

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 16/10/2024.



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

HENRIQUE HADAD

**PREVENÇÃO DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR
MEDICAMENTOS COM A UTILIZAÇÃO DA TERAPIA
FOTODINÂMICA, BIOMATERIAL E DOXICICLINA. ESTUDO
EXPERIMENTAL IN VITRO E IN VIVO**

**ARAÇATUBA - SP
2023**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

HENRIQUE HADAD

**PREVENÇÃO DA OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR
MEDICAMENTOS COM A UTILIZAÇÃO DA TERAPIA
FOTODINÂMICA, BIOMATERIAL E DOXICICLINA. ESTUDO
EXPERIMENTAL IN VITRO E IN VIVO**

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

Orientador: Prof. Dr. Francisley Ávila Souza.

**ARAÇATUBA - SP
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

H125d Hadad, Henrique.
Prevenção da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos com a utilização da terapia fotodinâmica, biomaterial e doxíciclina. Estudo experimental in vitro e in vivo / Henrique Hadad. - Araçatuba, 2023
178 f. : il. ; tab.

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

1. Osteonecrose 2. Fotoquimioterapia 3. Doxíciclina
4. Alvéolo dental 5. Materiais biocompatíveis I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Início meus agradecimentos sendo grato **a Deus**, por tudo que me proporcionou durante esses anos de pós-graduação. Eu sonhei com essa oportunidade, e foram tantos os pedidos para que hoje eu pudesse estar onde estou, e eu fui agraciado por ter essa oportunidade de estudar em Faculdade de excelência como essa. Agradeço a Ele por nunca ter me desamparado, e por sempre me mostrar luz mesmo quando eu não conseguia enxergar nada, agradeço mais ainda por essa Jornada linda que eu passei, por tantas oportunidades que tive e por tantas pessoas que conheci.

Nos agradecimentos do meu Mestrado, eu cito a importância de se acreditar no sonho para que ele se torne realidade. Hoje, completando mais uma etapa na minha carreira acadêmica, venho destacar a importância que a minha família teve para que meu sonho se tornasse realidade. Eu fui muito fortunado de ter na minha base familiar pessoas que primeiro, incentivarem a educação como oportunidade de crescimento e evolução, e também pela sua resiliência em deixar seus amados voarem para crescer.

Nessa jornada, destaco aqui minha avó **Amélia Chead Hadad de Lima**, que sempre foi uma mulher muito afrente do seu tempo. Filha de libaneses que chegaram ao Brasil sem saberem ler e escrever e mesmo assim a incentivaram a estudar. Meu maior exemplo dentro na educação e no amor, minha avó se graduou pelo Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo em 1958, e posteriormente se torna uma das primeiras Professoras de Ciências da minha cidade. Admiro sua trajetória reta e trabalho árduo para criar seus filhos e se manter como eximia Professora. Deixo aqui registrado, minha imensa gratidão por tudo que fez por nossa família, por tudo que fez por mim e pela minha irmã Laura. A minha avó Amélia, agradeço por ser minha fonte de amor inesgotável, por me trazer tranquilidade em tempos difíceis e principalmente por compreender e guiar minha jornada.

A minha mãe **Maria Amélia Hadad de Lima** e minha irmã **Laura Hadad**, por serem uma fonte de amor e alegria. Vocês possuem uma habilidade rara no mundo que é a habilidade social e comunicativa, que contagia as pessoas por onde passa com alegria e simplicidade. É impossível estar ao lado de vocês e não se sentir essa energia que transborda e que ampara tantas pessoas. Obrigado por estarem ao lado, por me amarem tanto.

Aos meus tios **José Carlos Hadad de Lima**, **Roberto Hadad de Lima** e **Sandra Hadad de Lima**, que são minha fonte inesgotável de amor, carinho e suporte; que foram presentes em todas as etapas da minha vida, que me guiaram e incentivaram nos momentos mais difíceis, e que torcem e vibram com todas as minhas conquistas como se fossem as deles (e são, pois, nada disso seria possível sem a ajuda de cada um de vocês). Obrigado por sempre me conduzirem no melhor caminho, por me oferecerem as melhores oportunidades e educação. Amo vocês e serei eternamente grato! E também aos meus primos **Carolina**, **Marco Aurélio**, **Sarah**, e **Pedro**, por estarem presente durante essa caminhada, na casa da avó Amélia compartilhando amor e felicidade.

Ao **Professor Dr. Francisley Ávila Souza**, agradeço por me escolher ser parte do grupo em 2018 no mestrado e por confiar no meu potencial. Ser seu orientado é algo único para qualquer pessoa. Muito além dos ensinamentos científicos, publicações, e laboratório, o senhor trás para nosso grupo o ensinamento da vida. Sempre adepto do positivismo, e com uma habilidade social incrível o senhor sempre fez questão de construir um ambiente calmo, respeitoso, alegre e agregador. Minha gratidão pela confiança que me foi dada pelo senhor durante esses últimos 6 anos, pela amizade que criamos e por todas as oportunidades que o senhor me ofereceu. Estendo também meus agradecimentos a sua esposa **Heloisa Helena Nímia** e seus filhos **Marina** e **Eduardo**, que sempre estiveram presente nas nossas comemorações e celebraram nossas conquistas, e sempre me receberam com muito carinho em sua casa.

Quando eu menciono grupo de pesquisa, eu jamais poderia deixar de citar aqui o **Professor Dr. Paulo Sérgio Perri de Carvalho**, não só pela sua incontestável, história, habilidade e sabedoria na Implantodontia, mas como nosso mentor. O senhor, mesmo que distante, sempre nos guiou nas pesquisas e nos possibilitou inúmeras oportunidades. Deixo meu respeito pela sua excelência, sua dedicação e paixão pela pesquisa. Agradeço também por ter confiado em mim desde meu início da pós-graduação, e por permitir acompanhar sua rotina clínica onde eu aprendi tanto. Ver o senhor ministrar uma aula é algo estonteante tamanha quantidade de ensinamento que o senhor passa.

