THAÍS GIMENEZ MINIELLO

Investigação do uso de *cell sheet* de células-tronco da polpa dentária humana associada ou não à terapia de fotobiomodulação ou à terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da necrose óssea dos maxilares por medicamentos antirreabsortivos em ratos

São Paulo

2020

THAÍS GIMENEZ MINIELLO

Investigação do uso de *cell sheet* de células-tronco da polpa dentária humana associada ou não à terapia de fotobiomodulação ou à terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da necrose óssea dos maxilares por medicamentos antirreabsortivos em ratos
Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Diagnóstico Bucal) para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a Dra Márcia Martins Marques

São Paulo
2020

Miniello, Thaís Gimenez.

Investigação do uso de cell sheet de células-tronco da polpa dentária humana associada ou não à terapia de fotobiomodulação ou à terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da necrose óssea dos maxilares por medicamentos antirreabsortivos em ratos / Thaís Gimenez Miniello; orientadora Márcia Martins Marques. -- São Paulo, 2020.

129 p. : fig., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Osteonecrose maxilar. 2. Medicamentos antirreabsortivos. 3. Bisfosfonatos. 4. Laserterapia. 5. Regeneração óssea. 6. Membranas celulares. 7. Células-tronco. Marques, Márcia Martins. II. Título.

Miniello TG. Investigação do uso de *cell sheet* de células-tronco da polpa dentária humana associada ou não à terapia de fotobiomodulação ou à terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da necrose óssea dos maxilares por medicamentos antirreabsortivos em ratos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em: 08/12/2020

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Celso Augusto Lemos Júnior

Instituição: FO-USP_____Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Rejane Carvalho

Instituição: UFRN_____Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Sueli Patricia Harumi Miyagi de Cara

Instituição: USCS_____Julgamento: Aprovada

Esses anos todos de apoio, dedicação e esforço por parte dos
meus familiares me proporcionaram uma das maiores
felicidades dessa vida... De todo meu coração, minha
dedicação vai para eles: Pai, Mãe, De e Gian e meus Avós....

A minha gratidão será eterna!!!

Divido com vocês minha conquista!

Amo vocês, para sempre...

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar tantas bênçãos e oportunidades, por me dar fé e perseverança para seguir o caminho que escolhi e pela oportunidade de exercer essa Especialidade tão linda e apaixonante.

À minha Família, que é minha base, minha vida, minha inspiração e alegria. Jamais encontrarei palavras para agradecê-los suficientemente, já que para que eu conseguisse ter o prazer deste momento, muitas vezes foi pelo apoio e pela dedicação de vocês também. Amo sem limites... Pai, Mãe, Ade e Gian.

À minha Vozinha Vanilda e aos meus avós que já partiram desse Plano, Nair e Giuseppe, que fizeram a passagem durante o período da realização do Doutorado, agradeço sempre os ensinamentos e o apoio. Vocês são essenciais em minha vida, essenciais para minhas vitórias e conquistas! Amo vocês!!! Com certeza comemoram comigo ai de cima.

À Profa. Dra. Márcia Martins Marques, minha querida orientadora, por me acolher em sua equipe, por me incentivar sempre e por todo crescimento profissional e científico que proporciona a todos à sua volta. Realmente, uma grande pesquisadora/cientista e uma mulher com um coração imenso. Obrigada por me dar a oportunidade de tê-la em minha vida!

Aos animais da pesquisa, esses ratinhos que tanto nos ensinam e nos proporcionam tanto conhecimento! Que tem um único objetivo na Terra: ajudar na elucidação de doenças, diagnósticos, medicações, tratamentos. Somos gratos!

Aos meus doguinhos também, por que os cachorros são criaturas iluminadas que participam da nossa vida para nos ensinar o básico: amor incondicional, fidelidade, felicidade, o simples. Em especial ao “Tudinho” e ao “Cuquin” que não eram esperados e, para minha surpresa, me ofereceram o suporte energético

durante a Pandemia do COVID-19 e a escrita desse trabalho. Eu amo muito, muito mesmo! (Théo, Linguinha, Scooby, Dobby, Lady, Pantera).

À FOU SP, pelo suporte acadêmico e de infraestrutura durante o Curso de Doutorado para a realização da Pesquisa.

À Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), principalmente a Nina, a Cidinha e a Ivone pela dedicação a mim oferecida.

A todos os Funcionários da Biblioteca da FOU SP, pela disponibilidade e revisão da tese, em especial à Glauci por ter me ajudado tanto mesmo estando num pós-operatório.

Ao Laboratório de Pesquisa Básica da FOU SP em nome da Profa. Dra. Márcia Martins Marques onde a Pesquisa foi realizada.

Ao Biotério do Departamento de Biologia Oral, em nome do Prof. Dr. Victor Arana Chaves, pelo suporte com a permanência dos animais durante a Pesquisa.

Aos professores do Departamento de Estomatologia da FOU SP, Prof. Celso Lemos, Prof. Norberto Sugaya, Prof. Fábio Alves, Prof. Dante Migliari, Prof^a Andréia Witzel e Prof^a Camila Gallo pelos ensinamentos e companheirismo durante toda a minha passagem pela FOU SP. Obrigada também pelos almoços, cafés e confraternizações compartilhados. Vocês são um grande exemplo para mim e serei eternamente grata por tudo o que aprendi nas clínicas, nas disciplinas da Pós-Graduação, na atenção junto à Graduação. Obrigada por tanto!

Às professoras da Cirurgia Bucomaxilofacial, em especial à Profa. Dra. Emanuela Prado Ferraz e Maria Cristina Deboni pelo apoio e participação nas nossas pesquisas, com contribuições técnicas e científicas.

Aos funcionários da FOUSP que nos auxiliam e dão suporte em todas as fases da execução dos trabalhos: Laerte, (Departamento de Estomatologia) Aldo, David, Leandro, Selminha, Débora e Silvana (Departamento de Dentística); Douglas e Eli (Departamento de Biologia Oral); Vânia e Glauci (Biblioteca da FOUSP); Kátia e Alessandra (Secretaria de Pós-Graduação).

Aos funcionários externos da USP que tanto nos ajudaram na realização desse trabalho: Simone (Depto de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da USP - ICB), Paulo (Departamento de Histologia, Instituto de Biociências da USP - ICB), Renaide (Biotério de Produção de Ratos, Instituto de Biociências da USP - ICB). Obrigada pela expertise de cada um e pelos ensinamentos passados a mim e à equipe.

Aos colegas de laboratório e de Pós Ana Clara (Dentística), Natacha, Samantha e Natália (Cirurgia), Giovanna Sarra (Endodontia), Eduardo e Pablo Garrido (Equador) e Stella Moreira (UNIB). Obrigada pela ajuda no dia a dia e pelo compartilhamento dos conhecimentos! Orgulho de nossos trabalhos.

Aos colegas de Pós-Graduação da Estomatologia pelo companheirismo com que desenvolvemos todas as atividades propostas para a Pós-Graduação.

Aos alunos de Iniciação Científica que estiveram conosco durante a pesquisa: Danilo Mendes Bianchi, Ana Victória Sabóia Bertoletti, Caroline Hirota, Gabriela Boloni Brasileiro, Giovanna Lopes, Ana Flávia Motta, Débora Galioti Guimarães, Tomais Jerônimo, Thaís Massareto e Julia Mendes da Silva por meio do Programa Unificado de Bolsas EDITAL USP 2018/2019.

Esses alunos foram guerreiros, pois, durante a Graduação “cair” em uma IC dessa proporção, não é para qualquer um! Eu serei eternamente grata a todos vocês por terem se comprometido, se dedicado, abraçado a causa com o respeito e a ética que a Pesquisa Científica exige. Foram muitos momentos de trabalho intenso, seja com treinamentos, cuidado com os animais, procedimentos cirúrgicos da pesquisa, medicações, apresentações de casos

para congressos e cafezinhos. E se forem pensar, nós passamos tudo isso durante uma Copa do Mundo! Obrigada pela ajuda e por me ensinarem tanto!

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento de Bolsa de Iniciação Científica FAPESP grant#2019/18734-7 e grant#2018/08232-1 das alunas Ana Victória Sabóia Bertoletti e Gabriela Boloni Brasileiro, respectivamente. Esse auxílio foi essencial para a obtenção da qualidade deste trabalho.

À FAPESP pelo financiamento dessa Pesquisa por meio do Auxílio Pesquisa FAPESP grant#2017/16777-5.

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

Aos professores da minha Banca Avaliadora, por aceitarem avaliar este trabalho e pelas considerações realizadas. A escolha foi baseada na expertise de cada um, mais especificamente pela imensa contribuição que tiveram em minha formação. Obrigada!

E a todas as outras pessoas que direta ou indiretamente colaboraram com o sucesso desse trabalho.

**A sincera gratidão é respeito e consideração, uma dívida emocional
impagável. Reforça laços que se eternizam.**

Gratidão de irmã

*Agradeço, alma irmã, tudo que me trouxeste,
A mesa farta, o teto amigo, a veste,
A palavra de luz.
O remédio, o socorro, a solidariedade
Por bênçãos do caminho,
Por tudo te consagro o meu caminho,
Que o verbo não traduz.*

*Agradeço o trabalho
Que te haverá custado sacrifício
Para meu benefício,
Suprimindo-me a dor,
A bendita moeda que entregaste
Ouvindo o apelo da beneficência,
O serviço sagrado da existência,
Recamado de amor.*

*Agradeço a presença com que honras
A nossa de esperança
Enriquecendo a fé que nos alcança
Em nosso festival!...
A ternura a sorrir com que anuncias
O alvorecer da nova era,
A futura e sublime primavera
Da união fraternal..*

*Mas, acima de tudo, alma querida,
Em preces agradeço
O conforto sem preço
Por estender-me a tua própria mão,
Fazendo-me sentir que Deus existe em nós,
Guardando-nos na força da alegria,
Ao bendito calor de cada dia,
Dando-nos vida e paz ao coração.*

*(Maria Dolores)
Estradas e Destinos
Francisco C. Xavier - Espíritos Diversos*

RESUMO

Miniello TG. Investigação do uso de *cell sheet* de células-tronco da polpa dentária humana associada ou não à terapia de fotobiomodulação ou à terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da necrose óssea dos maxilares por medicamentos anti-reabsortivos em ratos [tese] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Necrose óssea dos maxilares por medicamentos anti-reabsortivos (MRONJ do inglês *medication-related osteonecrosis of the jaws*) é uma condição progressiva sem tratamento eficaz até o momento. A engenharia tecidual e as terapias celulares, ambas mediadas por células-tronco (CTs) poderiam ser aplicadas para este fim associadas ou não a terapias baseadas em biofotônica, como fotobiomodulação (PBMT do inglês *photobiomodulation therapy*) capaz de melhorar a regeneração tecidual, e a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT do inglês *antimicrobial photodynamic therapy*) capaz de diminuir a infecção de feridas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de membranas celulares (MCs, do inglês *Cell Sheets*) de CTs da polpa dentária humana (hDPSCs do inglês *human dental pulp stem cells*), associadas ou não às terapias de PBM e/ou aPDT, na regeneração de lesões ósseas causadas pelo uso de zolendronato (ZLN) em cavidade oral de ratos. O estudo foi composto por 2 etapas: uma *in vitro*, onde as MCs foram obtidas, e uma *in vivo* onde foram utilizados 60 ratos Wistar. MCs de hDPSCs (do inglês *human dental pulp stem cells*) foram obtidas para serem aplicadas em alguns dos grupos experimentais do estudo *in vivo*. Lesões de MRONJ foram induzidas por ZLN em resposta a exodontias de molares superiores. Esses animais foram distribuídos nos grupos experimentais de acordo com o tratamento aplicado, a saber: (CN): Controle negativo: somente tratamento cirúrgico; (MC): tratamento cirúrgico e aplicação da MC; (MC+PBMT): tratamento cirúrgico seguido de aplicação de MC e de PBM; (aPDT+MC): tratamento cirúrgico, seguido de aPDT e aplicação de MC. Animais normoreativos (que não receberam o ZLN) constituíram o grupo (CP): Controle positivo. Sete e 28 dias após o tratamento, as maxilas de todos os animais foram fixadas e submetidas às análises: por Microtomografia Computadorizada (MicroCT), histológica (HE) e histoquímica (Tricrômico de

Masson). Os dados foram tratados estatisticamente ($p \leq 0,05$). Em nenhum dos grupos a mucosa que recobria as lesões de MRONJ fecharam por completo. Aos 7 dias os resultados de MicroCT foram similares em todos grupos. Em 28 dias semanas, apenas a avaliação do volume ósseo (VO) mostrou diferenças entre os grupos, sendo que o grupo tratado com a MC apresentou volume significativamente maior ($p = 0,0249$) do que todos os outros grupos. As avaliações histológicas e histoquímicas mostraram que em todos os grupos onde a MC foi aplicada houve uma resposta de intensa formação óssea em ambos os tempos experimentais, tanto para dentro da lesão quanto para fora da cortical óssea. Tecido similar a tecido dentinário foi observado em alguns espécimes dos grupos que receberam a MC. Nos grupos onde a PBMT ou a aPDT foram aplicadas o osso neoformado apresentou-se mais organizado e maduro, inclusive com aspecto lamelar. Baseado nos resultados podemos inferir que a aplicação de MCs de hDPSCs associadas ou não à PBMT ou aPDT no tratamento de lesões de MRONJ pode colaborar para a mais rápida e organizada resposta de neoformação óssea.

