovariectomia das ratas. A) Corte da epiderme; B) Corte da camada muscular; C) Localização do ovário; D) Remoção total do ovário direito; E) Remoção total do ovário esquerdo; F) Sutura da epiderme

22

Figura 3 - Imagem ilustrativa e representativa da aplicação de ácido zolêdrônico por via intraperitoneal, exceto nos grupos Sal e OVX-S (tratados com soro fisiológico)

23

Figura 4 - Modelo Cirúrgico. A) Imagem ilustrativa e representativa do procedimento cirúrgico para extração do primeiro molar inferior direito com uso de sindesmótomo adaptado (Hollenback 3ss); B) Primeiro molar inferior direito extraído

24

Figura 5 - Aplicação dos tratamentos nos alvéolos dos animais recém extraídos. A) Coágulo sanguíneo; B) Preenchimento do alvéolo por gel de doxiciclina a 10%; C) Preenchimento do alvéolo por óleo ozonizado; D) Preenchimento do alvéolo com azul de Metileno e aplicação do laser aPDT; E) Preenchimento do alvéolo por biomaterial; F) Alvéolo suturado

26

Figura 6 - Fluxograma do tempo de trabalho. O dia 0 representa o início do ciclo estral, dia 12 representa o procedimento cirúrgico de ovariectomia em todos os grupos; O dia 72 representa o início do tratamento com ácido zolêdrônico, exceto nos grupos Sal e OVX-S (tratados com soro fisiológico). O dia 191 representa o tempo de eutanásia, 28 dias após o procedimento cirúrgico

27

Figura 7 - Avaliação macroscópica do sítio cirúrgico - Demonstrando cicatrização normal dos tecidos moles em todos os animais do Grupo Doxiciclina e Grupo Ozônio. Presença de osso exposto/necrótico sem ou com sinais de infecção no local da exodontia em todos os grupos, com exceção de GD e GO

31

Figura 8 - Imagens clínicas macrocópicas. A) Grupo Sal; B) Grupo OVX-S; C) Grupo OVX-Z; D) Grupo Doxiciclina; E) Grupo Óleo Ozonizado; F) Grupo aPDT; G) Grupo Biomaterial

32

Figura 9 - Gráfico demonstrando as médias do volume, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada. Em * desmostra os grupos que apresentaram diferença estatística quando comparada a OVX-S. ($p < 0,001$)

33

Figura 10 - Gráfico demonstrando as médias de porcentagem do volume ósseo em todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada. ($p = 0,207$)	34
Figura 11 - Gráfico demonstrando as médias da espessura das trabéculas ósseas (em mm) de todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada. ($p = 0,054$)	34
Figura 12 - Gráfico demonstrando as separações das trabéculas / mm em todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada. Em * demonstra os grupos que apresentaram diferença estatística quando comparada a OVX-S e DOX ($p < 0,05$)	35
Figura 13 - Gráfico demonstrando as médias do número de trabéculas dos grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ($p > 0,05$)	36
Figura 14 - Gráfico demonstrando as médias da porcentagem de porosidade total, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ($p > 0,05$)	36
Figura 15 - Imagens microtomográficas dos cortes parassagitais. A) Grupo Sal; B) Grupo OVX-S; C) Grupo OVX-Z; D) Grupo Doxíciclina; E) Grupo Óleo Ozonizado; F) Grupo aPDT; G) Grupo Biomaterial	37
Figura 16 - Imagens obtidas através da coloração com hematoxilina e eosina em 2.5x e 10x. Grupo Sal	38
Figura 17 - Imagens obtidas através da coloração com hematoxilina e eosina em 2.5x e 10x. Grupo OVX-S	38
Figura 18 - Imagens obtidas através da coloração com hematoxilina e eosina em 2.5x e 10x. Grupo OVX-Z	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ARRIVE	Animal Research: Reporting in Vivo Experiments
BV	Volume ósseo
BV/TV	Porcentagem do volume ósseo
CEUA	Comitê de ética de uso animal
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
GB	Grupo biomaterial
GD	Grupo Doxiciclina
GO	Grupo ozônio
GP	Grupo terapia fotodinamica antimicrobiana
HE	Hematoxilina e Eosina
microCT	Análise Microtomográfica
NaCl 0,9%	Soro fisiológico
OMIM	Osteonecrose induzida por medicamentos
OVX-S	Grupo ovariectomia e soro
OVX-Z	Grupo ovariectomia e ácido zoledrônico
Po.tot	Porosidade total
SAL	Grupo Soro Fisiológico
Tb.N	Número de trabéculas
TB.Sp	Separação de trabéculas
Tb.Th	Espessura do trabeculado ósseo
ZOL	Ácido zoledrônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Animais	22
3.2 Ciclo Estral	22
3.3 Ovariectomia	23
3.4 Aplicação de Ácido Zoledrônico	24
3.5 Extração Dentária	25
3.6 Grupos Experimentais	26
3.7 Eutanásia	28
3.8 Análise Clínica	29
3.9 Análise Microtomográfica	29
3.10 Análise Histológica	30
3.11 Análise Estatística	30
4 RESULTADOS	32
4.1 Análise Clínica	32
4.2 Análise Microtomográfica	33
4.3 Análise Histológica	38
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	52

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica e multifatorial, caracterizada pela alteração da macrogeometria, deterioração da microarquitetura óssea redução da massa óssea, aumento da fragilidade e, se mantém silenciosa e assintomática até ocorrer fratura.¹ Para tratar a osteoporose, vários agentes terapêuticos vem sendo utilizados, incluindo a terapia de reposição de estrógeno, calcitonina e os bisfosfonatos.²

Os bifosfonatos (BFs) constituem uma classe de medicamentos, conhecida pelo seu efeito antirreabsortivo, e frequentemente utilizada no controle e prevenção de doenças osteopênicas, metástases ósseas, mielomas múltiplos, prevenindo assim eventos esqueléticos relacionados (novos danos ou fraturas).³

Na atualidade, estes medicamentos têm sido associados à ocorrência de necrose óssea, com exposição tecidual, principalmente em cavidade bucal.³ A ocorrência desta exposição óssea por 8 semanas em paciente que tenha ingerido previamente anti-reabsortivos ou antiangiogênicos e que não foram submetidos a radioterapia é denominada a osteonecrose dos maxilares induza por medicamentos (OMIM).^{3,4}

Os mecanismos fisiopatológicos da indução da OMIM ainda não estão claramente elucidados, contudo acredita-se que os efeitos indutores de apoptose de osteoclastos e inibidores de angiogênese promovidos pelos BFs favorecem necrose óssea dos maxilares.³ A associação de outros fatores traumáticos, como a exodontia podem contribuir para o desenvolvimento dessa patologia.⁵⁻⁷

Desse modo, os tratamentos são propostos de acordo com o estágio de progressão da doença, variando entre tratamentos conservadores, cirúrgicos e em alguns casos a associação deles.^{8,9} Alguns autores propõem terapias locais com laserterapia,¹⁰ antibioticoterapia,¹¹ biomateriais¹² e ozonioterapia¹³

O β -TCP é considerado um material osteocondutor que permite a preservação das dimensões do alvéolo e pode ser reabsorvido e substituído por osso novo.¹⁴ Estudos prévios demonstram que o β -TCP é capaz de neutralizar a progressão da OMIM, orientando a cicatrização óssea alveolar.¹⁴ Além disso, o uso do β -TCP no alvéolo após extração dentária pode prevenir e tratar sintomas de OMIM, como apontou resultados encontrados em pesquisas prévias publicadas, empregando modelo animal.^{12,14,15}

A ação antimicrobiana nas terapias trata-se de outro fator importante, visto o potencial

de infecção que estas lesões podem apresentar.⁹ A doxiciclina (DOX), do grupo das tetraciclina, é um fármaco com habilidade de interferir na remodelação óssea.¹⁶ De acordo com estudos, foi verificado que a DOX pode inibir a osteoclastogênese, influenciando na sobrevivência dos osteoclastos esuprimindo a reabsorção óssea.^{17,18}

Destaca-se ainda, o uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) como potencial terapêutico para OMIM.^{5,9} A aPDT exerce efeitos positivos a nível celular e tecidual, que resultam em ação antimicrobiana e efeitos fotobiomoduladores, melhorando a angiogênese, proliferação, migração, diferenciação e atividade celular, que são eventos essenciais para o processo de reparo tecidual.^{5,10,19}

Por fim, apresentamos o uso da ozonioterapia para cicatrização de feridas de forma tópica.^{13,20} De acordo com a literatura, a aplicação de ozônio na forma de óleo ozonizado apresentou sucesso no tratamento de algumas lesões na cavidade oral, entre elas a OMIM.¹³ Acredita-se que o óleo ozonizado promova a aceleração da cicatrização de feridas, uma vez que a molécula de ozônio aumenta a oxigenação dos tecidos, apresenta propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antitumorais e consequentemente, melhor sua função celular.^{21,22}

O uso de ratas ovariectomizadas como modelos animais para estudo da menopausa e osteopenia, seguido pelo uso de medicações antirreabsortivas e desenvolvimento da OMIM apresentam-se bem descrita na literatura.²³⁻²⁶ Novas pesquisas estão surgindo com o objetivo de avaliar métodos de prevenção da OMIM em pacientes osteoporóticas que fazem uso de BFs. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito do óleo ozonizado, do β -TCP, da doxiciclina e da aPDT como prevenção da OMIM após exodontia do primeiro molar inferior direito de ratas ovariectomizadas tratados com ácido zolêdrônico.

Objetivo

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito do óleo ozonizado, do β -TCP, da doxíciclina e da aPDT como prevenção da OMIM após exodontia do primeiro molar inferior direito de ratas ovariectomizadas tratados com ácido zolêdrônico.