Ao **Professor Dr. Juliano Milanezi de Almeida**, agradeço por toda a parceria com o nosso grupo de pesquisa. Obrigado por dividir seus conhecimentos comigo durante esses anos, e por contribuir com o nosso crescimento.

Ao **Professor Dr. Ronaldo Célio Mariano**, agradeço o seu incentivo constante e por todos os ensinamentos. Minha Jornada na cirurgia começou com o senhor, tenho muito carinho e muito respeito pela sua história e dedicação na docência. Obrigado por todas as oportunidades e por todos os caminhos que o senhor me abriu durante a graduação e pós-graduação. Eu disse isso na defesa do Mestrado e vou repedir aqui, ser seu aluno é uma oportunidade única na vida, é poder vivenciar uma vida de ensinamentos. Muito obrigado por todas as oportunidades e por toda orientação.

A **Professora Dra. Daniela Ponzoni**, obrigado por todas as oportunidades que senhora me proporcionou, por confiar tanto no meu trabalho. Eu admiro seu jeito de conduzir os trabalhos, sempre calma, organizada e muito centrada. Gostaria de agradecê-la por tudo, e em especial pela sua dedicação clínica da pós-graduação, juntamente com a Profa. Ana Paula, que me permitiram operar muitos casos e melhorar minha habilidade cirúrgica.

Ao **Professor Dr. Fernando Pozzi Semeguini Guastaldi**, minha eterna gratidão por ter me proporcionado uma das melhores e maiores experiências da minha vida. A internacionalização durante o doutorado foi uma oportunidade única que só foi possível graças a toda dedicação e disposição do senhor em organizar toda a documentação com escritório internacional durante a pandemia para me receber. Agradeço por todo conhecimento compartilhado, por todas as pessoas que o senhor me apresentou, por acreditar no meu potencial, e por me incentivar a continuar na academia. Estendo meus agradecimentos também a sua esposa **Rita Souza**, que sempre esteve presente nos momentos de descontração e celebração durante meu período em Boston.

Also, I would like to extend my sincere appreciation to all the friends I made during this experience in Boston, **Nelson Carvajal, Jessica Burke Pallotta, Nick DeLuca, María Béjar-Scribner, Tina Jones, Kalyn McGuire**, who provided me with incredible moments and an immense exchange of knowledge. In particular, I would like to thank **Nicolò Rossi, Yanis Berkane, Anet Calisir, David Kostyra, Fernanda Boos Lima** and **Thalisa Buehl** for being so affectionate during this period of Fellowship. My biggest fear during this fellowship was not being able to make friends and being alone, and I never felt alone. Instead, we shared some incredible moments; I learned a lot from you, and I admire each of your journeys. I look forward to meeting you all again, whether in Boston or anywhere else in the world. I also thank **Dr Mark**

Randolph, Dr Robert Redmond, Dr Youssef Jounaidi, Dr Sara Pai, and Dr Joseph McCain for giving me opportunities in their respective departments, allowing me to expand my knowledge.

Aos Professores da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, **Professor Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, Professor Dr. Osvaldo Magro Filho, Professora Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Professora Dra. Daniela Ponzoni, Professora Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, Professor Dr. Leonardo Perez Faverani**, por me receberem de portas abertas nessa Instituição, por me ensinarem tanto, por acreditarem na educação de excelência e na prática clínica com ética e qualidade. Sinto um orgulho imenso de ter sido aluno nessa casa que formou tantos nomes da Cirurgia e Traumatologia BucoMaxiloFacial, e foi pioneira na pesquisa dentro da área.

Ao **Professor Dr. Idelmo Rangel García-Júnior**, toda minha gratidão pelos ensinamentos durante esses anos de convívio. Obrigado por compartilhar sua história e sua habilidade cirúrgica conosco e nos permitir aprender sempre.

Ao **Professor Dr. Osvaldo Magro Filho**, obrigado por permitir que pudesse exercer meu Estágio de Docência em sua ala de cirúrgica e por dividir comigo seus conhecimentos desde o primeiro ano da pós-graduação.

A **Professora Dra. Ana Paula Farnezi Bassi**, me faltam palavras para agradecer todo o carinho durante todos esses anos. Não sei quantas vezes eu fui à sua sala buscando por uma palavra de conforto e a senhora sempre estava disponível. A senhora é um espelho na docência e eu tenho um carinho e respeito enorme pela senhora. Obrigado!

A **Professora Dra. Alessandra Marcondes Aranega**, que me deu a oportunidade de poder conhecer o CAOE, e que confiou no meu potencial e me permitiu poder operar e aprender tanto dentro desse centro de ensino. Obrigado por todo carinho e por sempre lembrar de mim nos eventos do grupo PET e por sempre me oferecer oportunidades.

Ao **Professor Dr. Leonardo Perez Faverani**, uma inspiração na prática cirúrgica e na pesquisa. Agradeço por ter me ensinado tanto durante esses anos, por sempre me incentivar e por todas as oportunidades.

Aos Professores da PG que sempre estiveram com as portas abertas, compartilhando seu conhecimento e laboratórios com a nossa equipe **Professora Dra. Sandra Helena Penha de**

Oliveira, Professor Dr. Juliano Milanezi de Almeida, Professora Dra. Roberta Okamoto. Obrigado pela parceria, pela ajuda e por permitir que seus alunos nos ajudassem no desenvolvimento da pesquisa.

Aos Colegas dessa Jornada na pós-graduação **Bruno Coelho Mendes, Breno dos Reis Fernandes, Bruna Junger, Yasmin Comoti Vita Bantin, Vinícius Ferreira Bizelli, Edith Umasi Ramos e Izabella Sol, Paulo Matheus Honda Tavares, Harrisson Lucho Mamani Valeriano, Nelson Padilha Silva** por dividir a caminhada, pela amizade e os bons momentos.