Palavras-chave: Necrose óssea dos maxilares. Medicamentos antirreabsortivos. Bisfosfonatos. Zolendronato. Laserterapia. Regeneração óssea. Membranas celulares. Células-tronco. Fotobiomodulação.

ABSTRACT

Miniello TG. Investigation of use of cell sheet of human dental pulp stem cells associated or not with photobiomodulation therapy or antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of bone necrosis of the jaws by antiresorptive drugs in rats [thesis] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) is a progressive condition without effective treatment to date. Tissue engineering and cell therapies, both mediated by stem cells (CTs) could be applied for this purpose associated or not to therapies based on biophotonics, such as photobiomodulation therapy (PBMT), capable of improving tissue regeneration, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) capable of decreasing infection of wounds. The aim of this study was to evaluate the effect of the application of cell sheets (CSs) of human dental pulp stem cells (hDPSCs), associated or not with PBM and / or aPDT therapies, in the regeneration of bone lesions caused by the use of zoledronate (ZLN) in the oral cavity of rats. The study consisted of 2 steps: one *in vitro*, where the MCs were obtained, and one *in vivo*, where 60 Wistar rats were used. HDPSCs CSs were obtained to be applied in some of the experimental groups of the *in vivo* study. MRONJ lesions were induced by ZLN in response to extraction of maxillary molars. These animals were distributed in the experimental groups according to the treatment applied, namely: (NC): Negative control: only surgical treatment; (CS): surgical treatment and application of CS; (CS + PBMT): surgical treatment followed by application of CS and PBM; (aPDT + CS): surgical treatment, followed by aPDT and application of CS. Normoreactive animals (that did not receive the ZLN) constituted the positive control (PC). Seven and 28 days after treatment, the jaws of all animals were removed, fixed and subjected to analysis: by Computerized Microtomography (MicroCT), histology (H&E) and histochemistry (Masson's Trichrome). The data were treated statistically ($p \leq 0.05$). In none of the groups the mucosa covering the MRONJ lesions was completely close. At 7 days, all microCT results were similar in all groups. At 28 days weeks, only the assessment of bone volume (BV) showed differences between the groups, and the group treated with CS alone had a significantly

higher volume ($p = 0.0249$) than all the other groups. Histological and histochemical evaluations showed that in all groups where CS was applied, there was a response of intense bone formation in both experimental times, both inside the lesion and outside the bone cortex. Dentin-like tissue was observed in some specimens of the groups that received CS. In the groups where PBMT or aPDT were applied, the newly formed bone was more organized and mature, even with a lamellar aspect. Based on the results, we can infer that the application of hDPSC CSs associated or not to PBMT or aPDT in the treatment of MRONJ lesions can contribute to the faster and organized response of new bone formation.

Keywords: Bone necrosis of the jaws. Anti-resorptive drugs. Bisphosphonates. Zoledronate. Lasertherapy. Bone regeneration. Cell membranes. Stem cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Esquema do processo de remodelação óssea	33
Figura 2.2 - Esquema representativo da diferença da composição e das cadeias moleculares dos bisfosfonatos (A) e dos pirofosfatos (B)	35
Quadro 2.1 - Características dos BFs disponíveis no mercado	39
Figura 2.3 - Esquema representativo de duas teorias de patogênese de MRONJ: teoria interna e externa	42
Figura 4.1 - Fotomicrografia de fase das CTs cultivadaFotografia ilustrando os procedimentos para o cálculo de doses e do posicionamento dos animais	54
Figura 4.2 - Fotografias ilustrando o posicionamento dos animais para os procedimentos cirúrgicos	55
Figura 4.3 - Diagramas e fotografias ilustrativas das exodontias dos segundos molares da maxila	56
Figura 4.4 - Imagens representativas dos aspectos clínicos das lesões de MRONJ obtidas no Estudo Piloto.	57
Figura 4.5 - Fotografia da maxila dissecada.....	58
Figura 4.6 - Fotomicrografias de cortes Imagens histológicas ilustrativas das amostras de 7, 14 e 28 dias após a extração dentária	60
Figura 4.7 - Fotomicrografia de fase das CTs cultivadas.	62
Figura 4.8 - Fotografia da membrana celular (Cell Sheet) de hDPSC induzida por Vitamina C	63
Figura 4.9 - Fotografia dos animais condicionados no biotério... ..	64

Figura 4.10 - Ilustração da curva de Gauss obtida com a aplicação do teste para o Cálculo Amostral (Software G*Power 3.0.10).	65
Figura 4.11 - Diagrama exibindo esquema da cronologia de aplicação do ZLN e da realização dos tratamentos experimentais.....	66
Figura 4.12 - Fotografias ilustrativas dos procedimentos de debridamento ósseo, colocação da <i>Cell Sheet</i> e sutura.	68
Tabela 4.1- Parâmetros da PBMT.....	69
Figura 4.13 - Fotografias ilustrativas dos procedimentos de PBMT	69
Figura 4.14 - Fotografias ilustrativas do tratamento com aPDT..	70
Tabela 4.2 - Parâmetros da irradiação da aPDT.....	71
Figura 4.15 - Fotografia das peças posicionadas para a MicroCT	72
Tabela 4.3 - Parâmetros do escaneamento para MicroCT.....	73
Figura 4.16 - Fotografias das telas do computador na sequência de análise das MicroCTs.	73
Figura 4.17 - Fotografia das telas do computador na sequência de análise do ROI.....	74
Figura 4.18 - Fotografia 3D da MicroCT.....	75
Gráfico 5.1 - Representação gráfica dos resultados de volume ósseo (VO) (mm ³).....	77
Gráfico 5.2 - Representação gráfica dos resultados de número de trabéculas (Tb.N) (1/mm).....	78
Gráfico 5.3 - Representação gráfica dos resultados de espessura de trabéculas (Tb.Th) (mm).....	78

Gráfico 5.4 - Representação gráfica dos resultados de distância entre as trabéculas (Tb.Sp) (mm).....	79
Gráfico 5.5 - Representação gráfica das médias das porcentagens (%) de volume ósseo relativo (VO/VT) (mm).....	79
Figura 5.1 - Fotomicrografias ilustrativas dos espécimes do grupo 1 - Controle Positivo (CP). (A-D: 7 dias); (E-H:28 dias).....	81
Figura 5.2 - Fotomicrografias ilustrativas dos espécimes do grupo 2 - Controle Negativo (CN). (A-D: 7 dias) (E-H: 28 dias).....	85
Figura 5.3- Fotomicrografias ilustrativas dos espécimes do grupo 3 – Membrana Celular (MC). (A-D: 7 dias) (E-H: 28 dias))....	89
Figura 5.4 - Fotomicrografias ilustrativas dos espécimes do grupo 4 – Membrana Celular e PBMT (MC+PBMT). (A-D: 7 dias) (E-H: 28 dias).....	93
Figura 5.5 - Fotomicrografias ilustrativas dos espécimes do grupo 5 - aPDT + Membrana Celular (aPDT + MC). (A-D: 7 dias) (E-H: 28 dias).....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	tridimensional
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	aloficocianina
aPDT	sigla do inglês <i>antimicrobial photodynamic therapy</i>
BFs	bisfosfonatos
BV	bone volume
BMP-2	proteína morfogênica óssea 2
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD4	sigla do inglês <i>cluster of differentiation</i>
CD105	anticorpo anti o alvo CD 105
CD14	anticorpo anti o alvo CD 14
CD146	anticorpo anti o alvo CD 146
CD44	anticorpo anti o alvo CD 44
CD45	anticorpo anti o alvo CD 45
CD34	anticorpo anti o alvo CD 34
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
CRO	células de revestimento ósseo
CP	controle positivo
CN	controle negativo
CSs	sigla do inglês <i>cell sheets</i>
CTMs	células-tronco mesenquimais
CTs	células-tronco
DP	dobra da população
DPSC	sigla do inglês <i>dental pulp stem cells</i>
EDTA	ácido etilenodiamina tetraacético
EP	eficiência de plaqueamento
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
ffo-Fundecto	Fundação para Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia

FITC	fluoresceína
FS	fotossensibilizador
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FoxP3+	sigla do inglês <i>regulatory t cells [Tregs]</i>
GMSC	sigla do inglês <i>mesenchymal stem cells derived from human gingiva</i>
hDPSCs	sigla do inglês <i>human dental pulp stem cells</i>
HE	hematoxilina-eosina
HSCs	sigla do inglês <i>hemopoietic stem cells</i>
IC	iniciação científica
ICB/USP	Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
InGaAlP	fosfeto de índio-gálio-alumínio
LED	sigla do inglês para <i>light emission diode</i>
LLLT	sigla do inglês <i>low level laser therapy</i>
Mclono	meio de cultura clonogênico
MCs	membranas celulares
MicroCT	micro tomografia computadorizada
moDCs	sigla do inglês <i>monocyte-derived dendritic cells</i>
MRONJ	necrose óssea dos maxilares por medicamentos antirreabsortivos
n	número de amostras
nº	número
NC	sigla do inglês <i>negative control</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
Nit	Bisfosfonato Nitrogenado
Oct 3 / 4	sigla do inglês <i>octamer-binding transcription factor 3 and 4 (alvo)</i>
PACT	sigla do inglês <i>photodynamic antimicrobial chemotherapy</i>
PBMT	sigla do inglês <i>photobiomodulation</i>
PBSA	solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio
PC	sigla do inglês <i>positive control</i>
PDA	sigla do inglês <i>photoactivation disinfection</i>
PDI	sigla do inglês <i>photodynamic inactivation</i>
PDLSC	sigla do inglês <i>periodontal ligament stem cells</i>
PE	ficoeritrina
PFA	paraformaldeído

PRP	plasma rico em plaquetas
RANK	sigla do inglês <i>human receptor activator for nuclear factor kb</i>
RANKL	sigla do inglês <i>human receptor activator for nuclear factor kb ligand</i>
RGB	sigla do inglês <i>red, green and blue</i>
rhBMPs	sigla do inglês <i>recombinant human bone morphogenetic proteins</i>
ROI	região de interesse
SCs	sigla do inglês <i>stem cells</i>
SCAP	sigla do inglês <i>stem cells from the apical papilla</i>
SEM	erro padrão da média
SHEDs	sigla do inglês <i>mesenchymal stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth</i>
STRO1	anticorpo anti o alvo STRO1
SUS	Sistema Único de Saúde
Tb.N	número de trabéculas
Tb.Th	espessura de trabéculas
Tb.Sp	separação de trabéculas
T CD4	sigla do inglês <i>cluster of differentiation</i>
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	sigla do inglês <i>tumor necrosis factor</i>
.txt	extensão de arquivo
U/ml	unidade por mililitro
USP	Universidade de São Paulo
UV	ultravioleta
VC	vitamina C
VEGF	sigla do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>
VO	volume ósseo
VOI	volume de interesse
VT	volume total de tecido
ZLN	zolendronato (<i>zolendronate</i>)
α -MEM	sigla do inglês <i>α- minimal essential medium</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
$\leq$	menor/igual
>	maior
°C	graus Celsius
$\mu\text{g/ml}$	micrograma por mililitro
CH_2 e CH_3	hidrocarbonetos
Cl	cloro
cm^2	centímetro quadrado
CO_2	dióxido de carbono
g	grama
H	Hidrogênio
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
J / cm^2	joule por centímetro quadrado
J	joule
kV	Quilovolt
L	litro
Ln	logaritmo natural
mg/dL	miligrama por decilitro
mg/Kg	miligrama por quilograma
min	minuto
mL	mililitro
ml/Kg	mililitro por quilograma
mm	milímetro
mM	milimolar
mm^3	milímetros cúbicos
mW	miliwatt
n	número de amostras
N	nitrogênio
NH_2	Compostos nitrogenados (amina secundária)
n°	número
nm	nanômetro