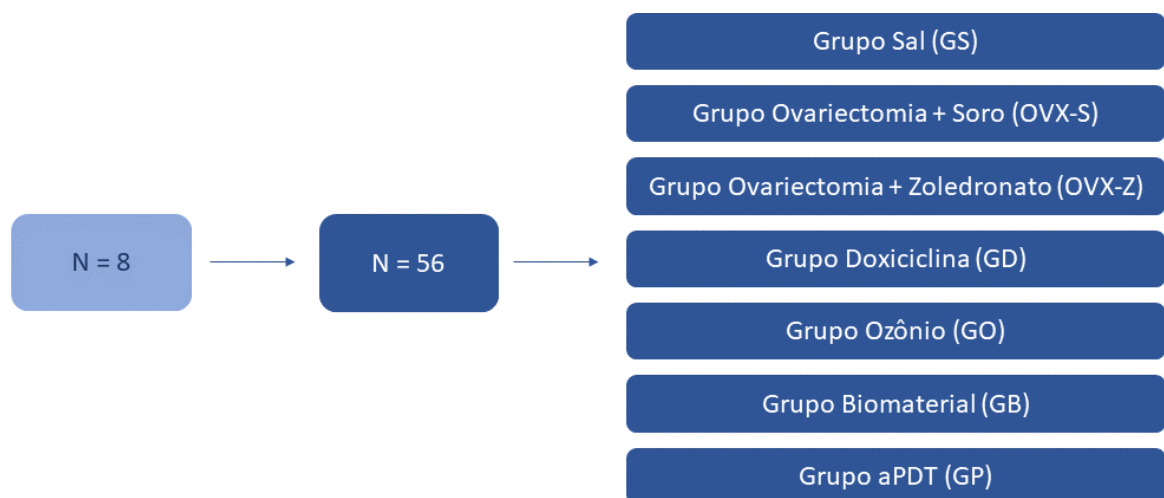
Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho teve início após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. (ANEXO A)

3.1 Animais

Foram utilizadas 56 ratas *Albinus wistar* fêmeas ovariectomizadas com 3 meses de idade e peso aproximado de 250-350g. Os animais foram mantidos em biotério próprio da UNESP com controle da temperatura e luz do ambiente. Os animais foram alimentados com ração e água ad libitum. Para determinação do poder da amostra foi considerado um nível de significância de 5%(com desvio padrão de 2%), e com um poder de teste de 80%, sendo definido alpha como 0,05, e oito ratos por grupos (n=8) foram necessários com finalidade de comparar os diferentes grupos.

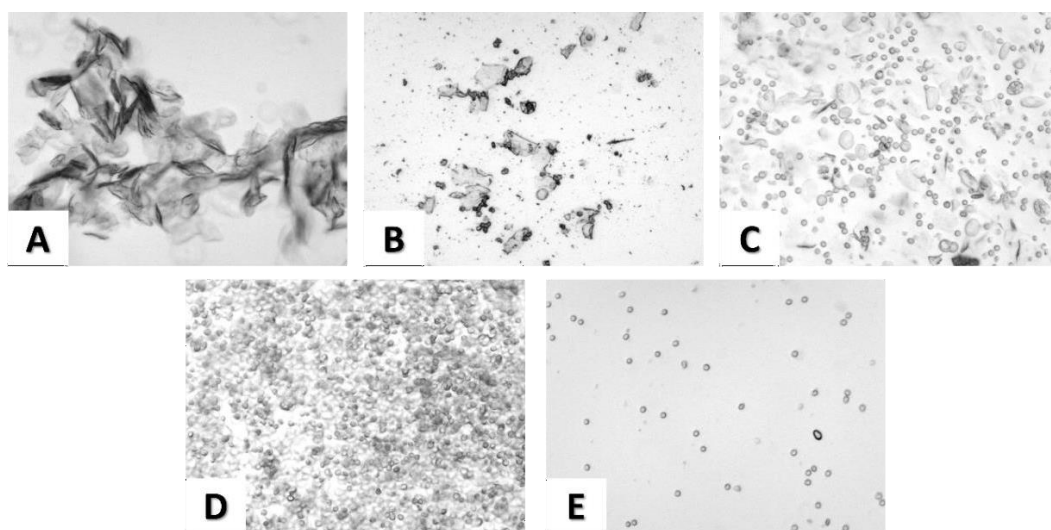


3.2 Ciclo estral

Para assegurar que as ratas utilizadas no experimento estevam em seu ciclo regular, as mesmas foram submetidas diariamente a análise do ciclo estral, de forma que fossem selecionadas apenas as ratas que estivessem com ciclo estral regular (2 a 3 ciclos) para constituírem os grupos experimentais. Com esse intuito, foi introduzido no interior da vagina da rata 1-2 gotas de soro fisiológico que em seguida foi aspirado e colocado em lâmina de histologia para leitura microscópica imediata (Long & Evans, 1922) para reconhecimento das

fases do ciclo estral. As quatro fases do ciclo estral podem ser diferenciadas pelas suas características celulares, sendo o diestro caracterizado pela presença de células epiteliais, leucócios e muco, o proestro apresenta apenas células epiteliais, o estro possui somente células queratinizadas e o metaestro revela células epiteliais, queratinizadas e leucócitos.^{26,27}

Figura 1 - Modelo das fases do ciclo estral. **A)** Proestro - células epiteliais; **B)** Estro - células queratinizadas; **C)** Metaestro - revela células epiteliais, queratinizadas e leucócitos; **D)** Diestro - células epiteliais, leucócios e muco; **E)** Few – poucas células epiteliais, leucócios e muco

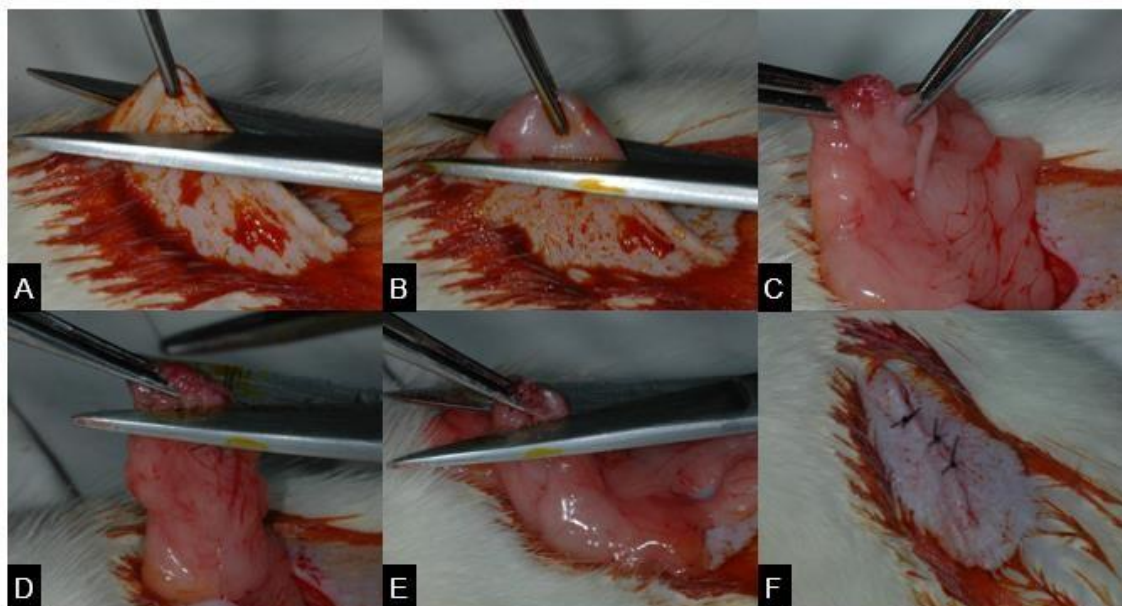


Fonte: Autoria própria, 2023

3.3 Ovariectomia

Para induzir osteopenia nos animais, após 8 horas de jejum, as 56 ratas foram submetidas ao procedimento cirúrgico de ovariectomia (Figura 1). A cirurgia foi realizada através de sedação com injeção intraperitoneal (IP) de 90mg/kg de Cloridrato de Ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil), e 10mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). Em seguida, foi realizada a tricotomia e assepsia da região ventral do abdômen, prontamente, os ovários foram expostos através de uma incisura vertical na parede abdominal. Uma vez que os ovários foram reconhecidos, realizou-se a remoção dos mesmos. Na camada muscular, assim como na camada epitelial, foi realizada a sutura com fio absorvível de Poliglactina 910 espessura 4.0 (Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil). Os animais do grupo Sal (GS) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, com exceção da remoção dos ovários. As ratas foram selecionadas para o experimento após confirmação de seu ciclo estral regular.²⁸

Figura 2 - Modelo Cirúrgico – Imagem ilustrativa e representativa do procedimento cirúrgico para ovariectomia das ratas. **A)** Corte da epiderme; **B)** Corte da camada muscular; **C)** Localização do ovário; **D)** Remoção total do ovário direito; **E)** Remoção total do ovário esquerdo; **F)** Sutura da epiderme



Fonte: Autoria própria, 2023

3.4 Aplicação do ácido zolêdrônico

A aplicação do ácido zolêdrônico se iniciou após o fim do período de indução de osteopenia. Todos os animais foram tratados com o uso do ácido zolêdrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil), exceto os animais do grupo GS e grupo OVX-S. Seguindo o modelo experimental de Li et al.²⁹, foi administrado 36 aplicações de 0,066 mg/kg de ácido zolêdrônico (ZOL) dissolvido em 0,1ml de veículo (NaCl 0,9%), por animal, através de injeção intraperitoneal, no decorrer de 12 semanas (Figura 3). Uma semana após a última aplicação, os animais tiveram seus molares inferiores direitos removidos.