A minha amiga **Laís Kawamata de Jesus**, que foi minha maior parceira nessa pós-graduação desde 2019. Criamos um laço de amizade desde seu início no grupo. Não sabia se seríamos bons amigos porque nessa época você ainda não tomava café e não conversava muito. E eu fui muito abençoado com a sua amizade. Eu sou muito grato por ter tido a oportunidade de conhecer alguém com o seu potencial, talento, organização e principalmente com um coração bom. Obrigado por estar ao meu lado em cada etapa dessa pesquisa e por me aconselhar todos os dias. Durante a pandemia, vivemos um dos momentos mais assustadores do mundo e nós estávamos lá, juntos, terminando as etapas do seu mestrado e começando o meu doutorado. Você foi a pessoa que eu tive a oportunidade de ensinar tudo o que eu aprendi na pós-graduação e seu crescimento foi exponencial. Cada etapa do meu projeto tem sua amizade, sua dedicação, sua ajuda, e principalmente sua parceria. Eu torço que você tenha um futuro lindo e de muitas conquistas, e em especial torço para estarmos juntos um dia, dando aula em uma Universidade. Obrigado pela amizade. Estendo meus agradecimentos a sua mãe **Olga Tyoko** que me recebeu com muito carinho, e que confiou em mim como seu amigo. Agradeço por sempre torcer pelas minhas conquistas e por sempre mandar umas comidinhas gostosas para alegrar nossos dias.

Ao meu amigo e irmão **Rodrigo Capalbo da Silva**, com quem eu tive a honra e a felicidade de iniciar essa Jornada em 2018. Sou muito grato de ter tido ao meu lado uma pessoa tão receptiva, do bem durante a pós-graduação e que me recebeu em Araçatuba de coração aberto. Eu tenho inúmeros momentos incríveis da nossa amizade durante esses anos e vou guardá-los comigo para sempre. Não bastasse a convivência na pós-graduação fizemos a especialização em Implantodontia juntos e foi mais uma oportunidade de te conhecer melhor. Você é uma pessoa incrível, que sempre esteve presente na minha vida, sempre me incentivou a ser uma pessoa melhor, que me deu todo o incentivo durante a jornada na pós e principalmente

que acreditou no meu potencial. Estendo meus agradecimentos aos seus pais **Jorge Luís da Silva Vieira** e **Erica Cristina Capalbo da Silva** e seu irmão **Rafael Capalbo da Silva** que sempre me receberam com muito carinho na sua casa.

A minha primeira amizade de Araçatuba **Raquel Parra Barroso da Silva**, obrigado por me acolher com tanto carinho desde os primeiros dias da pós-graduação. Durante esses anos, compartilhamos inúmeros momentos, conquistas, felicidades, experiências e você sempre estava presente em todos os momentos. Sou muito grato por você ter aberto as portas da sua casa, me apresentado seus pais **Sr. Jose Aparecido da Silva** e **Marli Parra Barroso da Silva**, que são pessoas que admiro e respeito imensamente. Muito além da pós-graduação, nossa amizade se estendeu para a vida. Eu aprendi muito com você e eu te admiro demais. Obrigado por tudo!

A minha amiga **Luara Teixeira Colombo**, que foi a primeira pessoa que eu conheci dentro do grupo do Professor Francisley. Eu lembro de chegar ao departamento 10A na segunda-feira cedinho e ser recebido por você com tanto carinho. Obrigado por todo suporte que você me deu durante a pós-graduação. Durante minha caminhada na pós-graduação você sempre esteve no meu coração e sempre estará. Tenho muitas saudades de você.

A minha amiga e conterrânea **Hiskell Francine Fernandes e Oliveira**. Engraçado como a vida tem um jeito estranho de trazer certas as pessoas para as nossas vidas. Eu te conhecia por nome, mas nunca achei que seríamos amigos. E hoje tenho a imensa felicidade de ter dividido esses anos de pós-graduação com você. Eu sou muito grato por ter você na minha vida, por todas as nossas conversas (de horas e horas, sem parar), pela sua amizade e por toda torcida que você tem por mim. Você é uma pessoa incrível e de muita luz, e que me acolheu em Araçatuba e que faz questão de estar presente no dia a dia, sempre convidando para um breve cafezinho, ou tomando um vinho. Estendo meus agradecimentos aos seu país **Helenice Fernandes e Oliveira** e **Amancio de Oliveira**, que sempre me receberam bem e com muito carinho em Araçatuba e em Ipuã.

Ao meu amigo **Henrique Rinaldi Matheus**, obrigado por compartilhar uma das melhores experiência da minha vida. Agradeço por toda ajuda e por cada conselho. Você é uma pessoa incrível, com um coração enorme e uma mente extraordinária. Sua dedicação e foco me inspiram a querer ser melhor e poder conviver e aprender com você em Boston foi sensacional. Fico muito feliz que nos aproximamos e podemos criar essa amizade linda, por me ensinar tanto e sempre me incentivar. Obrigado por tudo!

A minha amiga ***Karen Rawen Tonini***, agradeço por todos os momentos compartilhados dentro e fora da universidade. Por toda a sua ajuda sempre, por dividir os momentos de stress e muito cafezinho, pelas jantinhas sempre deliciosas na sua casa com a Beth nos julgando.

A minha amiga ***Ana Flávia Piquera Santos***, parceira de pós-graduação durante 6 anos. Obrigado pelos momentos que dividimos no departamento conversando ou pesquisando. Você é uma pessoa incrível, extremamente dedicada e do bem.

A minha amiga ***Maria Eduarda de Freitas Santana Oliveira***, que felicidade a nossa de tê-la no nosso grupo. Obrigado por sempre ser tão dedicada e presente em todas as atividades, por compartilhar sua felicidade e carinho todos os dias. Convivemos por tão pouco tempo, mas você fez questão de estar presente em cada etapa dessa pesquisa no último ano, e muito além da pesquisa você tornou-se uma pessoa querida e que vou levar no meu coração para sempre.

A minha amiga ***Maisa Pereira da Silva***, gratidão pelo nosso tempo de trabalho juntos. Sua dedicação e colaboração foram fundamentais para o crescimento do nosso grupo de pesquisa. Obrigado por ser sempre presente, pelas risadas e por todo conhecimento compartilhado.