OH	hidroxila
p	valor de p
PO(OH) ₂	fosfatos
pH	pH
s	segundos
U/ml	unidade por mililitro
W / cm ²	watts por centímetro quadrado
μA	microampère
μg / ml	micrograma por mililitro
μL	microlitro
μM	micrometro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	REMODELAÇÃO ÓSSEA	31
2.1.1	Formação Óssea	31
2.1.2	Reparação Óssea	32
2.2	OSTEONECROSE DOS MAXILARES POR ANTIRREABSORTIVO	34
2.2.1	Bisfosfonatos (BFs)	35
2.2.2	MRONJ por BFs	41
2.2.3	Tratamentos da MRONJ	43
2.3	ENGENHARIA CELULAR	44
2.3.1	Células-tronco da polpa dentária humana	44
2.3.2	Cell Sheets (Membrana Celular, MC)	45
2.4	TERAPIA DA FOTOBIMODULAÇÃO (PBMT)	47
2.5	TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT)	48
3	PROPOSIÇÃO	51
4	MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1	ESTUDO PILOTO	53
4.1.1	Indução da MRONJ	54
4.1.2	Procedimentos Cirúrgicos	55
4.1.3	Avaliação Clínica das Lesões	57
4.1.4	Preparo das Amostras	58
4.1.5	Avaliação Histológica das Lesões	59
4.2	ISOLAMENTO E CULTIVO CELULAR	61
4.3	<i>CELL SHEET</i> (MEMBRANA CELULAR, MC)	62
4.3.1	Obtenção das Cell Sheets	62
4.4	MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	63
4.4.1	Delimitação da amostra	64
4.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS	65
4.6	INDUÇÃO DA MRONJ	66
4.7	TRATAMENTOS DAS LESÕES	67

4.7.1	Debridamento ósseo	67
4.7.2	Membrana Celular (<i>Cell Sheet</i>)	68
4.7.3	Terapia de Fotobiomodulação (PBMT)	68
4.7.4	Terapia fotodinâmica antibacteriana (aPDT)	70
4.8	COLETA DAS AMOSTRAS	71
4.9	ANÁLISES DAS AMOSTRAS	71
4.9.1	Análise histomorfométrica de Microtomografia Computadorizada (MicroCT) de alta resolução	72
4.9.2	Processamento das amostras para análises histológicas	75
4.9.2.1	<i>Análise histomorfológica por coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e histoquímica por coloração de Tricrômico de Masson</i>	75
5	RESULTADOS	77
5.1	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DE MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (MICROCT) DE ALTA RESOLUÇÃO	77
5.2	ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA	80
5.2.1	Grupo 1- Controle Positivo	80
5.2.2	Grupo 2- Controle Negativo	83
5.2.3	Grupo 3- Membrana Celular	87
5.2.4	Grupo 4- Membrana Celular + PBMT	91
5.2.5	Grupo 5 - aPDT + Membrana Celular	95
6	DISCUSSÃO	99
7	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS	109
	ANEXOS	125

1 INTRODUÇÃO

Necrose óssea dos maxilares por medicamentos antirreabsortivos (MRONJ do inglês *Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws*) é uma condição progressiva, que não tem tendência à resolução espontânea e sua prevalência varia de 1 a 21% para pacientes com neoplasias malignas, e menos de 1% para a osteoporose (Walter et al., 2007). Aumento no número de infusões e prolongadas administrações dessas drogas resultam em um risco aumentado de MRONJ: 8,4% em pacientes oncológicos (Kajizono et al., 2015). Apesar de medidas de prevenção das lesões estarem sendo implementadas, essas nem sempre são bem-sucedidas. Mais ainda, até o momento não há tratamento definitivo eficaz para essas lesões. Nos casos em que os pacientes apresentam lesões de MRONJ extensas, tratamentos mais invasivos são indicados e incluem debridamento ósseo e ressecções mais amplas; entretanto, tratamentos conservadores devem ser indicados sempre que possível. Assim sendo, pesquisadores e clínicos estão buscando alternativas terapêuticas para essa condição.

Entre os tratamentos conservadores para as lesões de MRONJ, destaca-se a utilização da terapia de fotobiomodulação (PBMT do inglês *photobiomodulation Therapy*; Vescovi et al., 2007; Martins et al., 2012) que resulta em melhoria do metabolismo celular, da angiogênese, além de induzir a síntese de fatores de crescimento, aumento de atividade migratória, da sobrevivência celular, entre outras atividades celulares de importância para a regeneração óssea (Pereira et al., 2002; Eduardo et al., 2008; Marques et al., 2016; Diniz et al., 2018; Hosseinpour et al., 2019).

Outras alternativas poderiam ser baseadas na utilização da engenharia de tecidos ou de terapias celulares associadas ou não à PBMT. A engenharia tecidual é baseada na tríade células-tronco (CTs), fatores de crescimento e arcabouços (*scaffolds*) que são capazes de restaurar, repor, manter ou melhorar funções biológicas dos tecidos (De Sá Silva et al., 2014). Entre as CTs destacam-se aquelas derivadas de tecido dentoalveolar, como, por exemplo, as CTs de polpa dentária humana (hDPSCs do inglês *human dental pulp stem cells*; Marques et al., 2016). As DPSCs (do inglês *dental pulp stem cells*) podem ser

aplicadas na regeneração de tecidos numa terapia baseada na aplicação de membrana celular (MC, *cell sheets*) induzidas por vitamina C (VC). As MCs de DPSCs oferecem uma grande quantidade de células para serem transplantadas para o sítio a ser regenerado e, mais ainda, essas células ainda mantêm suas características de CTs, podendo, portanto, sob a ação de fatores de crescimento locais se diferenciar em células osteoprogenitoras (Wei et al., 2012). CTs originadas de tecidos de origem odontogênica de humanos apresentam baixa imunogenicidade (Pierdomenico et al., 2005) tendo sido transplantadas para animais normoreativos ou portadores de doença, sem a necessidade de se utilizar animais imunossuprimidos (Asutay et al., 2015; Petridis et al., 2015; Hirose et al., 2016; Jahanbin et al., 2016; Kremer et al., 2016; Nicola et al., 2017; Yang et al., 2017). Outra vantagem do cultivo de MC é o de não necessitar de *scaffolds*, já que as células não sofrem subcultivos e se destacam das placas de cultivo espontaneamente mantendo suas ligações intercelulares, bem como a matriz extracelular por elas formadas (Wei et al., 2012).

Outra terapia baseada em biofotônica que tem sido aplicada no tratamento e prevenção de lesões de MRONJ é a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT do inglês *antimicrobial photodynamic therapy*) (Tarataroti et al., 2020; Pedroni et al., 2020). A aPDT tem sido usada para controlar lesões ósseas e está diretamente associada ao controle microbiológico (Ribeiro et al., 2018b). Essa terapia consiste na aplicação na região afetada de um fotossensibilizador (FS) por um período de tempo (tempo de pré-irradiação) com posterior incidência de luz com comprimento de onda consoante ao FS, estes na presença de oxigênio produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez mata bactérias.

Baseados no exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de membranas celulares (MCs) de CTs da polpa dentária humana, associadas ou não às terapias de PBMT e/ou aPDT, na regeneração de lesões ósseas causadas pelo uso de zolendronato (ZLN) em cavidade oral de ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REMODELAÇÃO ÓSSEA

2.1.1 Formação Óssea

O desenvolvimento ósseo é tradicionalmente classificado em endocondral e intramembranoso, dependendo se um modelo de cartilagem servir de precursor do osso (ossificação endocondral) ou da formação de osso de modo mais simples, sem a intervenção de um precursor cartilaginoso (ossificação intramembranosa). Os ossos do crânio e da face, a mandíbula e a clavícula desenvolvem-se por ossificação intramembranosa. Posteriormente, o tecido ósseo inicialmente depositado por ossificação endocondral ou por ossificação intramembranosa é substituído. O osso de reposição é formado sobre o osso preexistente por crescimento aposicional e é estruturalmente idêntico em ambos os casos, a isso chamamos de *turnover* ósseo (Ross; Pawlina, 2016).

O primeiro sinal de ossificação consiste no aparecimento de um colar ósseo ao redor do modelo de cartilagem. As células que compõem essa camada se diferenciam em osteoblastos, e é possível identificar uma camada osteogênica dentro do periósteo. Em virtude dessas modificações, forma-se uma camada de osso em torno da cartilagem. Esse osso pode ser classificado como osso periosteal (devido à sua localização) ou como osso intramembranoso (devido ao seu processo de desenvolvimento) (Ross; Pawlina, 2016).

As CTs mesenquimais (CTMs) migram juntamente com vasos sanguíneos em crescimento e diferenciam-se em células osteoprogenitoras na cavidade da medula óssea. As CTs hemocitopoéticas (HSCs; do inglês *hemopoietic stem cells*) também ganham aceso por meio da nova vascularização, deixando a circulação para dar origem à medula óssea que constituirá a fonte de todas as linhagens de células sanguíneas. As células osteoprogenitoras diferenciam-se em osteoblastos e começam a depositar

matriz óssea (osteóide) sobre a estrutura. O osso recém produzido contém osteócitos inseridos na matriz óssea. O componente ósseo remanescente da espícula continua a se desenvolver por crescimento aposicional (Ross; Pawlina, 2016).

2.1.2 Reparação Óssea

O osso pode sofrer reparação após lesão por um processo de consolidação óssea direto também denominado primário ou indireto também conhecido como secundário. Na consolidação primária o osso fraturado é cirurgicamente estabilizado com placas, restringindo assim o movimento por completo entre os fragmentos fraturados de osso e a remodelação interna é semelhante àquela do osso maduro. Os osteoblastos cruzam a linha de fratura e produzem canais de reabsorção longitudinais, que posteriormente são preenchidos por osteoblastos produtores de osso e geração simultânea de união óssea. Já a consolidação óssea secundária envolve respostas do periósteo e dos tecidos moles adjacentes. Esse tipo de reparo ósseo ocorre em fraturas tratadas com fixação óssea não rígida ou semirrígida (Ex: tratamento com gesso, pinos intramedulares ou aplicação de placas metálicas sobre a fratura) (Ross; Pawlina, 2016).

O principal objetivo da remodelação é restaurar o formato original do osso e essa é a nossa maior preocupação na MRONJ. No caso de um possível tratamento, enquanto o osso compacto está sendo formado, os remanescentes do calo ósseo formados inicialmente são removidos pela ação dos osteoclastos, e a remodelação óssea gradual restaura o formato original do osso. Nos indivíduos saudáveis, esse processo costuma levar 6 a 12 semanas, dependendo da gravidade da fratura e do osso específico que foi fraturado ou lesionado. O processo de remodelação óssea pode levar desde alguns meses a vários anos até que o osso recupere por completo o seu formato original (Ross; Pawlina, 2016).

A remodelação óssea é dinâmica e contínua e envolve a ação de osteoclastos na reabsorção e de osteoblastos na formação óssea (Carda et al.,

2005). Existem vários fatores que regulam esse mecanismo e eles podem ser locais ou sistêmicos, como os fatores de crescimento, as citocinas, o fator de necrose tumoral (TNF do inglês *Tumor Necrosis Factor*), o receptor do ativador do fator nuclear Kappa B (RANK do inglês *Human Receptor Activator for Nuclear Factor κ B*) e seu ligante (RANKL do inglês *Human Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*), o inibidor da osteoprotegerina (OPG do inglês *Osteoprotegerin*), entre outros (Hofbauer et al., 2000). O equilíbrio entre RANKL e OPG pode ser importante, não só na manutenção da homeostase óssea, mas também no controle da cicatrização de uma ferida óssea (Hofbauer et al., 2000).