Figura 3 - Imagem ilustrativa e representativa da aplicação de ácido zolêdronico por via intraperitoneal, exceto nos grupos Sal e OVX-S (tratados com soro fisiológico)



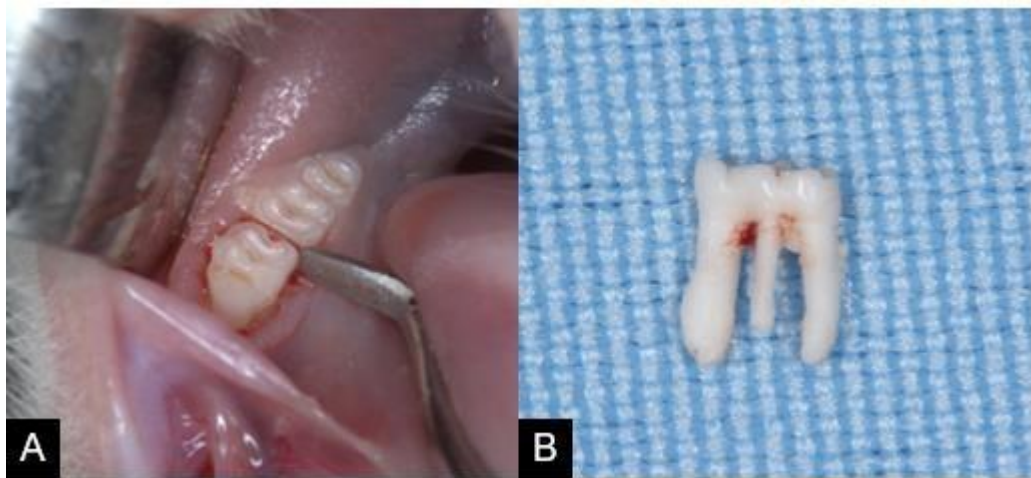
Fonte: Autoria própria, 2023

3.5 Extração dentária

Todos os animais tiveram seus primeiros molares inferiores direitos extraídos na 13ª semana após o início do protocolo de indução de OMIM (Figura 4). O procedimento cirúrgico foi realizado através de sedação com injeção intraperitoneal (IP) de 90mg/kg de Cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil), e 10mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). Após sedação realizou-se a anti-sepsia com PVPI degermante e tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), seguido da aposição de campos estéreis. Como complementação anestésica os animais receberam infiltração local de cloridrato de mepivacaína 0.3 ml/Kg (Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal em mesa de operação personalizada. A sindesmotomia da inserção gengival foi realizada cuidadosamente por meio de um descolador delicado (Descolador de Molt9, Quinelato, São Paulo, Brasil) seguido da luxação e exodontia do dente. Após a exodontia, aplicou-se no alvéolo dentário as terapias propostas neste projeto de acordo com cada grupo, com exceção dos grupos sal, ovariectomia e soro, ovariectomia e zoledronato, os quais realizou-se apenas um descolamento dos tecidos moles da região, com intuito de auxiliar na manutenção do coágulo e fechamento primário do

alvéolo por tecido mole. Imediatamente, foi realizada a sutura com fio nylon de espessura 4.0 (Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil). No pós-operatório os animais receberam administração via intramuscular 15 mg/kg de cefalotina (Keflin® Neutro, Antibióticos do Brasil Ltda, Sumaré, Brasil) a cada 12h por 48 horas.

Figura 4 - Modelo Cirúrgico, **A)** Imagem ilustrativa e representativa do procedimento cirúrgico para extração do primeiro molar inferior direito com uso de sindesmótomo adaptado (Hollenback 3ss); **B)** Primeiro molar inferior direito extraído



Fonte: Autoria própria, 2023

3.6 Grupos experimentais

Após aplicação do protocolo de ácido zolêdronico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil) os animais foram divididos aleatoriamente em 7 grupos, de acordo com o tratamento que os alvéolos iriam receber (Figura 3):

Grupo Sal (GS): Os animais submetidos a simulação ovariectomia, tiveram seu primeiro molar inferior direito extraído após protocolo de tratamento com soro fisiológico (NaCl 0,9%). O alvéolo dental foi preenchido por coágulo sanguíneo.

Grupo Ovariectomia e Soro (OVX-S): Os animais submetidos a ovariectomia, tiveram seu primeiro molar inferior direito extraído após protocolo de tratamento com soro fisiológico (NaCl 0,9%). O alvéolo dental foi preenchido por coágulo sanguíneo.

Grupo Ovariectomia e Zoledronato (OVX-Z): Os animais submetidos a ovariectomia, tiveram seu primeiro molar inferior direito extraído após protocolo de

tratamento com ácido zolêdrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil). O alvéolo dental foi preenchido por coágulo sanguíneo.

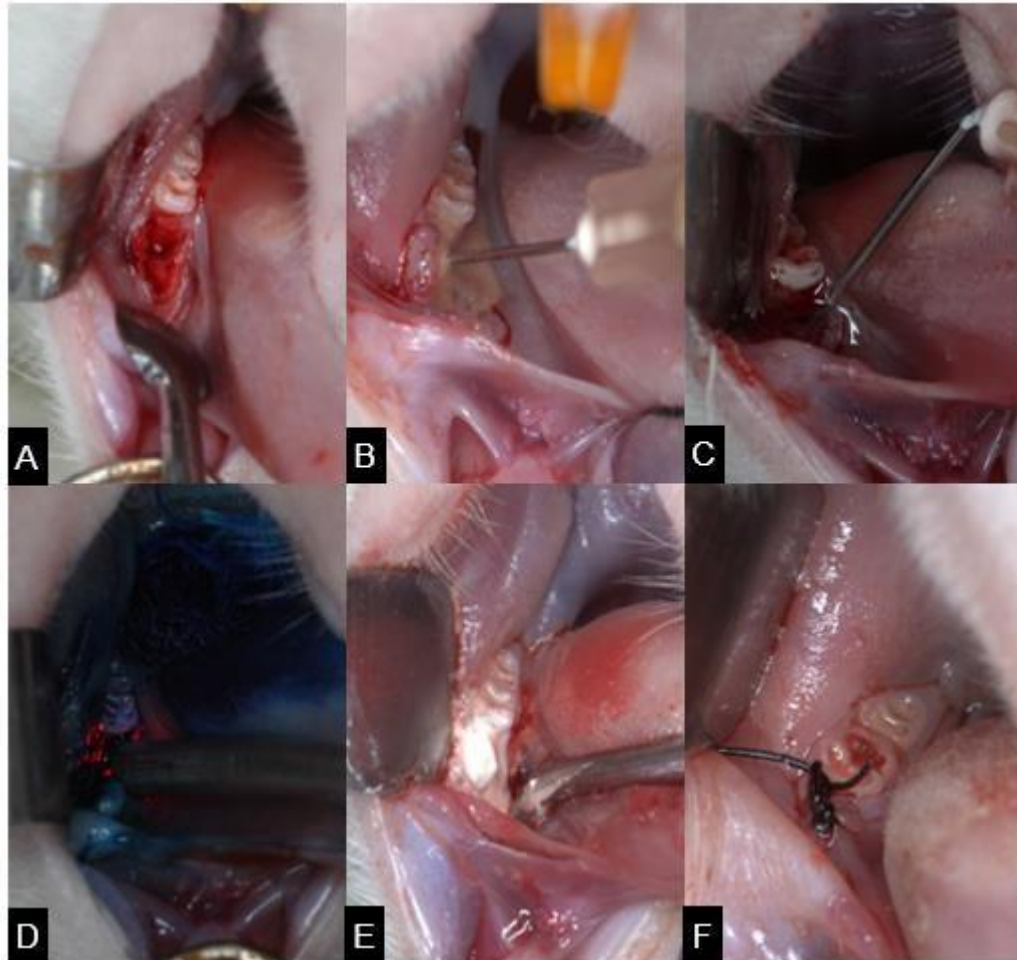
Grupo Óleo Ozonizado (GO): Os animais submetidos a ovariectomia, tiveram seu primeiro molar inferior direito extraído após protocolo de tratamento com ácido zolêdrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil). Os animais receberam uma aplicação local de 0,1 ml de óleo ozonizado em temperatura ambiente – aproximadamente 600mmol-eq/kg de peróxidos (Ozone & Life, São Jose dos Campos, São Paulo, Brasil).

Grupo Doxíciclina (GD): Os animais submetidos a ovariectomia, tiveram seu primeiro molar inferior direito extraído após protocolo de tratamento com ácido zolêdrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil). Os animais foram tratados com o preenchimento do alvéolo por 0,1 ml de gel de doxíciclina a 10%.

Grupo Biomaterial (Gβ): Os animais submetidos a ovariectomia, tiveram seu primeiro molar inferior direito extraído após protocolo de tratamento com ácido zolêdrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil) e os animais foram tratados com o preenchimento do alvéolo por β-tricálcio fosfato em pasta (Graftys HBS, Latin American Solutions - LAS Brazil).

Grupo aPDT (GP): Os animais submetidos a ovariectomia, tiveram seu primeiro molar inferior direito extraído após protocolo de tratamento com ácido zolêdrônico (Zometa®, Novartis Biociências SA, São Paulo, Brasil) e os animais foram tratados com PDT. O protocolo empregado foi descrito por Ervolino et al.¹⁰

Figura 5 - Aplicação dos tratamentos nos alvéolos dos animais recém extraídos. **A)** Coágulo sanguíneo; **B)** Preenchimento do alvéolo por gel de doxíciclina a 10%; **C)** Preenchimento do alvéolo por óleo ozonizado; **D)** Preenchimento do alvéolo com azul de Metileno e aplicação do laser aPDT; **E)** Preenchimento do alvéolo por biomaterial; **F)** Alvéolo suturado

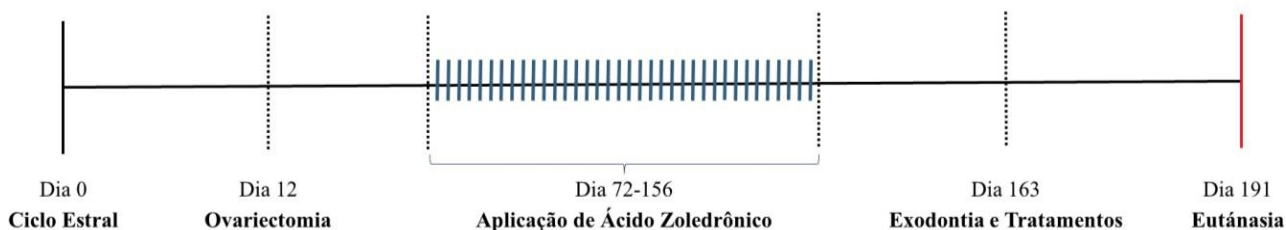


Fonte: Autoria própria, 2023

3.7 Eutanásia

Passados 28 dias das exodontias e tratamentos propostos, todos os animais foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico, tiopental sódico (150mg/kg) e lidocaína 2% (10mg/kg). Em seguida, foram realizadas as secções das hemi-mandíbulas do lado direito para posteriores análise clínica e microtomográfica.