A minha primeira orientada de Iniciação Científica, ***Letícia Gabriella de Souza Rodrigues***, agradeço por toda a sua ajuda durante a execução dessa pesquisa. Com toda certeza sem a sua ajuda isso não teria sido possível. Nós começamos essa pesquisa meses antes do início da Pandemia, e como a pesquisa já estava em andamento quando as restrições começaram não tínhamos como parar. Mesmo assim, você sempre esteve presente para ajudar a aplicar a medicação e cuidar dos ratos, comigo e com a Laís. Você é pessoa de coração imenso, que traz felicidade e carisma por onde passa, obrigado por toda ajuda e por carinho nesses anos.

Deixo também registrado gratidão a todas as pessoas que de alguma forma de ajudaram e me incentivaram a estar aqui. Nessa caminhada eu fui muito abençoado de ter pessoas do bem ao meu lado, agradeço a ***Amanda Correa***, que me acolheu 2 anos em sua casa durante minha Faculdade em Franca, a ***Dr. Mariangela Baptistussi***, quem me deu a primeira oportunidade de estágio na odontologia, a ***Dr. Fernanda Gould Nakano***, quem me inspirou a ser Cirurgião-dentista.

Agradeço também aos Professores que de alguma forma me inspiraram a seguir na área acadêmica ***Professora Dra. Luciana Assirati Casemiro***, ***Professora Dra. Soraya Marangoni***,

Professora Dra. Alessandra Campos, Professora Dra. Greciana Bruzi, Professor Dr. Marcelo Taveira Barbosa, Professor Dr. João Adolfo Costa Hanemann e que me proveram tantos ensinamentos durante a graduação. Em especial, agradeço ao ***Professor Dr. Felipe Fornias Sperandio*** que me possibilitou a primeira bolsa de IC na área de Patologia, e com quem eu tive minha primeira publicação científica. Gratidão imensa por todo cuidado e carinho que recebi de cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

A *Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA/UNESP)* na pessoa do atual diretor **Professor Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**. Agradeço o acolhimento e o conhecimento que foi passado a mim. Essa faculdade representa um centro de excelência em formar de novos profissionais. E nítido a competência e dedicação dos professores e funcionários dessa instituição na formação acadêmica de cada aluno. Minha eterna gratidão a essa Universidade que me fez tão feliz e que me proporcionou grandes amizades e aprendizado.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Odontologia*, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com o atual Coordenador **Professor Dr. Wirley Gonçalves Assunção**.

Aos *funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP)* pela disponibilidade, paciência e gentileza em todas as etapas do mestrado, em especial as Servidoras **Cristiane Regina Lui Matos** e **Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto**. Agradeço o trabalho sempre eficiente por vocês desempenhado.

Aos *funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP)* pela prontidão em nos atender.

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, **Renato Gomes de Oliveira**, **Marco Aurélio de Oliveira Ianner** e **Paulo Roberto Gratão** pela prontidão, auxílio e carinho.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, pela concessão da Bolsa de Doutorado **(2019/22657-8)** durante os anos de pós-graduação. Agradeço por promover o apoio financeiro que me permitiu a realização do doutorado.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001*, pela concessão da Bolsa de Internacionalização no programa **CAPES PrInt (88887.570145/2020-00)** durante o doutorado, que me permitiu realizar um Fellowship de 12 meses no Massachusetts General Hospital (MGH), Harvard School of Dental Medicine (HSDM) em Boston (MA, EUA).

Ao *Massachusetts General Hospital, Harvard School of Dental Medicine* na pessoa do Chefe do Programa de Cirurgia e Traumatologia BucoMaxiloFacial, **Dr Zachary S Peacock**, e em especial ao Diretor do *Skeletal Biology Research Center*, **Professor Dr. Fernando Pozzi Semeghini Guastaldi**.

A *Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr/UNESP)* na pessoa do **Professor Dr. Elcio Marcantonio** e da Técnica **Suleima Ferreira** por permitirem a utilização do Laboratório de Análise Histopatológica para Cortes não Descalcificados, e da **Professora Dr. Paula Aboud Barbugli** pela orientação no Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal.

Ao *Laboratório de Multiusuário - Sala de Microtomografia Computadorizada* na pessoa do **Professor Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Ao *Centro de Assistência Odontológica à Pessoa com Deficiência (CAOE)*, na pessoa da **Professora Dra. Letícia Helena Theodoro**, da **Professora Dra. Alessandra Marcondes Aranega**, da Enfermeira **Juliana Franco de Angelis** e equipe.

Ao **Laboratório de Endodontia**, coordenado pelo **Professor Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra** por permitir a utilização do Microscópio Polarizado para análise de birrefringência, e a sua aluna de Doutorado **Juliana Goto** pela orientação e assistência.

Ao *Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados*, coordenado pela **Professora Dra. Roberta Okamoto**.

Ao *Laboratório de Imunofarmacologia de Araçatuba*, coordenado pela **Professora Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira**.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

Hadad H. Prevenção da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos com a utilização da terapia fotodinâmica, biomaterial e doxíciclina. Estudo experimental in vitro e in vivo [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2023.

RESUMO

Os bifosfonatos (BF's) são medicamentos antirreabsortivos empregados no tratamento de distúrbios esqueléticos, como a osteoporose, porém seu uso prolongado pode induzir a osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos (OMIM), e o tratamento desta condição representa um desafio para odontologia. Esse projeto foi dividido em 4 capítulos, de modo que no Capítulo 1, o objetivo do trabalho foi avaliar os resultados de vários modelos animais de roedores para estudar a OMIM. Após uma busca na literatura, seguindo a estratégia PICO estabelecida em 2004 artigos foram localizados e 118 corroboraram com os fatores de inclusão (estudo in vivo em roedores avaliando a extração dentária como um fator de risco para o desenvolvimento da OMIM). Os resultados demonstram diversos estudos que estabeleceram protocolo para indução da OMIM. O ácido zoledrônico (ZA) foi o medicamento mais utilizado, seguido pelo alendronato (ALN). Mesmo quando o ZA não levou ao desenvolvimento de MRONJ, seu efeito comprometeu a homeostase do osso e do tecido mole. A associação de outros fatores de risco (dexametasona, diabetes e doenças inflamatórias locais), além da extração dentária também desempenharam um papel importante no desenvolvimento da OMIM. Além disso, os estudos demonstraram uma relação entre a dose e o desfecho e entre a frequência e a via de administração. Desse modo, conclui-se que o ZA pode causar OMIM em roedores, e que procedimentos cirúrgicos e doenças inflamatórias locais na cavidade oral são elementos-chave no desenvolvimento da OMIM; No Capítulo 2, o objetivo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de ácido zoledrônico (ZA) durante a diferenciação osteogênica de células-tronco da medula óssea humana (hBMSCs). Para tal, a diferenciação osteogênica das hBMSCs foi conduzida com diferentes concentrações de ZA (0, 0,1, 1,0 e 5,0 μ M) durante os primeiros 3 dias. O metabolismo celular foi quantificado em 1, 3, 7 e 14 dias. Aos 7 e 14 dias, foram realizadas as seguintes análises: a) ensaio de nódulo de mineralização, b) LIVE/DEAD™, c) adesão e espalhamento celular, d) atividade da fosfatase alcalina (ALP) e e) análise qPCR para RUNX-2, ALPL e COL1 A1. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias, seguido pelo teste post hoc de Tukey ($p < 0,05$). O metabolismo celular (3, 7 e 14 dias) ($p < 0,001$), a mineralização (7 e 14 dias) ($p < 0,001$) e a atividade de ALP (14