Para a remodelação acontecer, o aumento em largura (diâmetro) ocorre pelo crescimento aposicional de novo osso, que ocorre entre o osso compacto e o periósteo. O osso sofre remodelação por toda a vida fazendo com que ele possa modificar seu formato em respostas às cargas mecânicas, por meio de unidades de remodelação óssea compostas de osteoclastos e osteoblastos (Figura 2.1) (Ross; Pawlina, 2016).

Figura 2.1 – Esquema do processo de remodelação óssea

Fonte: O autor

2.2 OSTEONECROSE DOS MAXILARES POR ANTIRREABSORTIVOS

A regeneração óssea tem sido amplamente estudada e ainda necessita de elucidações no que diz respeito à reparação óssea após grandes perdas de conteúdo ósseo devido a medicações ou alguns tratamentos mutiladores de doenças que englobam este tecido (Hellstein et al., 2011). MRONJ é um termo utilizado para denominar osteonecrose pelo uso de drogas que podem ocorrer espontaneamente ou após algum trauma local. Estudos reportam a MRONJ ao uso de BFs (Quadro 2.1), e mais recentemente a outras medicações antirreabsortivas, como o Denosumab, um anticorpo monoclonal contra o ativador de receptores do fator nuclear κ B (RANKL do inglês *Human Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*) que é utilizado no tratamento da osteoporose, como Prolia® e Xgeva®. O anti-RANKL interfere com as funções absorptivas ósseas normais dos osteoclastos após traumatismo dentário (Ruggiero et al., 2004; Aghaloo et al., 2010; Stopeck et al., 2010; Taylor et al., 2010; Diz et al., 2012; Aghaloo et al., 2014). Nos últimos anos, pesquisadores descreveram a ocorrência de MRONJ em pacientes com câncer que são tratados com agentes anti-angiogênicos tais como Bevacizumab (Avastin®) um anti-VEGF (VEGF do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), sutinib (Sutent®), Pazopanib (Votrient®), entre outros (Migliorati; Covington, 2009; Jung, 2017), inibidores do mTOR (do inglês *mammalian target of rapamycin*) como Everolimus® e Temsirolimus® utilizados no tratamento de doenças metastáticas de carcinoma renal (Yamamoto et al., 2017), medicamento benztiofeno não-esteróide usado como modulador do receptor de estrogênio no tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa e para reduzir o risco de câncer de mama, como o Raloxifeno® (Baur et al., 2015) e corticosteróides, que são a causa mais comum de osteonecrose não traumática (Chang et al., 2017).

2.2.1 Bisfosfonatos (BFs)

Entre estes tipos de medicações destacam-se os BFs que são análogos sintéticos do pirofosfato endógeno, os quais atuam como inibidores potentes da reabsorção óssea mediada por osteoclastos. São chamados de BFs porque eles têm dois fosfatos ($\text{PO}(\text{OH})_2$) (Figura 2.2) (Gutta; Louis, 2007; Goytia et al., 2009). BFs são estáveis e análogos não hidrolisáveis de pirofosfatos que são composto por um átomo de carbono ligado a dois grupos fosfonatos ($\text{P} - \text{C} - \text{P}$) para imitar a estrutura molecular do pirofosfato ($\text{P} - \text{O} - \text{P}$) (Lombard et al., 2016). O pirofosfato serve como um regulador no processo fisiológico da calcificação e reabsorção óssea (Eid; Atlas, 2014).

Figura 2.2 - Esquema representativo da diferença da composição e das cadeias moleculares dos bisfosfonatos (A) e dos pirofosfatos (B)

Fonte: O autor

BFs simples (etidronato e clodronato) devem ser distinguidos de BFs com nitrogênio (pamidronato, alendronato, risedronato, ibandronato e zoledronato) por causa da presença de nitrogênio nas cadeias laterais deste último. Essa diferença estrutural tem um impacto sobre o mecanismo de ação. Os BFs com nitrogênio inibem osteoclastos e funcionam agindo como inibidores potentes da enzima farnesil-difosfato sintase na via biossintética do colesterol (mevalonato). Esta inibição é responsável por uma diminuição no tráfego de osteoclastos (Dunford et al., 2001). Mais recentemente, foi demonstrado que os BFs (alendronato e zoledronato) induzem expressão osteogênica, como proteína morfogênica óssea 2 (BMP-2), osteocalcina e fosfatase alcalina em CTs endoteliais e mesenquimais (Ribeiro et al., 2014; Lombard et al., 2016).

Este tipo de droga é atualmente utilizado em várias condições patológicas, incluindo osteoporose pós-menopausa, hipercalcemia associada com malignidade, metástases ósseas líticas e outras doenças metabólicas ósseas (Migliorati et al., 2005). Os efeitos adversos resultantes do tratamento com BF são amplamente estudados e discutidos. Embora os BFs e os outros medicamentos sejam benéficos para controle de várias condições patológicas do osso, a MRONJ na maioria das vezes está associada a trauma em região onde a necrose se desenvolve, como extrações dentárias, doença periodontal, ou até mesmo colocação de implantes osseointegrados (Ruggiero et al., 2014; Fassio et al., 2017). A via de administração da medicação, duração do tratamento, potência, presença ou não de nitrogênio em sua cadeia e quantidade de dose do BF que o paciente já utilizou são fatores que influenciam o aparecimento da MRONJ (Ruggiero et al., 2014).

Sabe-se que com doses consideradas mínimas (dose anual injetável de ácido zolendrônico 5mg por 5 anos) para o controle e tratamento da osteoporose em uma paciente que realizou uma reabilitação oral com implantes dentários, foi suficiente para que a paciente apresentasse MRONJ com diminuição da sua qualidade de vida e impossibilidade de manter os implantes e dar continuidade à sua reabilitação oral (Miniello et al., 2015). Contudo, as lesões podem também ocorrer espontaneamente sem história de procedimentos cirúrgicos ou trauma (De Ponte et al., 2016). Outros fatores também podem aumentar o risco e a gravidade da MRONJ causada pelo uso de BFs caso o paciente apresente algumas comorbidades como diabetes, hipertireoidismo, deficiências nutricionais, uso de drogas imunossupressoras, corticosteroides e ter hábitos de fumar (Ruggiero et al., 2014; Fassio et al., 2017; Martins et al., 2017).

Essas medicações atuam diminuindo a ação dos osteoclastos, células envolvidas na reabsorção do osso, diminuindo assim o remodelamento ósseo e aumentando a mineralização e a matriz óssea. Os BFs se acumulam na matriz óssea e são liberados lentamente por longos períodos de tempo e sabe-se que possuem tempo de meia vida de aproximadamente 10 anos (Papapoulos; Cremers, 2007). Muito se fala sobre a descontinuação do medicamento (*Day holliday*), porém, devido a essa característica, o risco de desenvolver MRONJ permanece mesmo após a suspensão da medicação (Ruggiero et al., 2014).

No Brasil, os BFs aprovados para uso pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) incluem alendronato, ácido cloridrônico, ibandronato, risedronato, pamidronato e ácido zolendrônico. Dentre eles, o alendronato, risedronato e pamidronato foram incorporados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Ministério Da Saúde, 2012). No geral existem 4 classes (gerações) dos BFs e isso influencia na potência dos mesmos (Ribeiro et al., 2018a). A presença de aminas (compostos nitrogenados) aumenta exponencialmente a potência do medicamento, a isso entende-se supressão da regeneração óssea com propriedades anti-angiogênicas, ativador de linfócitos T, resultando em um efeito tumoricida (Quadro 2.1) (Cleazardin, 2013; Migliorati et al., 2005).

O pamidronato e o zoledronato, em apresentação injetável, são indicados para tumores ósseos e doença de Paget. O zoledronato, ibandronato, alendronato e risedronato são indicados para o tratamento da osteoporose pós menopausa em mulheres, sendo apenas o alendronato e risedronato indicados para a osteoporose em homens (Farmacovigilância no Estado de São Paulo, 2013).

Quadro 2.1 Características dos BFs disponíveis no mercado

Genérico	Geração	Comercial	Nit	R1	R2	Indicações	Dose	Potência	Via
Etidronato	1ª	Didronel®, Ostopor®	Não	OH	CH ₃	Paget	5 mg/Kg/dia 400 mg/dia	1x	IV
Tiludronato	1ª	Skelid®	Não	H	C ₆ H ₄ ClS	Paget	400 mg/dia	10x	Oral
Clodronato	1ª	Bonefos®, Clasteon®, Clodron®, Clody®, Difosfonat®, Lodronat®, Loron®, Lytos®, Moticlod®, Neogrand®, Niklod®, Ostac®, Osteonorm®, Sindronat®, Traxovical®	Não	Cl	Cl	Neoplasias	300 mg/dia IV	10x	IV/Oral
Pamidronato	2ª	Aredia®	Sim	OH	(CH ₂) ₂ NH ₂	Paget Neoplasias	60 mg	100x	IV
Alendronato	2ª	Fosamax, Alendil, Recalfe, Endrox, Cleveron, Osteoral, Osteoform, Osteonan, Osteotrat, Osteofar, Bonalen, Endronax, Minusorb	Sim	OH	(CH ₂) ₃ NH ₂	Osteoporose Paget	Osteoporose 70 mg/sem. 10 mg/dia Paget 40 mg/dia por 6 meses	500x	Oral
Neridronato	3ª	* Não disponível no Brasil	Sim	OH	(CH ₂) ₅ NH ₂	Osteogênese imperfeita Paget	2 mg/Kg/dia, por 2 dias, a cada 3 meses (25, 50, 100 ou 200 mg por 2 dias)	100x	IV
Olpadronato	3ª	* Não disponível no Brasil	Sim	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂		10 mg/m ² /dia	500x	Oral
Ibandronato	3ª	Boniva®, Bondenza®, Bondronat®, Bonviva®, lasibon®	Sim	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃)(CH ₂) ₄ CH ₃	Osteoporose	150 mg/mês	1.000 x	IV/Oral
Risedronato	4ª	Actonel®	Sim	OH	CH ₂ -3-piridina	Osteoporose	35 mg/sem. 5 mg/dia	2.000 x	Oral
Zolendronato	4ª	Zometa®, Aclasta®	Sim	OH	CH ₂ -imidazol	Paget Osteoporose Neoplasias	5 mg ou 4mg Dose única (Semanal, mensal ou anual)	10.000 x	IV

Nota: Nit= Bifosfonato Nitrogenado IV= Intravenosa Cl= Cloro; H= Hidrogênio; OH= Hidroxila; CH₂ e CH₃= Hidrocarbonetos; N= Nitrogênio; NH₂= Compostos nitrogenados (amina secundária); * Potência Relativa ao Etidronato

Fonte: Adaptado de Fernandes et al. (2005), Ferreira Junior et al. (2007), Corrado et al. (2017), Ralston e Gaston (2020), Eguia et al. (2020)

2.2.2 MRONJ por BFs

A definição de MRONJ segundo a AAOMS (do inglês *American Association of Oral and Maxillofacial Surgery*) é a seguinte: "Os pacientes podem ser considerados com MRONJ causada por BFs se apresentar todas as características: (1) tratamento atual ou anterior com algum BF; (2) Osso exposto na região maxilofacial que persiste por mais de oito semanas; e (3) não ter história de radioterapia na região de cabeça e pescoço e que possa ter os maxilares englobados nas áreas de irradiações." Envolve mais comumente o osso da região posterior lingual de mandíbula (Ruggiero et al., 2006; Ruggiero et al., 2009; Migliorati et al., 2010; Migliorati et al., 2011; Martins et al., 2012).