Figura 6 - Fluxograma do tempo de trabalho. O dia 0 representa o início do ciclo estral, dia 12 representa o procedimento cirúrgico de ovariectomia em todos os grupos; O dia 72 representa o início do tratamento com ácido zolêdrônico, exceto nos grupos Sal e OVX-S (tratados com soro fisiológico). O dia 191 representa o tempo de eutanásia, 28 dias após o procedimento cirúrgico



Fonte: Autoria própria, 2023

3.8 Análise Clínica

Após as secções, as hemi-mandíbulas foram acomodadas em uma estativa e fotografadas (Canon io5 com lente EF 100mm f/2.8 macro e flash MR-14EX II Macro ring light). Posteriormente, as amostras foram classificadas de acordo com trabalhos previamente publicados,³⁰ avaliando as características do fechamento da ferida (normal / incompleto / atrasado), exposição óssea, alterações necróticas, presença de supuração e fistulas, sendo classificado como:

Grau 0 – Mucosa íntegra e sem a presença de osso necrótico no local da exodontia;

Grau 1 – Sem a presença de osso necrótico no local da exodontia, mas não específicas no local de extração;

Grau 2 – Osso exposto/necrótico sem sinais de infecção no local da exodontia;

Grau 3 – Osso exposto/necrótico com sinais de infecção no local da exodontia;

Grau 4 – Osso exposto/necrótico com infecção que se estende além do local da exodontia.

3.9 Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

Após a eutanásia de todos os animais, as hemi-mandíbulas direitas foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, São Paulo, Brasil) durante 24 horas, seguidas de banho em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças foram armazenadas em álcool 70%, para a realização

da análise microtomográfica, de acordo com estudo prévio publicado (Bouxsein et al. 2010).³¹

Por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 BrukerMicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) as peças foram escaneadas, utilizando cortes de 6µm de espessura (90Kv e 111µA) com filtro de Al. 0,5mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0.5mm, tamanho do pixel de 2016x1344µm e com tempo de aquisição de 45 minutos. As imagens obtidas reconstituídas, determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com smoothing de 1, correção dos anéis de artefato de 7, correção de Beam Hardening de 24% e a faixa de conversão de imagem variou de 0,0 – 0,14. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit), as imagens foram reconstruídas e observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, através do software CT Analyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker Micro-CT Versão 1.12.4.0) foi avaliado e mensurado o volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação de trabéculas (Tb.Sp) e número de trabéculas (Tb.N).³¹ E posterior reconstrução em 3D pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

3.10 Análise Histológica Qualitativa

Os fêmures direitos serão removidas e reduzidas para realização da análise histológica dos cortes em parafina. As amostras serão fixadas em formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP – Brasil) por 24 horas e na sequência será iniciado o processo de descalcificação em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e hidróxido de sódio a 20%.

Posteriormente serão desidratadas em uma sequência crescente de álcoois (70, 90, 95 e 100), seguida da diafanizados em Xylol e embebidas com parafina no sentido cervical (pósterio-anterior) para obtenção de cortes sagitais de 5 µm espessura por meio de micrótomo (RM2235, Leica Biosystems Nussloch GmbH 2017) para posterior coloração com hematoxilina e eosina (HE, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA). As imagens de lâminas coradas com HE serão obtidas através do microscópio óptico (Leica DM4000 B LED, Heerbruggm Switzerland) com o auxílio de lentes objetivas Carls Zeiss (2.5X0.07, 5X0.12, 10X e 40X0.65) acoplado a uma câmera de captação de imagem e conectado ao computador (Configuração: Intel Core i5® com sistema operacional Windows 7® e Software) para processamento e análise de imagens (AxioVision 4.9.1®0, Carl Zeiss by Imaging Associates ltd, Jena, Deutschland).

3.11 Análise Estatística

Os valores obtidos nas análises clínica e microtomográfica foram tabulados e submetidos a análise estatística no Programa SigmaPlot 12.0 (Exakt Graph and Data Analysis). O teste one-way ANOVA foi realizado para verificar os parâmetros de volume ósseo (BV/TV) e número detrabéculas (Tb.N), e para os parâmetros de volume ósseo (BV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação de trabéculas (Tb.Sp) e porcentagem de porosidade total (Po.tot). Posteriormente, foi realizado o teste de homogeneidade (Shapiro-Wilk) para verificação da distribuição dos dados nos parâmetros BV/TV, Tb.Th e Po.tot, seguido de um teste Tukey's post hoc para múltiplas comparações em BV e o teste Dunn's para Tb.N.

Resultados

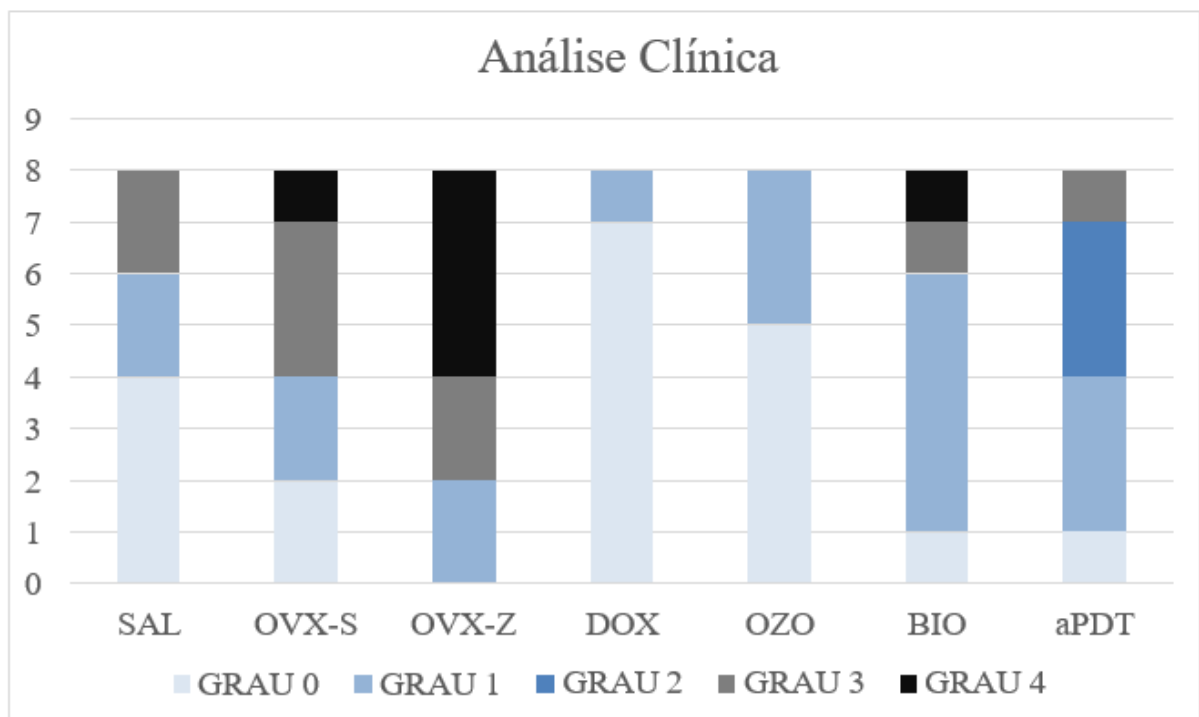
4 RESULTADOS

4.1 Análise Clínica

Análise quantitativa dos alvéolos:

As amostras avaliadas e classificadas de acordo com trabalhos previamente publicados,^{9,30} avaliando as características do fechamento da ferida, exposição óssea, alterações necróticas, presença de supuração e fistulas, sendo classificado como:

Figura 7 - Avaliação macroscópica do sítio cirúrgico - Demonstrando cicatrização normal dos tecidos moles em todos os animais do Grupo Doxiciclina e Grupo Ozônio. Presença de osso exposto/necrótico sem ou com sinais de infecção no local da exodontia em todos os grupos, com exceção do de GD e GO



Fonte: Autoria própria, 2023

Análise qualitativa dos alvéolos:

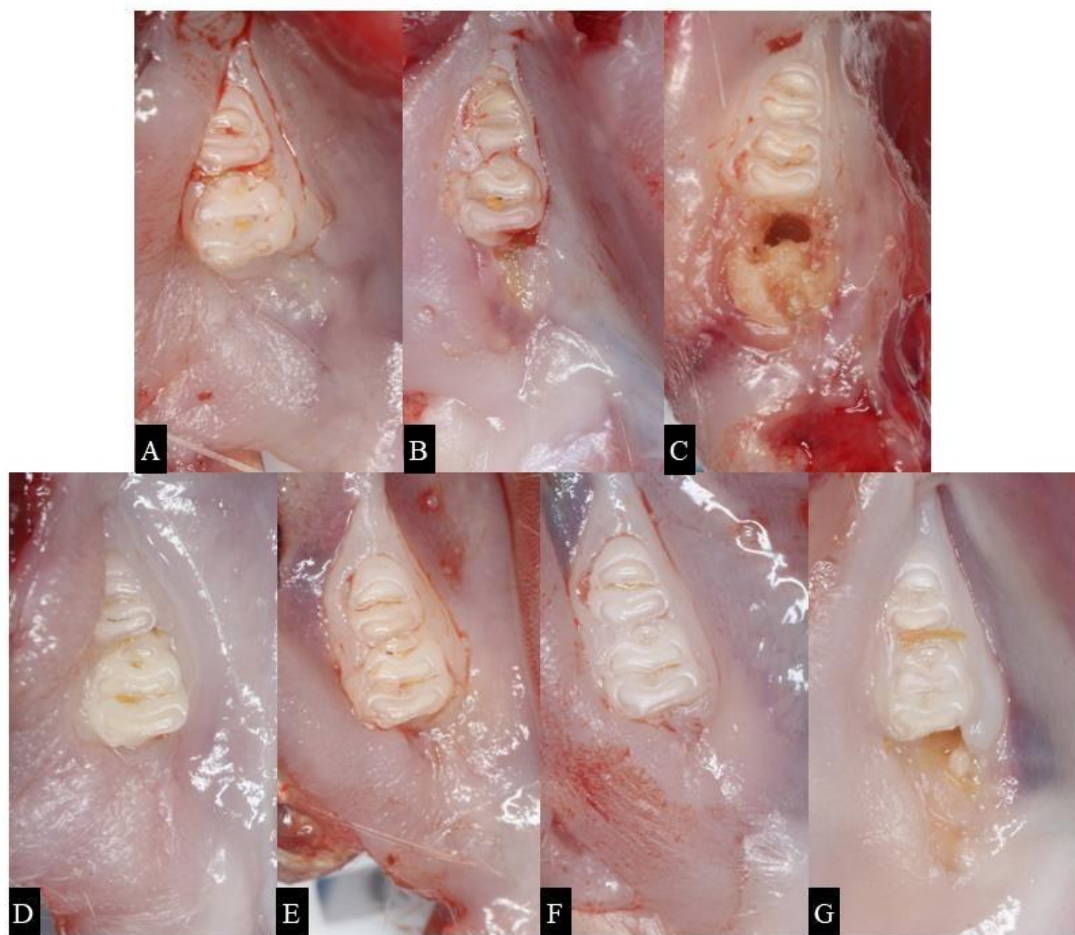
A análise clínica nos revela uma mucosa íntegra e sem a presença de osso necrótico no local da exodontia nos grupos GD e GO, seguido pelo grupo SAL, que apresentou resultado similar na maioria dos animais.