dias) ($p < 0,001$) foram reduzidos em ZA 5,0 μM quando comparados ao controle (sem ZA). Além disso, a ZA 5,0 μM reduziu a expressão de RUNX2 aos 7 e 14 dias ($p < 0,001$). Desse modo, concluiu-se que a ZA (5,0 μM) pode prejudicar a diferenciação de hBMSC em osteoblastos e interferir em sua fase de mineralização; No Capítulo 3, o objetivo foi avaliar as terapias preventivas para OMIM. Após quatro ciclos de administração de ácido zoledrônico (35 $\mu\text{g/kg}$ a cada 15 dias), os ratos *Wistar* tiveram seus molares extraídos e foram organizados em nove grupos de tratamento: grupo de controle negativo (NCG), tratado com solução salina e coágulo sanguíneo no alvéolo; grupo de controle positivo (PCG), com coágulo sanguíneo no alvéolo; BG, biomaterial à base de β -fosfato tricálcico; DG, gel de doxiciclina a 10%; aG, terapia fotodinâmica antimicrobiana; e DBG, aBG, aDG e aDBG, usando terapia combinada. Após 28 dias, o menor volume ósseo (BV/TV) foi registrado em PCG ($42,17\% \pm 2,65$) e o maior em aDBG ($69,85\% \pm 6,25$) ($p < 0,05$). Os valores mais altos da taxa de aposição mineral diária foram registrados no aDBG ($2,64 \pm 0,48$) e no DBG ($2,30 \pm 0,37$) ($p < 0,001$). Além disso, o aDBG apresentou a maior área de osso neoformado ($82,44\% \pm 2,69$) ($p < 0,05$). O osso não vital foi relatado apenas no GPC ($37,94 \pm 18,70\%$). Devido ao papel fundamental do biomaterial, a abordagem combinada (aDBG) foi a mais eficaz na prevenção de MRONJ após a extração dentária; No Capítulo 4, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito tópico da doxiciclina gel (10%) na prevenção da OMIM. Para isso, ratos *Wistar* (72) foram tratados com 70 μg de ZA/mês por 2 meses e, em seguida, foi realizada a extração do primeiro molar, um grupo recebeu apenas um coágulo no alvéolo (grupo ZA), outro recebeu um gel de doxiciclina a 10% (DOXI), enquanto o grupo controle foi tratado sistemicamente com solução salina (SAL). Após 7, 14 e 28 dias, as amostras foram submetidas a a) análise histomorfométrica, b) imunohistoquímica e c) maturação das fibras de colágeno. Os dados demonstraram que a DOXI apresentou maior área de osso novo quando comparada à ZA em 7 ($p = 0,0058$), 14 e 28 dias ($p < 0,0001$), e a quantidade de osso não vital na ZA ($44,17 \pm 10,93\%$) foi estatisticamente significativa somente aos 28 dias ($p < 0,0001$) quando comparada à SAL e à DOXI. A marcação TRAP foi semelhante para ZA e DOXI, exceto aos 28 dias, quando ZA apresentou marcação leve, enquanto DOXI apresentou marcação moderada. Além disso, a marcação de OCN foi semelhante entre os grupos ZA e DOXI, porém, aos 7 dias, o DOXI apresentou marcação moderada, enquanto o ZA apresentou marcação leve. O grupo DOXI apresentou uma quantidade maior de fibras de coloração amarelo-esverdeada nos dias 14 e 28 ($p = 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente), quando comparado ao grupo ZA. Eles

também apresentaram maior maturação das fibras de colágeno (cor vermelho-amarelada) nos dias 14 e 28 ($p = 0,0027$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Desse modo, concluiu-se que a doxiciclina parece ser um agente eficaz e seguro na prevenção da OMIM.

Palavras-chave: Osteonecrose. Terapia fotodinâmica. Doxiciclina. Alvéolo Dental. Materiais biocompatíveis.

Hadad H. Doxycycline, beta-tricalcium phosphate and aPDT applied as a preventive method for MRONJ. In vitro and in vivo experimental study [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2023.