O conceito de morte óssea (séptica) foi descrito em 1794 por James Russell, professor de cirurgia clínica da Universidade de Edimburgo. Depois de um século é que estudos mostraram que a necrose óssea poderia ocorrer na ausência de infecção (Nixon, 1983). Apesar da importância dessa complicação, a etiologia e a fisiopatologia da osteonecrose causada pelo uso do BF permanecem parcialmente desconhecidas (Lombard et al., 2016). Existem duas teorias sobre a patogênese e elas se baseiam no processo "de dentro para fora" e o "de fora para dentro". Na primeira existe a inibição da atividade osteoclástica e a diminuição da atividade óssea, ambas as condições induzidas por medicamentos. Isso causa micro dano da mandíbula/maxila induzido pela mastigação e a exposição desse osso a vários microrganismos patogênicos causa a inflamação, resultando em osteonecrose e posterior exposição óssea (Figura 2.3 - A). Segundo essa teoria a exposição óssea não poderia ser um pré-requisito para osteonecrose e isso foi relatado em estudos com humanos e animais. Em humanos, o estudo histológico de lesões de MRONJ concluiu que a osteonecrose precede o início clínico e é então responsável por um processo associado à inflamação (Lesclous et al., 2009). Nos estudos com animais, os autores também comprovaram por meio da histologia que antes mesmo de os animais terem exposição óssea, histologicamente já observava-se a osteonecrose (Aghaloo et al., 2011; Kang et al., 2013).

A teoria “de fora para dentro” baseia-se na imunodepressão local causada pelas medicações antirreabsortivas. Os BFs inibem a atividade dos osteoclastos e o *turnover* ósseo fica prejudicado, muitas vezes até ausente. Lesões em mucosas ou dentárias, como exodontias e manipulações de tecidos pode gerar uma inflamação ou infecção decorrentes de má higiene ou doença periodontal, por exemplo, que atinge a estrutura óssea, gerando a osteonecrose. Muitas vezes, a má higiene oral ou a doença periodontal pode ser um dos principais fatores desencadeantes da osteonecrose (Figura 2.3 – B) (Mawardi et al., 2011; Lombard et al., 2016).

Figura 2.3 - Esquema representativo de duas teorias de patogênese de MRONJ: teoria interna e externa

Fonte: Adaptado de Lombard et al. (2016)

A patogênese da osteonecrose é complexa e a regulação imunológica da homeostase óssea pode desempenhar um papel significativo, mas, em última análise, a morte óssea ocorre como resultado de completa ou parcial interrupção da entrega de oxigênio e/ou nutrientes ao osso e tecidos circundantes. Portanto, sabe-se que a via comum final na patogênese da osteonecrose é a interrupção do suprimento sanguíneo para algum segmento ósseo. A MRONJ pode ser resultado da alta taxa de renovação óssea dos maxilares ou porque os BFs exercem sua ação não apenas no osso, mas também em muitos elementos do tecido circundante, incluindo fibroblastos e vasos sanguíneos. Anormalidades no metabolismo lipídico, homeostase óssea, regulação da apoptose, coagulopatias, imunidade inata e estresse oxidativo também podem desempenhar um papel na patogênese da osteonecrose. Além disso, a epigenética pode alterar a predisposição para o desenvolvimento de osteonecrose. É provável que múltiplos mecanismos moleculares estejam em jogo simultaneamente para que a osteonecrose ocorra (Chang et al., 2017).

2.2.3 Tratamentos da MRONJ

O tratamento de MRONJ continua sendo um desafio e desde a primeira descrição da necrose óssea em pacientes recebendo terapia com BFs por Marx (2003), centenas de estudos foram publicados, com protocolos e diretrizes. No entanto, ainda existem muitas controvérsias em relação à classificação, gestão e prevenção de MRONJ (Ascani et al., 2014). Ambos os tratamentos conservadores e cirúrgicos têm sido propostos, dependendo do grau da doença clínica. O tratamento é integrado e envolve a utilização de antibióticos, irrigação local com solução de clorexidina, debridamento local e ressecção segmentar em casos de não-resposta a cirurgia ou procedimentos conservadores.

Os pacientes apresentam respostas diferentes aos tratamentos conservador ou cirúrgico e a não resolução leva à progressão da infecção e destruição óssea e esse fato afeta significativamente a qualidade de vida (Fassio et al., 2017). Estratégias de tratamento para o gerenciamento de MRONJ combinando terapias antibióticas e anti-fúngica, sequestrectomias, pentoxifilina

e tocoferol (vitamina E), ozônioterapia, oxigenoterapia hiperbárica, laser de baixa potência (LLLT sigla do inglês *low level laser therapy*), plasma rico em plaquetas (PRP), proteínas recombinantes morfogenéticas dos ossos humanos (rhBMPs do inglês *recombinant human bone morphogenetic proteins*) dentre os mais variados procedimentos cirúrgicos, como os debridamentos, resseções, foram relatados com sucesso (Beth-Tasdogan et al., 2017).

Wilde et al. (2011) descreveram uma técnica para tratamento cirúrgico da MRONJ que é caracterizada pela remoção por curetagem de todo o osso necrótico até a obtenção de margens seguras e tecido ósseo saudável (osso sangrante), além da realização de alisamento de todas as bordas cortantes ou irregulares para favorecer o fechamento primário da ferida operatória. Porém, em muitos casos não é possível realizar o fechamento primário devido à extensão da lesão óssea e consequente ausência de tecido gengival, sendo necessário lançar mão de membranas em região operada. Também pode haver deiscências no período de acompanhamento, o que pode trazer ainda maiores problemas para os pacientes, com doença progressiva e diminuição na qualidade de vida (Wilde et al., 2011).

2.3 ENGENHARIA CELULAR

2.3.1 Células-tronco da polpa dentária humana

O dente humano e suas estruturas de suporte são fontes de linhagens de CTs multipotentes. Em tecidos saudáveis, as CTs progenitoras presentes na polpa dentária humana, normalmente encontram-se em estado quiescente, porém, na presença de lesões que danifiquem ou destruam odontoblastos (a exemplo de cáries, traumas e restaurações) fatores de crescimento são liberados pela membrana extracelular, recrutando e induzindo esses tipos celulares a migrar, proliferar e se diferenciar, com a finalidade de substituir as células danificadas, e consequentemente os tecidos (Iohara et al., 2004; Harada et al., 2008; Ferracane et al., 2010; Harumi et al., 2011).

As CTMs são capazes de se diferenciar em vários tipos de células, incluindo condrócitos, mioblastos, osteoblastos e adipócitos. Devido ao seu potencial para diferenciação multilinhagem, CTMs são consideradas contribuintes importantes na pesquisa de engenharia de tecido ósseo. Eles têm a capacidade de se auto renovar e são pluripotentes capazes de se diferenciar em progenitores de diferentes tipos de células, como linhagens de osteoblastos, adipócitos, condrócitos e fibroblastos (Khosla et al., 2010; Toosi et al., 2018).

As CTs podem ser isoladas da polpa dentária (DPSC do inglês *dental pulp stem cells*) (Gronthos et al., 2000); da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED do inglês *stem cells from human exfoliated deciduous*) (Miura et al., 2003); do ligamento periodontal (PDLSC do inglês *periodontal ligament stem cells*) (Seo et al., 2004); da papila apical (SCAP do inglês *stem cells from the apical papilla*) (Sonoyama et al., 2008) e da gengiva humana (GMSC do inglês *mesenchymal stem cells derived from human gingiva*) (Zhang et al., 2009).

Os mais variados tipos de CTs são estudados para a regeneração tecidual e também para o reparo do tecido ósseo. Por terem baixa imunogenicidade, são uma brilhante escolha para transplante no local da lesão, além de não enfrentar barreiras éticas, já que normalmente o provedor da hDPSCs (dente) seria descartado após extrações dentárias (Gronthos et al., 2000; Pierdomenico et al., 2005; Arany et al., 2014; Jayaraman et al., 2016). Em sua forma indiferenciada, as CTMs podem funcionar como uma fonte de citocinas e fatores de crescimento (Virk; Lieberman, 2012).

2.3.2 Cell Sheets (Membrana Celular, MC)

O enxerto ósseo é capaz de induzir a formação de novo tecido ósseo pelas suas células, ou pela diferenciação das CTs *in loco*, além de agir como arcabouço (*scaffolds*) para neoformação óssea. Porém, em alguns casos pode ocorrer absorção imprevisível do enxerto em longo prazo. A cirurgia adicional do leito doador é um fator que pode contraindicar este tratamento. Sendo assim, a busca por um material que tenha características e vantagens semelhantes às do enxerto é alvo de vários estudos e a possibilidade de induzir a formação óssea

sem que o paciente seja submetido a outro procedimento cirúrgico poderia ser um grande avanço no tratamento destes pacientes. Nesse contexto, os estudos que aplicam a engenharia de cultivos do tipo "Membrana Celular" (MC, *Cell Sheets*) de CTs adultas tem se mostrado uma alternativa contemporânea promissora. As MCs são diferentes de uma simples suspensão de células por preservar o íntimo contato célula-célula e manter a organização estrutural, o que torna desnecessário o uso de arcabouços (*scaffolds*). Além disso, retém ao seu redor matriz extracelular endógena que contém diversos fatores de modulação importantes para a manutenção de seu fenótipo. Sendo assim, as MCs apresentam as mesmas características dos enxertos autólogos - osteogênese, osteoindução e osteocondução – o que as elege como alternativa à técnica convencional (Pedroni et al., 2018).

As CTs são células indiferenciadas que têm a habilidade de se diferenciar em um ou mais tipo de célula diferenciada ou madura (unipotentes, multipotentes, pluripotentes e totipotentes), além de se auto renovarem. As onipotentes se diferenciam em apenas um tipo de célula adulta (ex.: CTs musculares); as multipotentes em dois ou mais tipos de celulares , podendo ser células do feto em desenvolvimento e CTs adultas (como as mesenquimais e hematopoiéticas); as pluripotentes se diferenciam em todos os tipos de células de um organismo adulto, exceto linhagens extra embrionárias (ex.: CTs embrionárias, derivadas de embriões em estágio de blastocisto) e as totipotentes podem se transformar em qualquer tipo de célula adulta e também nos tecidos extraembrionários (Denham et al., 2005).

Um estudo recente tem demonstrado que a infusão intravenosa de células estromais mesenquimais multipotentes é eficaz para o tratamento de modelos de doença tipo MRONJ. Porém, Kaibuchi et al. (2016) desenvolveram uma membrana deste tipo de células marcadas com proteínas fluorescentes verde e investigaram o efeito do transplante em ratos com MRONJ. O grupo do estudo que recebeu a membrana teve melhor cicatrização da ferida em comparação com o grupo controle e com o grupo de recebeu células injetáveis (ocorrência de exposição óssea: 12,5%, 80% e 100%, respectivamente).

Outro estudo com CTMs e seu uso em doenças ósseas demonstra que as CTs estão prontas para revolucionar a medicina com a capacidade de substituir e reparar tecidos e órgãos. Dada a sua capacidade de se diferenciar

em outros tipos de células, as CTMs também foram testadas no tratamento de várias doenças, incluindo a diabetes e a doença de Parkinson e mais especificamente para a regeneração óssea. Acredita-se que a secreção de uma ampla gama de moléculas bioativas seja o principal mecanismo pelo qual as CTMs alcançam seu efeito terapêutico e pode ser dividido em seis categorias principais: (1) imunomodulação; (2) anti-apoptose; (3) angiogênese; (4) apoio ao crescimento e diferenciação de células-tronco e progenitoras locais; (5) anti-cicatrizante (anti-fibrose); e (6) quimioatração (Kong et al., 2017).

Um dos estímulos para obtenção de MCs é a suplementação do meio de cultivo com VC (Wei et al., 2012), substância que apresenta efeitos positivos no metabolismo celular. Nossa Instituição obteve resultados promissores com MCs de hDPSC em análises *in vitro* (Pedroni et al., 2018).

2.4 TERAPIA DA FOTOBIMODULAÇÃO (PBMT)

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* tem sido realizados para demonstrar a utilidade da PBMT para estimular a proliferação das células e da cicatrização de feridas. Segundo Anders et al. (2015) a PBMT é definida como "Uma forma de terapia de luz que utiliza formas não-ionizantes de fontes de luz, incluindo lasers, LEDs (do inglês *light emission diode*) e luz de banda larga, no espectro visível e infravermelho. Trata-se de um processo não térmico envolvendo cromóforos endógenos desencadeando eventos fotofísicos (isto é, lineares e não lineares) e fotoquímicos em várias escalas biológicas. Este processo traz resultados terapêuticos benéficos, incluindo alívio da dor ou inflamação, imunomodulação e promoção da cicatrização de feridas e regeneração de tecidos" (Anders et al., 2015).