Quanto aos demais grupos observaram a presença de osso exposto/necrótico com e

sem sinais de infecção no local da exodontia e se estendendo além do alvéolo. Os grupos OVX-Z e OVX-S apresentam o maior grau de necrose, sendo a predominância do grau 4 pertencente ao grupo OVX-Z.

Além disso, os grupos GB e GP apresentaram resultados clínicos variados, sem a presença de osso necrótico no local da exodontia, mas área não específica no local de extração. Entretanto, o grupo aPDT apresentou maior grau de osso exposto/necrótico sem sinais de infecção no local da exodontia, quanto comparado aos demais tratamentos locais.

Figura 8 - Imagens clínicas macrocópicas. **A)** Grupo Sal; **B)** Grupo OVX-S; **C)** Grupo OVX-Z; **D)** Grupo Doxíciclina; **E)** Grupo Óleo Ozonizado; **F)** Grupo aPDT; **G)** Grupo Biomaterial



Fonte: Autoria própria, 2023

4.2 Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

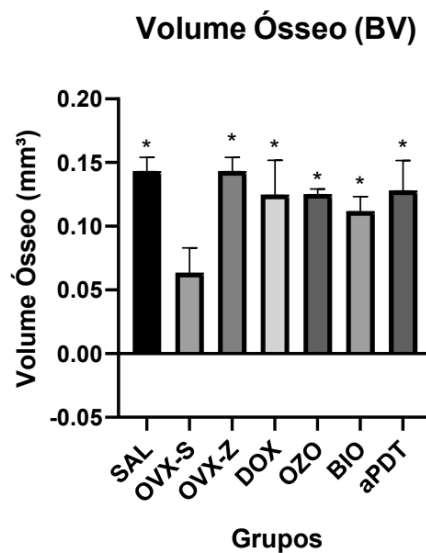
Análise quantitativa dos alvéolos:

A análise microtomográfica mostrou diferenças estatísticas entre os grupos nos parâmetros de BV ($p < 0,001$), Tb.N ($p < 0,001$) e Tb.Sp ($p = 0,004$). Enquanto que nos parâmetros de BV/TV ($p = 0,207$), Tb.Th ($p = 0,091$) e Po.tot ($p = 0,091$) não foram observadas diferenças estatísticas.

Volume ósseo (BV):

Neste parâmetro foi encontrada diferença estatística entre o grupo OVX-S com todos os demais grupos ($p < 0,001$). (Figura 9)

Figura 9 - Gráfico demonstrando as médias do volume, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada. Em * desmostra os grupos que apresentaram diferença estatística quando comparada a OVX-S. ($p < 0,001$)



Fonte: Autoria própria, 2023

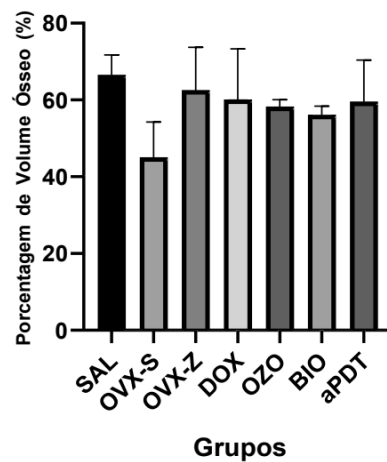
Porcentagem de volume ósseo (BV/TV):

A média de porcentagem de volume ósseo foi maior no grupo Sal ($66,55 \pm 5,12$), seguido dos grupos de tratamento OVX-Z ($62,58 \pm 11,11$); GD ($60,14 \pm 13,15$); GP ($59,59 \pm 10,75$) e GO ($58,27 \pm 1,75$), entretanto não foi encontrado diferença estatística ($P =$

0,207) entre os grupos estudados. (Figura 10)

Figura 10 - Gráfico demonstrando as médias de porcentagem do volume ósseo em todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada. ($p = 0,207$)

Porcetangem de Volume Ósseo (BV/TV)



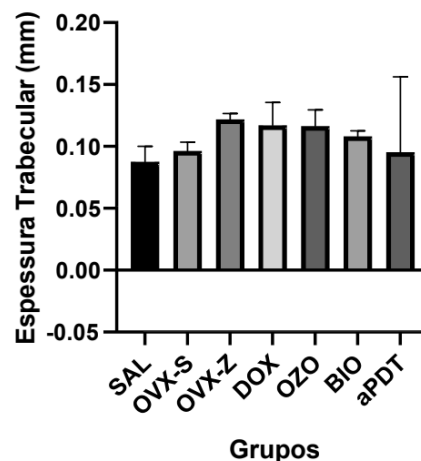
Fonte: Autoria própria, 2023

Espessura trabecular (Tb.Th):

Quanto a este parâmetro não foi observado diferença estatisticamente significativa ($p=0,091$). No grupo OVX-Z apresentou uma maior média de espessura trababecular ($0,120 \pm 0,118$), seguido de GO ($0,115 \pm 0,104$). (Figura 11)

Figura 11 - Gráfico demonstrando as médias da espessura das trabéculas ósseas (em mm) de todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada. ($p = 0,054$)

Espessura Trabecular (Tb.Th)



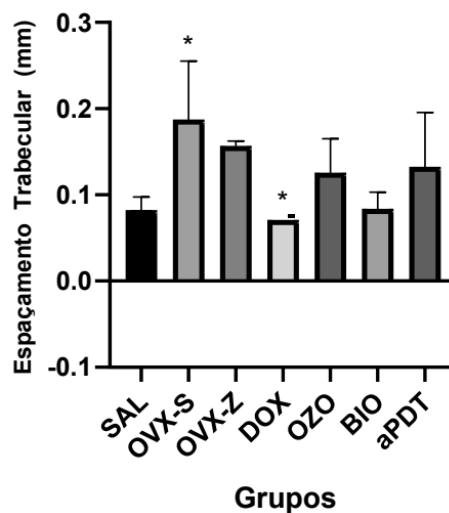
Fonte: Autoria própria, 2023

Separação trabecular (Tb.Sp):

Neste parâmetro de espaçamento trabecular apenas o grupo SAL apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao GD. Os grupos de tratamento apresentaram uma média menor quando comparado ao grupo SAL ($0,174 \pm 0,129$), sendo GD ($0,072 \pm 0,066$); GO ($0,121 \pm 0,095$); GB ($0,085 \pm 0,065$) e GP ($0,111 \pm 0,088$). (Figura 12)

Figura 12 - Gráfico demonstrando as separações das trabéculas / mm em todos os grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada. Em * demonstra os grupos que apresentaram diferença estatística quando comparada a OVX-S e DOX ($p < 0,05$)

Espaçamento Trabecular (Tb.Sp)



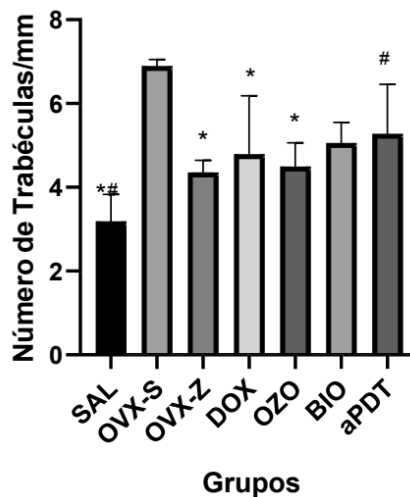
Fonte: Autoria própria, 2023

Número de trabéculas (Tb.N):

Quanto a este parâmetro o grupo OVX-S apresentou uma maior média $6,900 \pm 0,151$, quando comparados aos demais grupos, apresentando diferença estatística ($P < 0,001$) entre os grupos estudados. (Figura 13).

Figura 13 - Gráfico demonstrando as médias do número de trabéculas dos grupos, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ($p > 0,05$)

Número de Trabéculas (Tb.N)



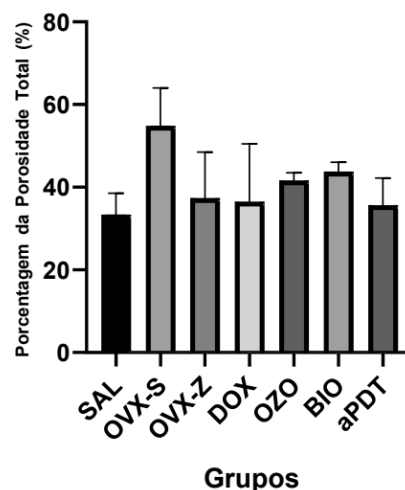
Fonte: Autoria própria, 2023

Porcentagem de porosidade total (Po.tot):

Quanto a este parâmetro o grupo Sal (GS) apresentou uma menor média $33,43 \pm 5,12$, quando comparados aos demais grupos OVX-S ($54,88 \pm 9,11$); OVX-Z ($37,40 \pm 11,11$); GD ($36,56 \pm 13,96$); GO ($41,71 \pm 1,75$); GB ($43,82 \pm 2,18$) e GP ($35,72 \pm 6,51$), entretanto não foi encontrada diferença estatística ($P = 0,091$) entre os grupos estudados. (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico demonstrando as médias da porcentagem de porosidade total, obtidos através da análise de microtomografia computadorizada ($p > 0,05$)

Porosidade Total (Po.Tot)