ABSTRACT

Bisphosphonates (BP's) are anti-resorptive drugs used in the treatment of skeletal disorders, such as osteoporosis, but their prolonged use may induce osteonecrosis of the jaw (MRONJ), which represents a challenging treatment for dentistry. This thesis were divided in 4 chapters, in this way, Chapter 1 aimed to assess the outcomes of several rodent animal models for studying medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). After a search of the databases, 2004 articles were located, and 118 corroborated the inclusion factors (*in vivo* studies in rodents evaluating tooth extraction as a risk factor for the development of MRONJ). Numerous studies attempting to establish an optimal protocol to induce MRONJ were found. Zoledronic acid (ZA) was the most used drug, followed by alendronate (ALN). Even when the ZA did not lead to the development of MRONJ, its effect compromised the homeostasis of the bone and soft tissue. The association of other risk factors (dexamethasone, diabetes, and inflammatory dental disease) besides tooth extraction also played a role in the development of MRONJ. In addition, studies demonstrated a relationship between dose and outcome and between frequency and administration route for MRONJ. Thus, it was concluded that ZA may cause MRONJ in rodents. Surgical procedures and inflammatory dental disease in the oral cavity are key elements in starting MRONJ; Chapter 2 aimed to evaluate the effects of different concentrations of ZA during the osteogenic differentiation of human Bone Marrow Stem Cells (hBMSCs). Thus, osteogenic differentiation of hBMSCs were conducted with different concentrations of ZA (0, 0.1, 1.0, and 5.0 μ M) for the first 3-days. Cell metabolism was quantified at 1-, 3-, 7-, and 14 days. At 7- and 14-days, the following analyses were performed: a) mineralization nodule assay, b) LIVE/DEAD™, c) cell adhesion and spreading, d) alkaline phosphatase (ALP) activity, and e) qPCR analysis for RUNX-2), ALPL, and COL1 A1. Data were analyzed by ANOVA 2-way, followed by Tukey's post hoc test ($p < 0.05$). Results demonstrated that cell metabolism (3-, 7-, and 14-days) ($p < 0.001$), mineralization (7-, 14-days) ($p < 0.001$), and ALP activity (14-days) ($p < 0.001$) were reduced in ZA 5.0 μ M when compared to control (no ZA). Also, ZA 5.0 μ M downregulated the expression of RUNX2 at 7- and 14-days ($p < 0.001$). It is possible to conclude that ZA (5.0 μ M)

can impair hBMSC differentiation into osteoblasts and interferes with its mineralization phase; Chapter 3 aimed to evaluate the preventive therapies for MRONJ. Following four cycles of zoledronic acid administration, *Wistar* rats had their molar extracted, and were organized into nine treatment groups: negative control group (NCG), treated with saline solution and blood-clot in the alveolus; positive control group (PCG), with blood-clot in the alveolus; BG, β -tricalcium phosphate-based biomaterial; DG, 10% doxycycline gel; aG, antimicrobial photodynamic therapy; and DBG, aBG, aDG, and aDBG, using combination therapy. After 28 days, the lowest bone volume (BV/TV) was reported in PCG ($42.17\% \pm 2.65$), and the highest in aDBG ($69.85\% \pm 6.25$) ($p < 0.05$). The higher values of daily mineral apposition rate were recorded in aDBG (2.64 ± 0.48) and DBG (2.30 ± 0.37) ($p < 0.001$). Moreover, aDBG presented with the highest neoformed bone area ($82.44\% \pm 2.69$) ($p < 0.05$). Non-vital bone was reported only in the PCG ($37.94 \pm 18.70\%$). Owing to the key role of the biomaterial, the combination approach (aDBG) was the most effective in preventing MRONJ following tooth extraction; and Chapter 4 aimed to assess the topical effect of doxycycline gel (10%) during bone repair in vivo on the osteonecrosis model. For this purpose, *Wistar* rats (72) were treated with 70 μg of ZA/month for 2 months, then extraction of the first molar was performed, one group received only a clot in the socket (ZA group), one received a 10% doxycycline gel (DOXI), while the control group was treated systemically with saline solution (SAL). After 7, 14, and 28 days, samples were submitted for a) histomorphometric analysis, b) immunohistochemical, and c) collagen fibers maturation. Data demonstrated that DOXI presented higher new bone area when compared to ZA in 7 ($p = 0.0058$), 14, and 28 days ($p < 0.0001$), and the amount of non-vital bone in ZA ($44.17 \pm 10.93\%$) was statistically significant only at 28 days ($p < 0.0001$) when compared to SAL and DOXI. TRAP labelling was similar for ZA and DOXI, except for 28-day when ZA presented mild labelling, while DOXI showed moderate labelling. Also, OCN labelling was similar between the ZA and DOXI groups, however at 7 days DOXI showed moderate labelling, while ZA showed mild labelling. DOXI group presented a higher amount of collagen type 3 (greenish-yellow coloured) fibers on days 14 and 28 ($p = 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively), when compared to ZA. They also showed greater maturation of collagen fibers – type 1 (yellowish-red colour) on days 14 and 28 ($p = 0.0027$ and $p < 0.0001$, respectively). Conclusion: doxycycline seems to be an effective agent in the prevention of osteonecrosis.

Keywords Osteonecrosis. Photodynamic Therapy. Doxycycline. Tooth Socket. Biocompatible materials.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Characteristics of studies evaluating Zoledronic Acid [Physiologic Dose ($\leq 200\%$ of rat ZA oncology dose)].	79
Table 2. Overall characteristics of studies evaluating Zoledronic Acid [Supraphysiologic Dose ($>200\%$ $>1000\%$ of rat ZA oncology dose)].	81
Table 3. Overall characteristics of studies evaluating Zoledronic Acid [Extremely Supraphysiologic Dose ($\geq 1000\%$ of rat ZA oncology dose)].	83
Table 4. Overall characteristics of the studies evaluating Alendronate.	85
Table 5. Overall characteristics of studies using Zoledronic Acid in mice.	87

CAPÍTULO 3

Table 1. Summarization of the % NBA and % connective tissue values with theirs respectively significances differences when compared to PCG.	128
---	-----

CAPÍTULO 4

Table 1. Scores of OCN and TRAP immunolabelling according to each group and period of analysis.	166
---	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Fig. 1. Graph of cell proliferation at 1, 3, 7, and 14 days ***** means $p < 0.0001$; * $p = 0.0353$.

97

Fig. 2. Representative plot of the mineralization analysis. (A) Histological images at 100x of the cells fixed in formalin and stained with alizarin red at the times of 7 and 14 days for the control groups (CT), and the different concentrations of ZA (01, 10, and 50 μM); (B) Macroscopic images of the wells stained with alizarin red at the different times and concentrations; and (C) Representative graph of the mineralization quantification through cetylpyridinium and analyzed by absorbance at 620 nm ***** means $p < 0.0001$.