Vários estudos têm demonstrado os efeitos da PBMT sobre a bioestimulação da nutrição de pele e mucosas no tratamento de MRONJ (Vescovi et al., 2007; Martins et al., 2012). O efeito da PBMT sobre a agilidade do processo de cicatrização, sobre o aumento da matriz inorgânica do osso e sobre o índice mitótico dos osteoblastos é considerável. A PBMT é relatada por alguns autores no tratamento da MRONJ e propõe resultados promissores

(Vescovi et al., 2007; Vescovi et al., 2008; Romeo et al., 2011; Martins et al., 2012). Este tratamento promove o crescimento celular e a angiogênese da área afetada, sendo muito utilizada em várias áreas das ciências biológicas para promover a regeneração dos tecidos. Esta terapia produz analgesia, efeito modulador da inflamação e efeitos biomoduladores (Reddy, 2004; Silveira et al., 2007). A luz vermelha visível e comprimentos de onda infravermelhos aumentam o metabolismo celular dos organismos sob condição de estresse devido à absorção de energia de componentes da cadeia respiratória (Lubart et al., 1997; Silveira et al., 2007; Hiremath et al., 2008).

2.5 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT)

aPDT é uma terapia não invasiva e uma alternativa para eliminar os microorganismos nas infecções orais, como periodontites, peri-implantites, entre outras. A aPDT se baseia na aplicação e retenção de um agente fotossensibilizador (FS) aplicado em tecidos alvo. Após a irradiação de luz em um comprimento de onda apropriado, o FS passa por uma transição do "estado fundamental" de baixo nível de energia para um "estado tripleto" de alta energia. Esse FS no estado tripleto é muito reativo e pode fazer dois tipos de reações. A reação tipo I é aquela onde o FS reage com biomoléculas das bactérias gerando superóxidos e radicais hidroxila e, a de tipo II é quando o FS reage com oxigênio molecular gerando oxigênio singlete altamente citotóxico. Essas espécies citotóxicas podem causar oxidação de constituintes celulares, como membranas plasmáticas e DNA, inativação do sistema de transporte de membrana, inibição das atividades enzimáticas da membrana plasmática, peroxidação lipídica, e outros, levando à morte celular (O'riordan et al., 2005; Komine, Tsujimoto, 2013; Cieplik et al., 2018).

O PDT foi desenvolvido como uma terapia para várias doenças, como tumores, periodontite, outras lesões orais e doenças pré-malignas. Assim sendo, PDT é a terapia para matar células malignas, enquanto o aPDT é para matar microorganismos. Essa terapia recebeu muitos nomes como por exemplo: inativação fotodinâmica (PDI do inglês *photodynamic inactivation*), desinfecção

fotoativada (PDA do inglês *photoactivation disinfection*) ou Quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica (PACT do inglês *photodynamic antimicrobial chemotherapy*) (Ceplic et al., 2018).

Protocolos preventivos visando diminuição de risco de infecção local antes, durante e depois de cirurgias parecem ter alguma eficácia na prevenção das MRONJs (Lodi et al., 2010). Entre eles, a aPDT tem sido aplicada. A aPDT consiste em um processo fotoquímico a frio (não acontece o aquecimento dos tecidos) e afeta somente os tecidos corados pelo FS, ou seja, os tecidos mais superficiais, como o tecido conjuntivo. Portanto, há menor risco à integridade das estruturas subjacentes quando comparado às técnicas de laser térmico e cirúrgico (Hopper, 2000). A aPDT é um método cada vez mais estabelecido para o tratamento de doenças orais associadas a bactérias, tais como periodontite, peri-implantite, MRONJ e outras infecções locais em cavidade oral (Lin et al., 2010; Schär et al., 2013; Bassetti et al., 2014; Diniz et al., 2014; Diniz et al., 2015). Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou dois estudos clínicos que demonstraram a eficiência do aPDT tanto na prevenção (Tartaroti et al., 2020) quanto no tratamento da osteorradionecrose (Pedroni et al., 2020).

3 PROPOSIÇÃO

Geral:

Investigar o efeito da aplicação de membranas celulares (MCs, do inglês *Cell Sheets*) de CTs da polpa dentária humana (hDPSCs do inglês *human dental pulp stem cells*), associadas ou não às terapias de PBMT e/ou aPDT, na regeneração de lesões ósseas causadas pelo uso de zolendronato (ZLN) em cavidade oral de ratos

Específicas:

- 1- Avaliar quantitativamente a formação de tecido ósseo mineralizado nas lesões em estudo por microtomografia computadorizada (MicroCT).
- 2- Avaliar qualitativamente em cortes histológicos o tecido dentro das lesões de MRONJ.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) sob número CAAE 66555117.6.0000.0075 (Anexo A), bem como ao Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o número 001/2017 (Anexo B). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi devidamente preenchido e assinado pelos pacientes que realizaram a doação dos terceiros molares e isso permitiu a utilização de seu material biológico para pesquisa. Os animais utilizados nesse estudo foram aclimatados e mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Oral do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. A metodologia do trabalho foi realizada em duas partes consecutivas, a saber: (1) estudo *in vitro*: obtenção das MCs; (2) estudo *in vivo*. O Cálculo Amostral e Poder do Teste foram aplicados para delimitar o número de animais necessários para este modelo experimental e os detalhes estatísticos estão descritos na sessão 4.4.1 Delimitação da amostra.

Estudo Piloto

4.1 ESTUDO PILOTO

No momento do depósito da Tese em outubro deste ano, o Estudo Piloto já estava aceito para publicação na *Journal of Biodentistry and Biomaterials*.

4.1.1 Indução da MRONJ

Durante o processo de desenvolvimento do estudo foram obtidos resultados do Estudo Piloto, realizado previamente ao início da etapa com os animais deste trabalho (Miniello et al., 2020). Foram induzidas lesões de MRONJ em 3 ratos Wistar de 45 dias de idade para poder determinar o melhor momento para instituir os tratamentos dessas lesões. Os ratos receberam por via intraperitoneal, 0,06 mg/kg ZLN (Zometa®, Novartis Pharma, Basel, Switzerland) uma vez por semana, sendo a primeira injeção no primeiro dia do estudo e as demais até a eutanásia dos animais. Seguindo a orientação da randomização, a aluna de iniciação científica (IC) preparou as injeções que foram passadas à pesquisadora (a bolsista) que realizou as aplicações de forma cega (Figura 4.5). Após 21 dias de tratamento com o ZLN, as lesões de MRONJ foram induzidas por meio de exodontia dos segundos molares superiores dos animais (Miniello et al., 2020).

Figura 4.1 – Fotografia ilustrando os procedimentos para o cálculo de doses e do posicionamento dos animais. (A). Pesagem para cálculo da dose a ser administrada. (B). Administração intraperitoneal de ZLN

Fonte: Miniello et al. (2020)

4.1.2 Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram submetidos à anestesia geral pela via intramuscular com cloridrato de xilazina 0,85 ml/Kg (Anasedan, Ceva Santé Animale, Brasil) e cloridrato de ketamina 0,85 ml/Kg (Quetamina, Vetnil, Brasil); na proporção de 1:1. O efeito anestésico foi constatado pela falta de reflexo para o pinçamento do dedo do pé. Em todos os animais a mesma sequência operatória foi seguida: após a pesagem, os animais foram submetidos à anestesia geral por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram posicionados com abridores de boca confeccionados com fio ortodôntico, seguindo-se à antissepsia do sítio cirúrgico com digluconato de clorexidina 0,12% (Figura 4.2). Foi realizada exodontia do segundo molar superior esquerdo ou direito de forma randômica em todos os animais, por via alveolar com mínimo trauma com a cureta perio 0-00. Todas as exodontias foram realizadas pelo mesmo pesquisador (a bolsista).

Figura 4.2 – Fotografias ilustrando o posicionamento dos animais para os procedimentos cirúrgicos. (A). Posicionamento do animal em uma mesa cirúrgica feita para este modelo experimental. (B). Vista da cavidade oral com microscópio posicionado

Fonte: Miniello et al. (2020)

Todas as cirurgias foram realizadas com os mesmos materiais e técnicas, tiveram duração similar e todas as medidas de biossegurança foram realizadas segundo as recomendações, instrumentais e campos cirúrgicos esterilizados. Foram incluídos no estudo os animais nos quais se conseguiram realizar a exodontia completa do segundo molar e dentro do tempo estipulado (20 minutos) (Miniello et al., 2020). Os animais que apresentaram fratura de alguma raiz dentária durante o procedimento cirúrgico ou cuja cirurgia excedeu o tempo limite foram excluídos da amostra final (Figura 4.3). Os procedimentos foram realizados no laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística com o auxílio de um microscópio cirúrgico (MC-M22/ DFV-projeto Edital Universal do CNPq 2010-# 482141/2012-3).

Figura 4.3 – Diagramas e fotografias ilustrativas das exodontias dos segundos molares da maxila. (A). Manobra de diérese. (B). Manobra de exérese. (C). Alvéolo sem dente

Fonte: O autor

Os cuidados pós-operatórios consistiram em aplicação de Tramadol (50 mg/ml; Tramadon®; Cristália, SP, Brazil) para fins analgésicos e fornecer ração triturada aos animais por período de 7 dias pós exodontias, além de acompanhar o desenvolvimento das lesões e o comportamento dos animais (Miniello et al.,

2020). Não utilizamos antibióticos por considera-los um tipo de tratamento para a MRONJ e poderíamos ter um viés na interpretação dos resultados.

4.1.3 Avaliação Clínica das Lesões

O diagnóstico clínico das lesões de MRONJ do Estudo Piloto foi baseado na observação de descontinuidade da mucosa com presença de osso exposto. As classificações clínicas foram estipuladas de acordo com Ruggiero et al. (2014), a saber:

- 0: Sinais e sintomas brandos com pequena quantidade de osso necrótico;
- 1: Osso necrótico exposto, porém com ausência de infecção;
- 2: Osso necrótico exposto com presença de infecção;
- 3: Osso necrótico exposto, infecção e fístula extraoral.

Foi observado que já era possível verificar alterações clínicas em região da exodontia 7 dias após o procedimento com classificação de estágio 0. Com 14 dias, as lesões já evoluíram para estágio 1 e continuavam com as mesmas características clínicas em 28 dias (Miniello et al., 2020) (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Imagens representativas dos aspectos clínicos das lesões de MRONJ obtidas no Estudo Piloto. (A). Alvéolo após 7 dias de extração. (B). Alvéolo 14 após a extração. (C). Alvéolo 28 dias após a extração

Fonte: Miniello et al. (2020)

4.1.4 Preparo das Amostras

Um animal foi eutanasiado em cada um dos tempos experimentais, a saber: 7, 14 e 28 dias após a indução de MRONJ. A eutanásia foi realizada por overdose anestésica seguida de guilhotina. A maxila foi imediatamente removida com tesoura cirúrgica, dissecando-se cuidadosamente para não manipular a região do defeito ósseo (Miniello et al., 2020) (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Fotografia da maxila dissecada. (A). Fotografia maxilar dissecada. (B). Fotografia hemimaxila dissecada

Fonte: Miniello et al. (2020)

Posteriormente, as peças foram fixadas em solução fixadora de formaldeído a 10% (preparada a partir de paraformaldeído) por 24 horas a 4 °C durante a noite. As amostras anatômicas foram descalcificadas em ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA) a 20% por aproximadamente 90 dias ou até que as peças estivessem completamente descalcificadas para inclusão em parafina e posterior obtenção de cortes histológicos que foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) (Miniello et al., 2020).

4.1.5 Avaliação Histológica das Lesões

Análise de cortes histológicos revelou em 7 dias após as exodontias, alteração da camada basal do epitélio, presença de intenso infiltrado inflamatório em 7 e 14 dias e infiltrado inflamatório mais proeminente em 28 dias. Foi observado osso necrótico dentro da lesão no animal de 14 dias (Figura 4.6), enquanto que no de 28 dias já havia acometimento inflamatório da região sinusal (Miniello et al., 2020).

Figura 4.6 – Fotomicrografias de cortes das amostras de 7, 14 e 28 dias após a extração dentária. A necrose óssea é observada em todos os períodos do estudo. Aos 7 dias as alterações histológicas são leves, enquanto aos 28 dias a inflamação é mais intensa, incluindo a presença de sinusites (H&E aumentos originais 100X, 200x e 400x).