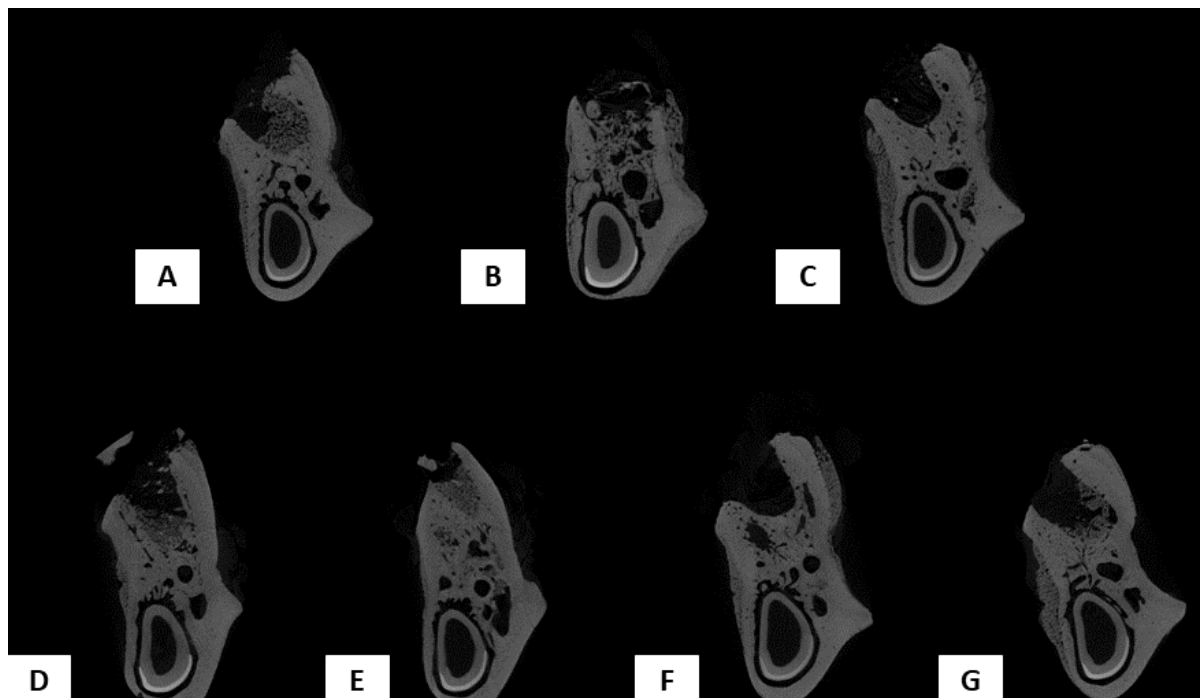


Fonte: Autoria própria, 2023

Análise qualitativa dos alvéolos:

Os resultados obtidos através da análise microtomográfica possibilitaram observar que no grupo Sal (GS) ocorreu um bom processo de reparo alveolar em uma visão parassagital. (Figura 11).

Figura 15 - Imagens microtomográficas dos cortes parassagittais. **A)** Grupo Sal; **B)** Grupo OVX-S; **C)** Grupo OVX-Z; **D)** Grupo Doxíciclina; **E)** Grupo Óleo Ozonizado; **F)** Grupo aPDT; **G)** Grupo Biomaterial

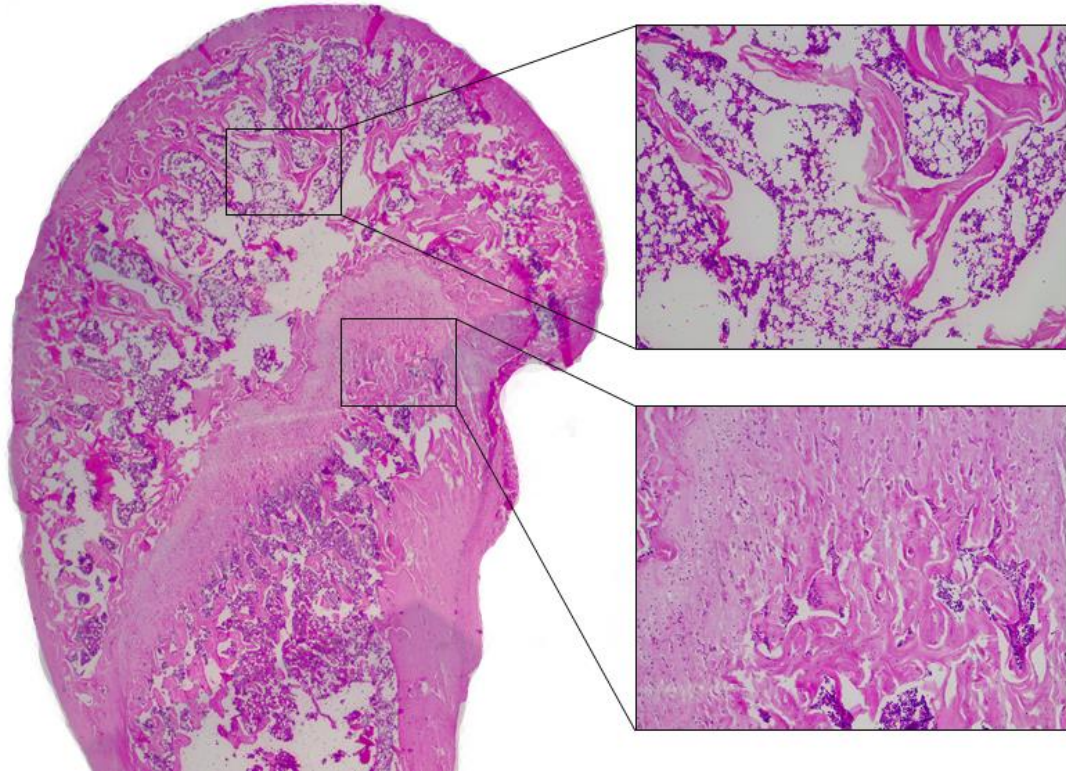


Fonte: Autoria própria, 2023

4.3 Análise Histológica

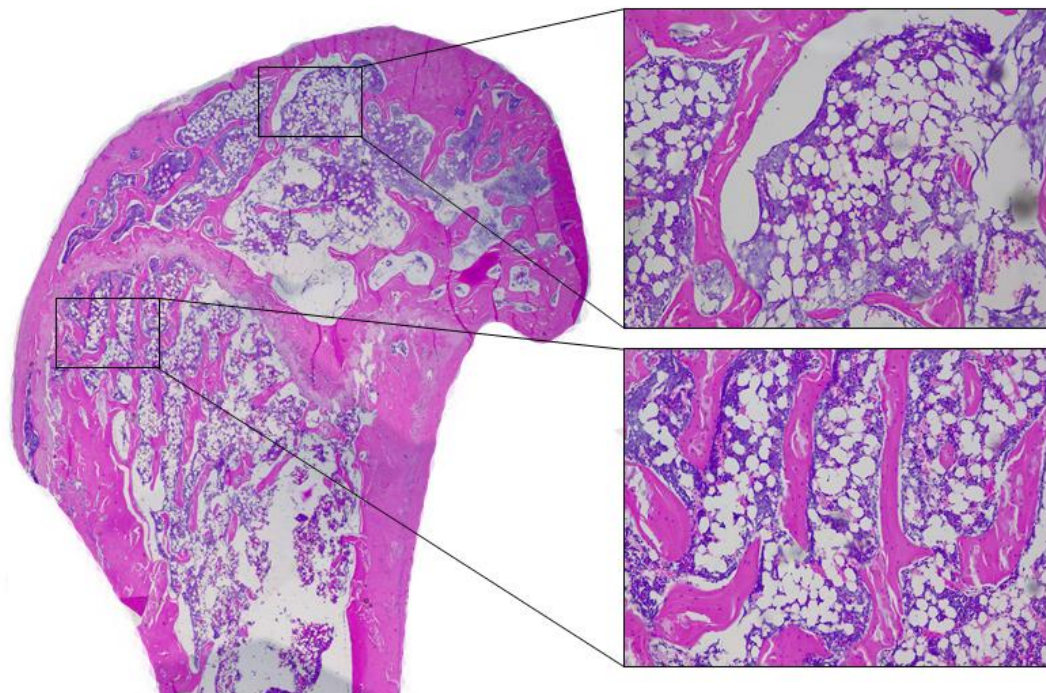
Os resultados obtidos através da comparação entre grupos estudados pela análise qualitativa da coloração de hematoxilina e eosina (Figura 16, 17 e 18) mostraram que nos fêmures das ratas osteopenicas não tratadas com ácido zoledrônico houve reabsorção óssea (Figura 17). Os fêmures do grupo Sal mostraram estrutura aparentemente normal do tecido ósseo (Figura 16), enquanto nos fêmures das ratas osteopenicas tratadas com ácido zoledrônico (Figura 18) foi possível observar maior densidade óssea.

Figura 16 - Imagens obtidas através da coloração com hematoxilina e eosina - Grupo Sal. Aumento de 2.5x e 10x.