98

Fig. 3. Confocal microscope images representing adhesion and spreading assay at 7 and 14 days, for the control groups (CT) and the different ZA concentrations (0.1, 10, and 50 μM) Scale bars: 100 μm .

99

Fig. 4. Confocal microscope images representing LIVE/DEAD assay at 7 and 14 days, for the control groups (CT) and the different ZA concentrations (0.1, 10, and 50 μM) Scale bars: 100 μm .

99

Fig. 5. Graph of ALP activity at 7 and 14 days ***** means $p < 0.0001$; **** means $p = 0.0002$; ** means $p = 0.0007$.

100

Fig. 6. Representative graph of RUNX2 expression at the 7- and 14-day periods. At 7 days, ***** means $p < 0.0001$, **** $p = 0.0007$, ** $p = 0.0011$; at 14 days ***** means $p < 0.0001$, *** $p = 0.0007$, ** $p = 0.0059$, * $p = 0.0317$.

101

Fig. 7. The graph on the left represents the expression of COL1 A1, and on the right ALPL, at 7 and 14 days.

101

CAPÍTULO 3

Figure 1. Flowchart of the work phases for mineralized tissue analysis, mentioned in days. (Blue lines, ZOL application; dotted line, extraction, and treatment of alveolus; green line, calcein application; red line, alizarin application; purple line, euthanasia, and collection of right hemimandible).

116

Figure 2. Representative images of the quantitative analysis of bone quality parameters obtained through micro-CT. A) Representative image of the average percentage of bone volume in all

groups ($p < 0.05$, represented by #, when compared to aDBG; *, when compared to aDG and DBG); B) Image representing the average percentage of general porosity in all groups ($p < 0.05$, represented by #, when compared to aDBG; *, when compared to aDG and DBG); C) Image representing the mean thickness of the bone trabeculae (in mm) in all groups (*, $p < 0.05$); D) Image representing the mean number of trabeculae per mm in all groups ($p > 0.05$); E) Image of the separation of trabeculae per mm in all groups ($p > 0.05$). 120

Figure 3. Representative images from the micro-CT. Each group is identified by its initials, followed by the sagittal and coronal section in the alveolar region of the distal root of the mandibular first molar. Yellow arrows demonstrate bone sequestrum. 121

Figure 4. Graph representing the daily group averages of bone mineralization ($p < 0.001$, represented by *, when compared to aDBG; #, when compared to DBG; ‡, when compared to aDG; °, when compared to BG; $p < 0.05$, represented by Δ, when compared to DG; □, when compared to aBG; Φ, when compared to aG). 122

Figure 5. Images representing the dynamics of mineral apposition in the tissue as observed through a confocal laser microscope (10×) with calcein fluorochrome (stained in green) and alizarin fluorochrome (stained in red). 123

Figure 6. Representative photomicrographs of sections, stained in Stevenel's blue and acidic fuchsin at 1.6× magnification (blue, connective tissue; pink, mineralized tissue). Image (A) represents the NCG group, (B) PCG, (C) aG, (D) BG, (E) DG, (F) aBG, (G) aDG, (H) DBG, and (I) aDBG. 125

Figure 7. Representative photomicrographs of the sections stained in Stevenel's blue and acidic fuchsin at 40× magnification (blue, connective tissue; pink, mineralized tissue). Image (A) represents the NCG group, (B) PCG, (C) aG, (D) BG, (E) DG, (F) aBG, (G) aDG, (H) DBG, and (I) aDBG. (*, bone fragment in the middle of connective tissue; red arrows, empty lacunae without osteocytes; black arrows, irregularities in bone surface). 126

Figure 8. Graph representing the dynamics/composition of the sections, according to each group (in percentage). The components evaluated were neoformed bone area (pink), connective tissue (blue), and necrotic tissue or non-vital bone (gray). 127

Figure 9. Graph representing the group-wise average percentage of the neoformed bone area ($p < 0.05$, represented by *, when compared to aDBG; #, when compared to DBG; ‡, when compared

to aDG; °, when compared to BG; □, when compared to aBG; Δ, when compared to DG; Φ, when compared aG; ▼, when compared to PCG).

128

Figure 10. Graph representing the group-wise average percentage of connective tissue area. (*, $p < 0.05$) when compared to aDBG).

129

CAPÍTULO 4

Figure 1. Representative histological images of the SAL group at 7 days, stained in hematoxylin and eosin (HE). On the left side the complete image of the alveolus was obtained with a 2.5x objective, followed by the respective images of the cervical, middle, and apical thirds obtained in a 100x magnification.

151

Figure 2. Representative histological images of the ZA group at 7 days, stained in hematoxylin and eosin (HE). On the left side the complete image of the alveolus was obtained with a 2.5x objective, followed by the respective images of the cervical, middle, and apical thirds obtained in a 100x magnification.

152

Figure 3. Representative histological images of the DOXI group at 7 days, stained in hematoxylin and eosin (HE). On the left side the complete image of the alveolus was obtained with a 2.5x objective, followed by the respective images of the cervical, middle, and apical thirds obtained in a 100x magnification.

153

Figure 4. Representative histological images of the SAL group at 14 days, stained in hematoxylin and eosin (HE). On the left side the complete image of the alveolus was obtained with a 2.5x objective, followed by the respective images of the cervical, middle, and apical thirds obtained in a 100x magnification.

155

Figure 5. Representative histological images of the ZA group at 14 days, stained in hematoxylin and eosin (HE). On the left side the complete image of the alveolus was obtained with a 2.5x objective, followed by the respective images of the cervical, middle, and apical thirds obtained in a 100x magnification.

156

Figure 6. Representative histological images of the DOXI group at 14 days, stained in hematoxylin and eosin (HE). On the left side the complete image of the alveolus was obtained with a 2.5x objective, followed by the respective images of the cervical, middle, and apical thirds obtained in a 100x magnification.