7 dias

14 dias

28 dias

Fonte: Miniello et al. (2020)

De acordo com os dados do Estudo Piloto concluiu-se que o melhor momento para instituir os tratamentos experimentais propostos das lesões de MRONJ foi 14 dias após a exodontia do segundo molar superior (Miniello et al., 2020). Sendo assim, o esquema estabelecido para a nossa metodologia está descrito na Figura 4.11.

Parte 1: Estudo *in vitro*

4.2 ISOLAMENTO E CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas hDPSCs previamente obtidas e caracterizadas, criopreservadas no Banco de Células da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo no Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística.

As células foram descongeladas em banho de água e então cultivadas em meio de cultura clonogênico (Mclono) composto por: α -MEM (do inglês *α -minimal essential medium*) (GIBCO/Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com concentrações finais de 15% de soro fetal bovino (MSC-FBS, Gibco), 100 U/ml de solução de antibióticos (penicilina + estreptomicina; Pen Strep, Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 0,1 mM de solução de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA). As células foram então incubadas a 37 °C numa atmosfera úmida contendo 95 % de ar e 5 % de dióxido de carbono (CO₂) e expandidas até no máximo 4 passagens (P4).

A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente em microscópio invertido de fase e o meio de cultivo trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular (Figura 4.7). Os subcultivos foram feitos quando as células atingiram a subconfluência (aproximadamente 70-80 % do fundo da placa ocupado por células). As células foram destacadas com enzima proteolítica, solução de tripsina a 0,25 % (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas. As células foram ressuspensas e replaqueadas em novos frascos, criando novas passagens da cultura. Foram utilizadas alíquotas de células de primeira a terceira passagens (P1 a P3).

Figura 4.7 – Fotomicrografia de fase das CTs cultivadas

Fonte: O autor

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos de esterilidade dos materiais e soluções (normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8).

4.3 *CELL SHEET* (MEMBRANA CELULAR, MC)

4.3.1 **Obtenção das *Cell Sheets***

As hDPSCs de uma mesma passagem ($\leq P3$) foram plaqueadas em placas de 6 poços de 35 mm cada (5×10^4 células por poço). As células foram cultivadas em meio clonogênico e incubadas em estufa à 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Vinte e quatro horas após o plaqueamento foi acrescida uma solução de ácido ascórbico (vitamina C; VC) ao meio, de forma a gerar uma concentração final de 20 µg/ml. As células foram mantidas nos poços, sem subcultivos, por 10 dias, ou até que as MCs se soltassem da placa espontaneamente (Figura 4.8). Todo o meio de cultura dos poços foi trocado por meio clonogênico fresco acrescido de 20 µg/ml de VC a cada 2 dias (Pedroni, et al., 2018).

Figura 4.8 – Fotografia da membrana celular (*Cell Sheet*) de hDPSC induzida por Vitamina C

Fonte: O autor

As membranas obtidas foram utilizadas nos modelos experimentais em animais nos grupos de MC associadas ou não à PBMT e à aPDT.

Parte 2: Estudo *in vivo*

4.4 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Sessenta ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, de 45 dias de idade, 160-222 g de peso, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP) foram selecionados para o estudo e mantidos em gaiolas de polipropileno ventiladas, forradas com maravalha de madeira esterilizada, com ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, com alimentação baseada no suplemento alimentar (Special Diet RC) ração moída de 12 a 30g e água *ad libitum* (Figura 4.9).

Figura 4.9 – Fotografia dos animais condicionados no biotério

Fonte: O autor

4.4.1 Delimitação da amostra

Dados prévios, obtidos em experimentos similares do grupo de pesquisa, foram utilizados na aplicação do teste estatístico para o Cálculo Amostral e Poder do Teste. Foram utilizados médias e desvio padrão que foram submetidas ao Teste-t no programa G*Power 3.0.10 e chegou-se a um n de 6 animais por tempo para cada grupo experimental (Figura 4.10).

Figura 4.10 - Ilustração da curva de Gauss obtida com a aplicação do teste para o Cálculo Amostral (*Software G*Power 3.0.10*)

Fonte: O autor

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Todos os animais, exceto os do grupo controle positivo (CP), foram submetidos ao tratamento com zoledronato (ZLN) para desenvolverem MRONJ. Os grupos experimentais foram os que se seguem:

- **Controle positivo (CP):** Controle positivo: animais normoreativos, ou seja, sem utilização de ZLN;

Os demais grupos foram de animais exibindo as lesões de MRONJ que foram submetidos ao tratamento clínico e cirúrgico convencional (debridamento ósseo) seguido de um dos seguintes tratamentos:

- **Controle negativo (CN):** sem tratamento adicional;
- **MC:** aplicação de MC;
- **MC+PBMT:** aplicação de MC seguida de PBMT.
- **aPDT+MC:** aPDT seguida de aplicação de MC.

Foram 12 animais em cada grupo, ou seja, 60 animais no total. Destes, 6 por grupo foram eutanasiados em 7 dias após o tratamento das lesões, e os outros 6 em 28 dias. Os animais foram pesados para calcular a dose adequada, em relação à sedação, anestesia e analgesia. Os experimentos foram conduzidos seguindo as recomendações éticas do *Guide for Care and Use of Laboratory for animals* (National Research Council, 1996). A figura 4.11 apresenta um diagrama exibindo um esquema da cronologia de aplicação do ZLN e da realização dos tratamentos experimentais.

Figura 4.11 – Diagrama exibindo esquema da cronologia de aplicação do ZLN e da realização dos tratamentos experimentais

Fonte: O autor

4.6 INDUÇÃO DA MRONJ

Os grupos CN, MC, MC+PBMT e aPDT+MC receberam aplicações de ZLN semanalmente por 21 dias e o CP foi submetido às mesmas condições ambientais, porém recebendo aplicações com fisiológico a 0,9% de acordo com a mesma

posologia estabelecida no Estudo Piloto. De acordo com nosso Estudo Piloto, optamos por realizar os tratamentos de acordo com os grupos experimentais em 14 dias após a exodontia (Miniello et al., 2020). Todas as exodontias foram realizadas pelo mesmo pesquisador (a bolsista) que não sabia se o animal recebeu BFs ou solução salina.

4.7 TRATAMENTOS DAS LESÕES

4.7.1 Debridamento ósseo

Após a indução da MRONJ, os animais de todos os grupos experimentais, exceto os do grupo CP, foram submetidos ao mesmo protocolo cirúrgico. As cirurgias de debridamento ósseo foram efetuadas sob anestesia geral seguindo o mesmo protocolo citado anteriormente e padronizado pelo Estudo Piloto (Miniello et al., 2020). Durante o procedimento cirúrgico propriamente dito, foi realizada a incisão sobre o rebordo da região afetada, descolamento mucoperiostal e remoção de todo tecido necrótico. O tecido ósseo foi curetado com um escavador de dentina nº 5 até atingir osso sangrante e foi realizada a irrigação do leito cirúrgico com soro fisiológico a 0,9%. Os animais do CP foram submetidos às mesmas condições ambientais dos animais dos demais grupos, porém sem a realização de cirurgia de debridamento ósseo. Os animais do grupo CN após a cirurgia de debridamento receberam sutura com vicryl 6-0 (Ethicon®, agulha ¼, 8,0mm), enquanto os demais receberam os tratamentos adicionais de acordo com o grupo experimental e posteriormente, a sutura (Figura 4.12).

Figura 4.12 – Fotografias ilustrativas dos procedimentos de debridamento ósseo, colocação da *Cell Sheet* e sutura. (A). Debridamento ósseo 14 dias após extração dentária. (B). Colocação da *Cell Sheet* após o debridamento. (C). Sutura do alvéolo (seta)

Fonte: O autor

4.7.2 Membrana Celular (*Cell Sheet*)

Os animais do grupo MC receberam a MC no leito cirúrgico logo após o procedimento de debridamento ósseo. As MCs foram retiradas da estufa e levadas para a sala cirúrgica ao lado do Laboratório apenas neste momento. A colocação da MC no alvéolo foi realizada com a espátula de inserção nº 1 e acomodada na cavidade com o mínimo de manipulação. Em seguida, realizou-se a sutura com vicryl 6-0 (Ethicon®).

4.7.3 Terapia de Fotobiomodulação (PBMT)

Os animais do grupo MC+PBMT receberam a MC no leito cirúrgico logo após o procedimento de debridamento ósseo e em seguida realizou-se a sutura com vicryl 6-0 (Ethicon®) e a PBMT (Figura 4.14). Foi utilizado um equipamento laser de diodo de fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP) (DMC, São Carlos, SP, Brasil), em baixa intensidade e modo de operação contínuo, pontual e em contato, com os parâmetros utilizados por Martins et al. (2012) apresentados na Tabela 4.1:

Tabela 4.1- Parâmetros da PBMT

Grupo Experimental	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Área do feixe (cm ²)	Densidade de Potência (W/cm ²)	Tempo (s)	Densidade de energia (J/cm ²)	Energia por ponto (J)
MC+PBMT	660	40	0,028	1,43	6	8,6	0,24

Fonte: O autor

As irradiações foram feitas de forma pontual (2 pontos/lesão) e em contato com a mucosa do alvéolo: 1 por vestibular e 1 por palatino (Figura 4.13). A primeira irradiação foi realizada imediatamente após a sutura e depois em 48 e 96 horas. Para as irradiações realizadas em 48 e 96 horas os animais foram sedados levemente com a inalação de isoflurano (Isoforine®, Cristália, Itapira, SP, Brasil) até que perdessem os sentidos por segundos, apenas para as aplicações pontuais.

Figura 4.13- Fotografias ilustrativas dos procedimentos de PBMT. (A). Alvéolo recém suturado. (B). Fotobiomodulação por palatina. (C). Fotobiomodulação por vestibular

Fonte: O autor

A potência do equipamento foi aferida antes e após todas as sessões de irradiação, com auxílio de medidor de potência (Laser Check, MM Optics LTDA, São Carlos, SP, Brasil). O valor da emissão foi programado para o parâmetro do estudo através desse medidor, e não pelo valor no painel de controle do equipamento. Todos os procedimentos com o laser foram realizados seguindo todas as normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8.

4.7.4 Terapia fotodinâmica antibacteriana (aPDT)

Os animais do grupo aPDT+MC primeiramente foram submetidos ao procedimento de debridamento ósseo e em seguida a aPDT. Para a aPDT foi utilizado um equipamento laser de diodo de fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP) (DMC, São Carlos, SP, Brasil) posteriormente à colocação do fotossensibilizador solução de azul de metileno a 0,01% (Chimiolux®, DMC, São Carlos, Brasil). O tempo de pré-irradiação foi de 4 minutos em contato com a área a ser tratada e então a irradiação foi aplicada de modo contínuo, pontual e em contato (Figura 4.14), com os parâmetros utilizados por Minamisako et al. (2016), detalhados na tabela 4.2. Após a aPDT, os animais receberam a MC no leito cirúrgico e em seguida realizou-se a sutura com vicryl 6-0 (Ethicon®).

Figura 4.14 – Fotografias ilustrativas do tratamento com aPDT. (A). Aplicação da solução de azul de metileno a 0,01% por 4 minutos. (B). Irradiação foi aplicada de modo contínuo, pontual e em contato pela vestibular. (C). Irradiação pela palatina

Fonte: O autor

Tabela 4.2 - Parâmetros da irradiação da aPDT

Grupo Experimental	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Área do feixe (cm ²)	Densidade de Potência (W/cm ²)	Tempo (s)	Densidade de energia (J/cm ²)	Energia por ponto (J)
aPDT+MC	660	100	0,028	3,57	40	142,8	4

Fonte: O autor

4.8 COLETA DAS AMOSTRAS

Para avaliar a formação de tecido mineralizado no interior das lesões de MRONJ as amostras foram coletadas e processadas de forma semelhante às descritas no Estudo Piloto para a realização das análises microtomográficas (Miniello et al., 2020).

4.9 ANÁLISES DAS AMOSTRAS

Todos os resultados foram utilizados para a construção de um banco de dados em planilhas de Excel e foram posteriormente submetidos a programa de análise estatística pelo *software* GraphPad Prism 7.04. Para os dados numéricos (MicroCTs) foi aplicado um teste para determinar se apresentam distribuição normal ou não (Lilliefors). Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância ANOVA dois critérios complementada pelo teste de Tukey. Os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. Para ambos tratamentos o nível de significância adotado foi o de 5 % ($p \leq 0,05$).