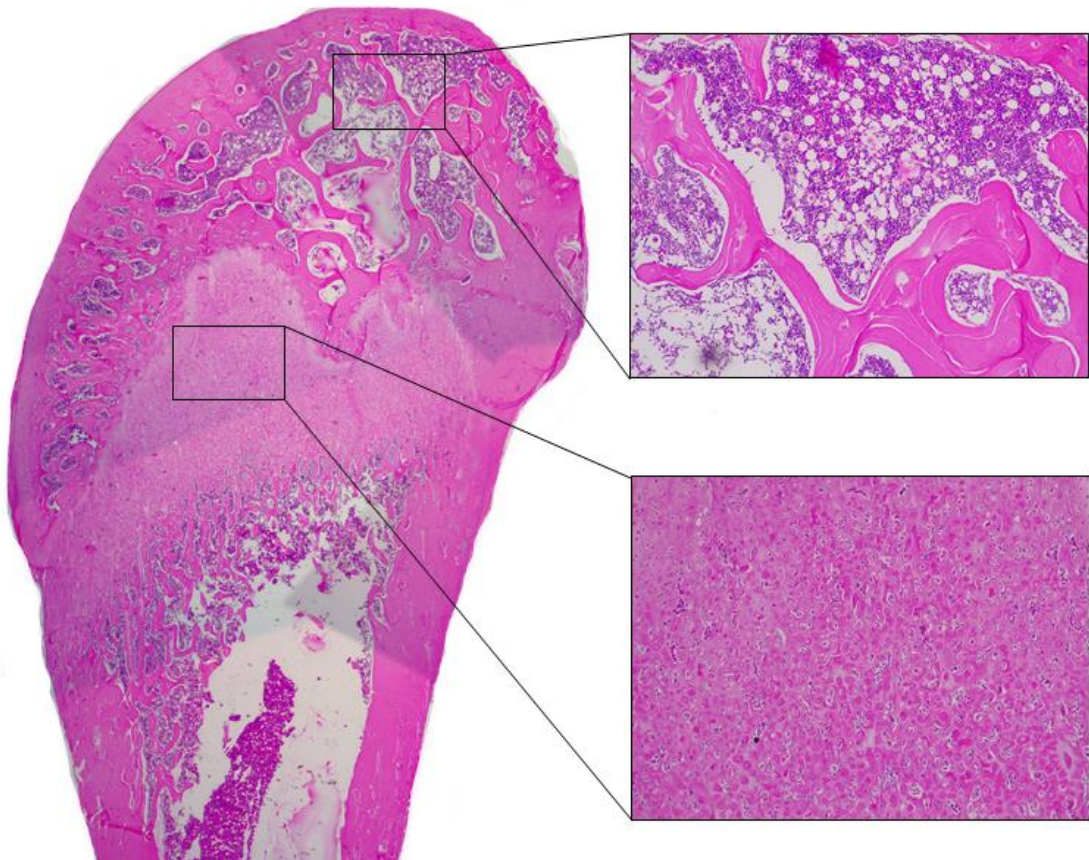
Fonte: Autoria própria, 2023

Figura 17 - Imagens obtidas através da coloração com hematoxilina e eosina - Grupo OVX-S. Aumento de 2.5x e 10x.



Fonte: Autoria própria, 2023

Figura 18 - Imagens obtidas através da coloração com hematoxilina e eosina - Grupo OVX-Z. Aumento de 2.5x e 10x.



Fonte: Autoria própria, 2023

Discussão

5 DISCUSSÃO

Na literatura, ainda não existe um consenso e protocolos científicos, baseados em evidência quanto ao tratamento da osteonecrose.⁹ Neste estudo, foi levantada a hipótese que as terapias locais seriam capazes de prevenir a OMIM em ratas ovariectomizadas tratadas com ácido zoledrônico, promovendo um tecido saudável e reparado após a extração dentária.

Com base nos resultados apresentados pela análise clínica, os autores podem inferir que os grupos que receberam terapias locais no alvéolo dentário apresentaram melhor reparação tecidual, tendo em vista o baixo índice de osso exposto/necrótico, principalmente quando comparados ao grupo OVX-Z. O ZOL pode inibir a reabsorção óssea e promover a apoptose dos osteoclastos alterando a homeostasia do tecido ósseo, prejudicando a dinâmica reabsorção/neoformação ósseas, levando a presença de um osso cortical mais denso, em vez de um tecido vascularizado, aumentando assim a probabilidade de sequestro ósseo associado à inflamação e, conseqüentemente, à infecção local, conforme demonstrado no grupo OVX-Z.^{32,33}

Quando avaliado o reparo alveolar, tanto em tecido ósseo como em mucosa oral, os grupos GD e GO apresentaram uma mucosa íntegra e saudável, sem presença de necrose e exposição ósseas. Trabalho prévio publicado descreveu que o uso de doxiciclina, reduziu a gravidade da perda óssea alveolar local e normalizou a atividade de collagenase patologicamente excessiva na gengiva.¹¹ Além disso, o uso da Doxiciclina auxiliou na prevenção da reabsorção óssea alveolar (em nível macroscópico e microscópico), destacando assim a importância da ação antimicrobiana na prevenção destas lesões.¹⁶ A terapia com ozônio, especialmente via tópica, vem sendo utilizada clinicamente no processo de cicatrização de feridas, como agente terapêutico, antibacteriana e antioxidante.^{34,35} Resultados preliminares de um estudo, demonstraram a eficácia de óleos ozonizados na cicatrização e reepitelização de região afetada (necrose), enfatizando seu efeito promissor e seguro.³⁵ Além disso, altos níveis de colágeno no tecido lesionado podem ser observados após o tratamento com o óleo ozonizado, indicando um processo de reparo de qualidade.³⁴

Quanto a terapia fotodinâmica aplicada em GP, neste trabalho foi obtido resultados menos satisfatórios quando comparados aos grupos GD, GO e GB. Acredita-se que a realização de uma única aplicação não seja suficiente para controlar a exposição óssea no modelo utilizado. Entretanto, estudos prévios publicados mostraram que a aplicação dessa terapia em pacientes submetidos ao uso de bisfosfonatos, após extração dentária, promoveram

uma área reparada, sem nenhum sinal de necrose óssea ou de infecção, promovendo estagnação da lesão de OMIM, diante de um protocolo pré-estabelecido.^{19,36,37} Estudos realizados em camundongos, demonstraram que o uso local do β -TCP nos alvéolos pós-exodônticos auxiliou significativamente o crescimento ósseo e reduziu as áreas necróticas nos alvéolos, melhorando a qualidade óssea em modelos de prevenção e tratamento da OMIM.^{12,14} Entretanto, neste estudo observou-se atraso ou o não fechamento completo da ferida (alvéolo) e exposição óssea na análise clínica de GB, sugerindo que neste modelo animal o biomaterial não foi capaz prevenir eficazmente a OMIM.

Quando analisado os resultados apresentados pela análise microtomográfica (MicroCT), observou-se a caracterização do modelo animal osteopênico. Quando avaliado os parâmetros de BV todos os grupos apresentaram diferença estatística com o grupo OVX-S, corroborando com a literatura que demonstra que além da perda de densidade mineral óssea e, consequente, aumento da fragilidade óssea, a osteopenia também interfere de maneira significativa no remodelamento ósseo, levando a possíveis atrasos durante o reparo tecidual.^{12,29,38}

O parâmetro BV/TV não demonstrou dados estatisticamente significativos entre os grupos. Entretanto, foi possível observar que o grupo SAL e os grupos que possuem tratamento com ZOL apresentaram a porcentagem de volume ósseo maior quando comparada ao grupo OVX-S. Vale salientar que os altos valores dos parâmetros ósseos encontrados nas microtomografias do grupo ZOL, não devem ser lidos como altos valores de osso saudável, ou tampouco, osso vital, uma vez que apresentam indícios de necrose óssea que será ratificada pela análise histológica qualitativa.^{39,40}

Quando avaliado o número de trabéculas, observou-se diferença estatística entre todos os grupos quando comparado com OVX-S, assim como, uma maior média de maior porosidade neste grupo, sugerindo mais uma vez a caracterização deste modelo osteopênico em ratas ovariectomizadas.^{24,41} Pode-se observar ainda que os valores obtidos no parâmetro de porcentagem da porosidade total apresentaram dados inversamente proporcionais ao volume ósseo, sendo GD a maior média de volume ósseo, demonstrando a efetividade da doxíciclina no reparo alveolar e consequentemente, prevenção da OMIM.^{18,42}

Quanto ao parâmetro Tb.Th, o grupo OVX-Z apresentou uma maior média de espessura trabecular. Este resultado pode ser justificado devido ao efeito antirreabsortivo dos bifosfonatos, uma vez que o medicamento atuará diminuindo a remodelação óssea e

consequentemente aumentando a densidade mineral óssea, formando um osso cortical mais denso.^{32,33} Outro parâmetro avaliado foi Tb.Sp, onde observou-se diferença estatística entre o OVX-S e GD, sendo a média de separação de trabéculas maior em OVX-S, uma vez que este tecido se apresenta mais poroso como demonstrado pelo parâmetro Po.tot, enquanto GD recebeu aplicação de ZOL e a ação antimicrobiana da doxiciclina.^{18,42}

Além disso, vale ressaltar que durante a menopausa nas mulheres ocorre a deficiência de estrógeno, com consequente desenvolvimento da osteoporose pós-menopausa.^{1,2} Isto ocorre devido as baixas concentrações de estrógeno, modulando negativamente o remodelamento ósseo, causando um aumento na reabsorção óssea osteoclástica. A rato ovariectomizada (OVX) representa um excelente modelo animal pré-clínico que simula adequadamente as importantes características clínicas do esqueleto humano com depleção de estrogênio e a resposta a agentes terapêuticos. Este modelo já está consolidado na literatura, como um indutor osteopênico por meio da deficiência de estrógeno que se estabelece após a remoção dos ovários.⁴⁸

Em síntese a ovariectomia causa uma deficiência de estrogênio nas ratas, levando a um aumento nas taxas de reabsorção óssea e formação óssea, com a reabsorção excedendo a formação. A coloração com hematoxilina e eosina (H&E) demonstrou que OVX bilateral resultou na perda de massa óssea dos fêmures, trabéculas notavelmente aumentadas com uma estrutura pouco organizada, além de acentuada reabsorção óssea representada pela presença de numerosos osteoclastos na superfície das trabéculas.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o ácido zoledrônico induziu a OMIM, prejudicando o processo de reparo alveolar após a exodontia, porém promoveu a modulação da reabsorção óssea nos fêmures das ratas ovariectomizadas. Além disso, as terapias locais foram capazes de estimular o processo de reparo alveolar, principalmente quando aplicado os tratamentos com gel de doxiciclina 10% e óleo ozonizado, minimizando as consequências do ácido zoledrônico.