157

Figure 7. Representative histological images of the SAL group at 28 days, stained in hematoxylin and eosin (HE). On the left side the complete image of the alveolus was obtained with a 2.5x objective, followed by the respective images of the cervical, middle, and apical thirds obtained in a 100x magnification. 159

Figure 8. Representative histological images of the ZA group at 28 days, stained in hematoxylin and eosin (HE). On the left side the complete image of the alveolus was obtained with a 2.5x objective, followed by the respective images of the cervical, middle, and apical thirds obtained in a 100x magnification. 160

Figure 9. Representative histological images of the DOXI group at 28 days, stained in hematoxylin and eosin (HE). On the left side the complete image of the alveolus was obtained with a 2.5x objective, followed by the respective images of the cervical, middle, and apical thirds obtained in a 100x magnification. 161

Figure 10. Representative graph of the percentage of vital bone area for each group in the periods of 7, 14, and 28 days. 162

Figure 11. Representative graph of the percentage of non- vital bone area for each group in the periods of 7, 14, and 28 days. 163

Figure 12. Representative graph of the percentage of connective tissue for each group in the periods of 7, 14, and 28 days. 164

Figure 13. Representative graph of the percentage of vessels for each group in the periods of 7, 14, and 28 days. 165

Figure 14. Representative images of the immunolabelling for OCN and TRAP of the SAL group, at 7, 14 and 28 days, in a magnification of 400x. 166

Figure 15. Representative images of the immunolabelling for OCN and TRAP of the ZA group, at 7, 14 and 28 days, in a magnification of 400x. 167

Figure 16. Representative images of the immunolabelling for OCN and TRAP of the DOXI group, at 7, 14 and 28 days, in a magnification of 400x. 168

Figure 17. Representative images obtained in a polarized microscope evidencing immature fibers in greenish-yellow and mature fibers in yellowish-red for each group in the periods of 7, 14, and 28 days, in a magnification of 400x. 169

Figure 18. Representative graph of the percentage area of greenish-yellow fibers for each group in the periods of 7, 14, and 28 days. * means $p < 0.0001$, and ** means $p = 0.0001$. 170

Figure 19. Representative graph of the percentage area of yellowish-red fibers for each group in the periods of 7, 14, and 28 days. * means $p = 0.0027$, and ** means $p < 0.0001$. 171

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

#	Not reported
%NBA	Percentage of new bone area
1-3M	First, second, and third molar
1M	First molar
2M	Second molar
3M	Third molar
AAOMS	American Association of Oral and Maxillofacial Surgery
aBG	aPDT + biomaterial group
aDBG	aPDT + doxycycline + biomaterial group
aDG	aPDT + doxycycline group
aG	aPDT group
ALN	Alendronate
ALP	Alkaline phosphatase
aPDT	Antimicrobial photodynamic therapy
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
Ars	Antiresorptive drugs
ATP	Adenosine triphosphate
BG	Biomaterial group
BPs	Bisphosphonates
BSA	Bovine serum albumin
BTCP	β -tricalcium phosphate
BV/TV	Percentage of bone volume fraction
CD31	Platelet endothelial cell adhesion molecule
COL1A1	Collagen type 1
CT	Control Group
CYP	Cyclophosphamide
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBG	Doxycycline + biomaterial group
DG	Doxycycline group
DMEM	Dulbecco's modified eagle media

DOXI	Doxycycline
DX	Dexamethasone
EP	Experimental periodontitis
EPD	Experimental periapical disease
ES	Extremely Supraphysiologic
F	Female
FPP	Farnesyl-diphosphate synthase
HBMSCs	Human bone marrow stem cells
HGF	Hepatocyte growth factor
IM	Intramuscular
In	Incisor
IP	Intraperitoneal;
IV	Intravenous;
M	Male
M	Months
Md	Mandible
MicroCT	Microcomputed tomography
MRONJ	Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw
MWF	Monday, Wednesday, and Friday
Mx	Maxilla
N-BPs	Nitrogen-containing bisphosphonates
NCG	Negative Control group
OCN	Osteocalcin
OP	<i>Oryzomys palustris</i> rats
OPG	Osteoprotegerin
P	Physiologic
PAM	Pamidronate
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCG	Positive Control group
PGinv	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Post-XT	Post-extraction period

Post-XT	Treat Drug treatment applied during post-extraction period
PoTot	Total porosity
Pre-XT	Pre-extraction treatment period
qPCR	Real-time polymerase chain reaction
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
S	Supraphysiologic
SAL	Saline solution
SC	Subcutaneous
SD	<i>Sprague Dawley</i> rats;
SUN	Sunitib
TACE	Factor- α converting enzyme
TbSp/TbN	Separation and number of trabeculae
TbTh	Trabecular bone thickness
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
TRICT	Tetramethylrhodamine
VAB	Anti-VEGFA neutralizing antibody
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Weeks
WA	<i>Wistar Albinus</i> rats;
ZA	Zoledronic acid

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1 - Rodents as an animal model for studying tooth extraction-related medication-related osteonecrosis of the jaw: assessment of outcomes	29
1.1 ABSTRACT	29
1.2 INTRODUCTION	30
1.3 METHODS	31
1.4 RESULTS	32
1.5 DISCUSSION	50
1.6 CONCLUSION	57
1.7 REFERENCES	59
2 CAPÍTULO 2 - Dose-dependent effects of zoledronic acid on the osteogenic differentiation of human bone marrow stem cells (hBMSCs)	92
2.1 ABSTRACT	92
2.2 INTRODUCTION	92
2.3 MATERIALS AND METHODS	93
2.4 RESULTS	97
2.5 DISCUSSION	101
2.6 CONCLUSION	103
2.7 REFERENCES	104
3 CAPÍTULO 3 - Beta Tricalcium Phosphate, either alone or in combination with antimicrobial photodynamic therapy or doxycycline, prevents medication-related osteonecrosis of the jaw	111
3.1 ABSTRACT	111
3.2 INTRODUCTION	111
3.3 METHODS	113
3.4 RESULTS	118
3.5 DISCUSSION	130
3.6 CONCLUSION	132
3.7 REFERENCES	133

4 CAPÍTULO 4 - The role topical application of 10% doxycycline gel in the prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw	144
4.1 ABSTRACT	144
4.2 INTRODUCTION	145
4.3 METHODS	146
4.4 RESULTS	149
4.5 DISCUSSION	171
4.6 CONCLUSION	174
4.7 REFERENCES	174

Capítulo 1