REFERÊNCIAS

1. Weycker D, Li X, Barron R, Bornheimer R, Chandler D. Hospitalizations for osteoporosis-related fractures: Economic costs and clinical outcomes. *Bone Rep.* 2016;5:186-91. doi: 10.1016/j.bonr.2016.07.005.
2. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt.* 2015;20(3):038003. doi: 10.1117/1.JBO.20.3.038003.
3. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5):2-12. doi: 10.1016/j.joms.2009.01.009.
4. Kushiro H, Takahashi H, Tanaka A. Effects of the prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw by local administration of a dental pulp stem cell-conditioned medium to the rat tooth extraction socket. *Odontology.* 2021;109(4):836-44. doi: 10.1007/s10266-021-00607-2.
5. Statkievicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, de Sá DP, Casatti CA, Issa JPM, Cintra LTA, de Almeida JM, Nagata MJH, Garcia VG, Theodoro LH, Ervolino E. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2018;184:7-17. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.05.004.
6. Soutome S, Otsuru M, Hayashida S, Murata M, Yanamoto S, Sawada S, Kojima Y, Funahara M, Iwai H, Umeda M, Saito T. Relationship between tooth extraction and development of medication-related osteonecrosis of the jaw in cancer patients. *Sci Rep.* 2021;11(1):17226. doi: 10.1038/s41598-021-96480-8.
7. Aljohani S, Fliefel R, Ihbe J, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. What is the effect of anti-resorptive drugs (ARDs) on the development of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in osteoporosis patients: A systematic review. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(9):1493-502. doi: 10.1016/j.jcms.2017.05.028.
8. Mücke T, Krestan CR, Mitchell DA, Kirschke JS, Wutzl A. Bisphosphonate and medication-related osteonecrosis of the jaw: a review. *Semin Musculoskelet Radiol.*

2016;20(3):305-14. doi: 10.1055/s-0036-1592367.

9. Ruggiero SL, Dodson TB, Aghaloo T, Carlson ER, Ward BB, Kademani D. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022 Update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2022;80(5):920-43. doi: 10.1016/j.joms.2022.02.008.
10. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, Dornelles RCM, Almeida JM, Nagata MJH, Okamoto R, Casatti CA, Garcia VG, Theodoro LH. 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.
11. Golub LM, Lee HM, Stoner JA, Reinhardt RA, Sorsa T, Goren AD, Payne JB. Doxycycline effects on serum bone biomarkers in post-menopausal women. *J Dent Res.* 2010;89(6):644-9. doi: 10.1177/0022034510363367.
12. Hadad H, Kawamata de Jesus L, Piquera Santos AF, Rinaldi Matheus H, de Souza Rodrigues LG, Paolo Poli P, Marcantonio Junior E, Pozzi Semeghini Guastaldi F, Maiorana C, Milanezi de Almeida J, Okamoto R, Ávila Souza F. Beta tricalcium phosphate, either alone or in combination with antimicrobial photodynamic therapy or doxycycline, prevents medication-related osteonecrosis of the jaw. *Sci Rep.* 2022;12(1):16510. doi: 10.1038/s41598-022-20128-4.
13. Monteiro CGJ, Vieira EM, Emerick C, Azevedo RS, Pascoal VAB, Homsy N, Lins RX. Ozonated oil effect for prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) in rats undergoing zoledronic acid therapy. *Clin Oral Investig.* 2021;25(12):6653-9. doi: 10.1007/s00784-021-03951-3.
14. Mikai A, Ono M, Tosa I, Nguyen HTT, Hara ES, Noshio S, Kimura-Ono A, Nawachi K, Takarada T, Kuboki T, Ohashi T. BMP-2/ β -TCP local delivery for bone regeneration in MRONJ-Like mouse model. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19):7028. doi: 10.3390/ijms21197028.
15. Tao ZS, Zhou WS, Tu KK, Huang ZL, Zhou Q, Sun T, Lv YX, Cui W, Yang L. Treatment study of distal femur for parathyroid hormone (1-34) and β -tricalcium phosphate on bone formation in critical-sized defects in osteopenic rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(10):2136-43. doi: 10.1016/j.jcms.2015.09.004.
16. Figueiredo FAT, Shimano RC, Ervolino E, Pitol DL, Gerlach RF, Issa JPM.

- Doxycycline reduces osteopenia in female rats. *Sci Rep.* 2019;9:15316. doi: 10.1038/s41598-019-51702-y.
17. Zhou X, Zhang P, Zhang C, An B, Zhu Z. Tetracyclines inhibit rat osteoclast formation and activity in vitro and affect bone turnover in young rats in vivo. *Calcif Tissue Int.* 2010;86(2):163-71. doi: 10.1007/s00223-009-9328-5.
 18. Bezerra MM, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(5):613-6. doi: 10.1590/s0100-879x2002000500015.
 19. Martins F, Macedo D, Palma LF, Ortega KL, Campos L. Photobiomodulation and antimicrobial photodynamic therapy for the prevention of osteonecrosis of the jaw in an oncologic patient. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;36:102587. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102587.
 20. Krkl C, Yiğit MV, Özercan İH, Aygen E, Gültürk B, Artaş G. The Effect of Ozonated Olive Oil on Neovascularization in an Experimental Skin Flap Model. *Adv Skin Wound Care.* 2016;29(7):322-7. doi: 10.1097/01.ASW.0000484172.04260.46.
 21. Dorry S, Moslemi HR, Yousefi MH, Hamedani MA, Khaligh SG. Study of the effect of topical ozonated oil on healing of calvarial defect. *J Craniofac Surg.* 2021;32(3): e259-63. doi: 10.1097/SCS.00000000000007055.
 22. Kato Y, Sakoh M, Nagai T, Yoshida A, Ishida H, Inoue N, Yanagita T, Nagao K. Ozonated olive oil alleviates hepatic steatosis in obese zucker (fa/fa) rats. *J Oleo Sci.* 2022;71(4):599-607. doi: 10.5650/jos.ess21377.
 23. Tanaka J, Kokuryo S, Yoshiga D, Tsurushima H, Sakaguchi O, Habu M, Nishihara T, Yoshioka I, Tominaga K. An osteonecrosis model induced by oral bisphosphonate in ovariectomised rats. *Oral Dis.* 2015;21(8):969-76. doi: 10.1111/odi.12368.
 24. Li CL, Lu WW, Seneviratne CJ, Leung WK, Zwahlen RA, Zheng LW. Role of periodontal disease in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(1):1-6. doi: 10.1111/clr.12502.
 25. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991;15(3):175-91. doi: 10.1016/0169-6009(91)90124-i.
 26. Pantier LK, Li J, Christian CA. Estrous cycle monitoring in mice with rapid data

visualization and analysis. *Bio Protoc.* 2019;9(17):e3354. doi: 10.21769/BioProtoc.3354.

27. Anbinder AL, Prado MA, Spalding M, Balducci I, Carvalho YR, Rocha RF. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. *Braz Dent J.* 2006;17(3):201-7. doi: 10.1590/s0103-64402006000300005.
28. Luvizuto ER, Dias SS, Okamoto T, Dornelles RC, Okamoto R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol.* 2011;56(10):984-90. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.03.015.
29. Li CL, Seneviratne CJ, Huo L, Lu WW, Zheng LW. Impact of *Actinomyces naeslundii* on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats with periodontitis. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(8):1662-9. doi: 10.1016/j.jcms.2015.07.001.
30. Sharma D, Hamlet S, Vaquette C, Petcu EB, Ramamurthy P, Ivanovski S. Local delivery of hydrogel encapsulated vascular endothelial growth factor for the prevention of medicationrelated osteonecrosis of the jaw. *Sci Rep.* 2021 3;11(1):23371. doi: 10.1038/s41598-021-02637-w.
31. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
32. Chatziravdeli V, Katserás GN, Katsaras D, Doxani C, Stefanidis I, Zintzaras E. A systematic review and meta-analysis of interventional studies of bisphosphonates and denosumab in multiple myeloma and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2022;22(4):596-621.
33. Woodis CB. Once-yearly administered intravenous zoledronic acid for postmenopausal osteoporosis. *Ann Pharmacother.* 2008;42(7):1085-9. doi: 10.1345/aph.1K652.
34. Pai SA, Gagangras SA, Kulkarni SS, Majumdar AS. Potential of ozonated sesame oil to augment wound healing in rats. *Indian J Pharm Sci.* 2014;76(1):87-92.
35. Ripamonti CI, Cislighi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O₃) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: Preliminary results of a phase I-II study. *Oral Oncol.* 2011;47(3):185-90. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.01.002.

36. Magalhães IA, Forte CPF, Viana TSA, Teófilo CR, Lima Verde RMB, Magalhães DP, Praxedes Neto RAL, Lima RA, Dantas TS. Photobiomodulation and antimicrobial photodynamic therapy as adjunct in the treatment and prevention of osteoradionecrosis of the jaws: a case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;31:101959. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101959.
37. Minamisako MC, Ribeiro GH, Lisboa ML, Mariela Rodríguez Cordeiro M, Grando LJ. Medication-related osteonecrosis of jaws: a low-level laser therapy and antimicrobial photodynamic therapy case approach. *Case Rep Dent.* 2016;2016:6267406. doi: 10.1155/2016/6267406.
38. Tanaka Y, Aung KT, Ono M, Mikai A, Dang AT, Hara ES, Tosa I, Ishibashi K, Ono-Kimura A, Nawachi K, Kuboki T, Ohashi T. Suppression of bone necrosis around tooth extraction socket in a MRONJ-like mouse model by E-rhBMP-2 containing artificial bone graft administration. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 26;22(23):12823. doi: 10.3390/ijms222312823.
39. 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):632-6. doi: 10.1111/jop.12546.
40. Abe K, Yoshimura Y, Deyama Y, Kikuri T, Hasegawa T, Tei K, Shinoda H, Suzuki K, Kitagawa Y. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med.* 2012;29(6):1007-15. doi: 10.3892/ijmm.2012.952.
41. 45. Liu J, Mattheos N, Deng C, Su C, Wang Z, Luo N, Tang H. Management of medication-related osteonecrosis of jaw: Comparison between icariin and teriparatide in a rat model. *J Periodontol.* 2021;92(1):149-58. doi: 10.1002/JPER.19-0620.
42. Oh SH, Nam BR, Lee IS, Lee JH. Prolonged anti-bacterial activity of ion-complexed doxycycline for the treatment of osteomyelitis. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;98:67-75. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.11.006.
43. Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001;1(3):193-207.

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de Ética



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito de diferentes terapias locais na prevenção da osteonecrose dos maxilares em ratas ovariectomizadas. Estudo in vivo", Processo FOA nº 0616-2022, sob responsabilidade de Francisley Ávila Souza apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 26 de Agosto de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 26 de Março de 2024.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 28 de Abril de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Effect of different local therapies in the prevention of osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats. In vivo study", Protocol FOA nº 0616-2022, under the supervision of Francisley Ávila Souza presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 26, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 28, 2024.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 28, 2024.

Prof. Dr. João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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