4.9.1 Análise histomorfométrica de Microtomografia Computadorizada (MicroCT) de alta resolução

O método do MicroCT é capaz de fornecer informações adicionais sobre a variação na radiopacidade dos tecidos duros, além de ser um método não invasivo que possibilita análises tridimensionais (3D) de densidade e volume tecidual. As maxilas dissecadas e mantidas em solução tampão, foram levadas para o micro tomógrafo de alta resolução (SkyScan 1176; Bruker MicroCT, Kontich, Bélgica) localizado no Laboratório de Microtomografia do Instituto de Biologia da USP – São Paulo (Figura 4.15). A captação e digitalização seguiu os parâmetros descritos na tabela 4.3 (Romão et al., 2015).

Figura 4.15 – Fotografia das peças posicionadas para a MicroCT. (A). Posicionamento em sequência das amostras. (B) Contenção com parafilm. (C). Imagem captada

Fonte: O autor

Tabela 4.3 - Parâmetros do escaneamento para MicroCT

Parâmetros	SKY SCAN 1176
Filtro- AL	0,2
Resolução	9 μm
Voltagem	40 KV
Amperagem	500 μA
Ângulo de rotação	360°
Passo da rotação	0,3°
Quadros	3

Fonte: Romão et al. (2015)

Após a digitalização, as imagens foram reconstruídas e o eixo estabelecido pelo *software* DataViwer® (SkyScan, Bruker MicroCT, Reino Unido) assim como o volume de interesse (VOI). Posteriormente, os dados foram avaliados em *software* CTAnalyser® (SkyScan, Antuérpia, Bélgica) para análise de microestrutura de trabéculas a partir da região de interesse (ROI) nas imagens binárias (Figura 4.16).

Figura 4.16 – Fotografias das telas do computador na sequência de análise das MicroCTs. (A). Escaneamento e digitalização da imagem. (B). Imagens reconstruídas e o eixo estabelecido pelo *software* DataViewer (C-E). Limites definidos do VOI e do ROI a ser analisado no CTAnalyser®

Fonte: O autor

Para cada alvéolo onde foi mensurado o volume de tecido ósseo formado, a ROI foi a área do alvéolo do dente extraído delimitada pela raiz distal do primeiro molar superior e a mesial do terceiro molar, no plano sagital (Figura 4.17) (Hikita et al., 2009; Kaibuchi et al., 2016). O limiar máximo na escala de

cinza foi de 99, enquanto que o mínimo foi de 58, definido quanto à densidade trabecular, com base em radiografias não-binárias de cada amostra (Figura 4.17 - A). Com este limiar estabelecido, o programa CTAnalyser® (SkyScan, Bruker MicroCT, Reino Unido) analisou os dados quantitativos morfométricos ósseos: volume ósseo (VO) (mm^3), número de trabéculas (Tb.N) ($1/\text{mm}$), espessura de trabéculas (Tb.Th) (mm) e separação de trabéculas (Tb.Sp) (mm). A formação óssea relativa utilizando a razão entre o VO e o volume total de tecido (VT) (mm) (VO/TV) também foi realizada e gerou um documento .txt (extensão de arquivo) (Figura 4.17 – B/C). Esses dados também foram usados para construir imagens 3D por meio do software CTVox® (SkyScan, Antuérpia, Bélgica) (Figura 4.18).

Figura 4.17 – Fotografia das telas do computador na sequencia de análise do ROI. A. Seleção da escala de cinza 99-58. B. Análise propriamente dita. C. Documento .txt oferecido com os dados analisados

Fonte: O autor

Figura 4.18 – Fotografia 3D da MicroCT. (A). Plano Sagital. (B). Limites do ROI a ser analisado

Fonte: O autor

4.9.2 Processamento das amostras para análises histológicas

As mesmas peças anatômicas que foram analisadas em MicroCT (tempos experimentais de 7 e 28 dias) foram lavadas com tampão cacodilato de sódio (0,05M, pH 7,2) e então foi iniciado o processo de descalcificação em EDTA a 4,13 % por aproximadamente 60 dias - ou até que a descalcificação seja suficiente para permitir o corte das secções. Os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, infiltrados e posteriormente incluídos em parafina para posterior microtomia e processamento ideal a cada análise proposta (Miniello et al., 2020).

4.9.2.1 Análise histomorfológica por coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e histoquímica por coloração de Tricrômico de Masson

As maxilas contendo a lesão foram hemiseccionadas e cada parte foi emblocada separadamente para permitir a obtenção de cortes histológicos (4 μ m) até alcançar a parte central da lesão seja avaliada. Foram feitos 2 cortes seriados, sendo o primeiro processado para coloração de H&E e o segundo para Tricrômico de Masson. Os cortes foram processados para coloração de H&E e analisados qualitativamente por microscopia de luz, sendo observados aspectos

das regiões de bordas e central dos alvéolos dentários. Foram observados o tecido ósseo na base das lesões, o tecido epitelial que recobria as lesões e o tecido no interior das lesões.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA- MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (MICROCT) DE ALTA RESOLUÇÃO

A análise entre os grupos indicou que aos 7 dias o VO foi similar em todos os grupos experimentais. Aos 28 dias o VO do grupo MC foi significativamente maior quando comparado aos dos outros grupos, a saber: comparado ao CP ($p = 0,0252$) e ao MC+PBMT ($p = 0,0218$). Os demais grupos em 28 dias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados entre si ($p > 0,05$) (Gráfico 5.1). Todos os grupos apresentaram Tb.N (Gráfico 5.2), Tb.Th (Gráfico 5.3), Tb.Sp (Gráfico 5.4) e o VO/VT (Gráfico 5.5) similar em ambos os tempos experimentais.

Gráfico 5.1 - Representação gráfica dos resultados de volume ósseo (VO) (mm^3). Barras indicam erro padrão da média (SEM). * indica diferença significativa com os dados de VO dos demais grupos marcados com & no tempo de 28 dias & dados semelhantes entre si

Fonte: O autor

Gráfico 5.2 - Representação gráfica dos resultados de número de trabéculas (Tb.N) (1/mm). Barras indicam erro padrão da média (SEM)

Fonte: O autor

Gráfico 5.3 - Representação gráfica dos resultados de espessura de trabéculas (Tb.Th) (mm). Barras indicam erro padrão da média (SEM)

Fonte: O autor

Gráfico 5.4 - Representação gráfica dos resultados de distância entre as trabéculas (Tb.Sp) (mm). Barras indicam erro padrão da média (SEM)

Fonte: O autor

Gráfico 5.5 - Representação gráfica das médias das porcentagens (%) de volume ósseo relativo (VO/VT) (mm). Barras indicam erro padrão da média (SEM). A. Representação gráfica dos dados gerais. B. Representação gráfica com demonstração pontual dos dados

Fonte: O autor

5.2 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

5.2.1- Grupo 1- Controle Positivo

Os espécimes do grupo controle positivo, onde as lesões de MRONJ receberam apenas o tratamento cirúrgico (debridamento), exibiam em 7 dias tecido conjuntivo denso com escasso infiltrado inflamatório mononuclear (Figs. 5.1A,B). As lesões se encontravam recobertas parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado e corrugado, envolvendo fragmentos de osso necrótico (Figs. 5.1A,B). Na base das lesões eram encontradas algumas trabéculas de tecido ósseo neoformado acima da cortical óssea e que preenchiavam parcialmente a área da lesão (Fig. 5.1C). Essas trabéculas eram bastante similares às encontradas nos espécimes de controle negativo aos 7 dias (Fig. 5.1D). Aos 28 dias, o epitélio que recobria as lesões de MRONJ ainda se apresentava proliferado. As lesões exibiam tecido conjuntivo aparentemente mais denso que em 7 dias, e com infiltrado inflamatório escasso (Figs. 5.1.E, F). Fragmentos de osso necrótico não eram mais facilmente observados de permeio ao tecido conjuntivo. A base das lesões se apresentavam mais delgadas, compostas por osso com trabéculas próximas e largas. Esse osso neoformado se projetava também abaixo da cortical óssea da maxila (Figs. 5.1G,H). Ao redor de algumas das trabéculas era possível encontrar células de recobrimento ósseo e entre as trabéculas existiam algumas células gigantes multinucleadas (Figs. 5.1G,H).

Figura 5.1 - Fotomicrografias ilustrativas dos espécimes do grupo 1 - Controle Positivo (CP). (A-D: 7 dias); (E-H:28 dias). (A,B). Tecido conjuntivo denso com escasso infiltrado inflamatório mononuclear envolvendo fragmentos de osso necrótico (seta, A) e epitélio proliferado (H&E; aumento original 40X e 100X, respectivamente). (C). Trabéculas de tecido ósseo neoformado acima da cortical óssea (Tricrômico de Masson; aumento original 40X). (D). Trabéculas escassas de tecido ósseo neoformado abaixo do osso cortical (Tricrômico de Masson; aumento original 100X). (E,F). Tecido conjuntivo aparentemente mais denso que em 7 dias, e com infiltrado inflamatório escasso. Elementos estranhos compatíveis com fragmentos de ração tanto no tecido conjuntivo quanto no epitélio são observados (H&E; aumento original 40X e 100X, respectivamente). (G,H). Células de recobrimento ósseo ao redor de algumas das trabéculas e células gigantes multinucleadas (H&E; aumento original 40X e 100X, respectivamente)

Fonte: O autor

5.2.2- Grupo 2- Controle Negativo

Os espécimes do grupo controle negativo, onde as lesões de MRONJ não receberam nenhum tratamento, exibiam em 7 dias um tecido conjuntivo infiltrado por células inflamatórias, algumas vezes formando coleções de polimorfonucleares neutrófilos (microabscessos) e fragmentos dispersos de osso necrótico, muitas vezes envoltos por células gigantes multinucleadas (Figs. 5.2A, B). As lesões estavam parcialmente recobertas por epitélio pavimentoso estratificado, exibindo projeções profundas e edema intercelular, especialmente na camada basal (Figs. 5.2A,B). Na base das lesões eram encontradas algumas trabéculas escassas de tecido ósseo neoformado acima do osso cortical, dentro da área da lesão de MRONJ (Fig. 5.2 C). Osteoblastos e células de revestimento ósseo (CRO) não eram observadas na periferia das trabéculas que delimitavam tecido conjuntivo infiltrado por células inflamatórias (Fig. 5.2D). Aos 28 dias, o epitélio que recobria parcialmente as lesões de MRONJ ainda se apresentava proliferado e com edema intercelular nas suas camadas mais basais. As lesões exibiam tecido conjuntivo aparentemente mais denso que em 7 dias, porém ainda com infiltrado inflamatório e áreas de hemorragia (Figs.5.2E, F). Fragmentos de osso necrótico e células gigantes multinucleadas ainda eram observados de permeio ao tecido conjuntivo (Fig. 5.2F). A base da lesão ainda apresentava osso neoformado imaturo escasso e quiescente (Figs. 5.2G,H). Entre as trabéculas era possível encontrar células gigantes multinucleadas (Fig. 5.2H).

Figura 5.2 - Fotomicrografias ilustrativas dos espécimes do grupo 2 - Controle Negativo (CN). (A-D: 7 dias) (E-H: 28 dias). (A, B). Tecido conjuntivo infiltrado por células inflamatórias, coleções de polimorfonucleares neutrófilos (microabscessos) e fragmentos dispersos de osso necrótico (setas) (H&E; Tricrômico de Masson, respectivamente; aumento original 100X). (C,D). Trabéculas escassas de tecido ósseo neoformado acima do osso cortical (Tricrômico de Masson; aumento original 40X, Tricrômico de Masson; aumento original 100X, respectivamente). (E). Epitélio proliferado e edema intercelular nas camadas mais basais (H&E; aumento original 40X). (F). Fragmentos de osso necrótico e células gigantes multinucleadas (H&E; aumento original 100X). (G,H). Osso neoformado imaturo escasso e quiescente e células gigantes multinucleadas (Tricrômico de Masson; aumento original 40X e 100X, respectivamente)

Fonte: O autor

5.2.3 Grupo 3- Membrana Celular

Os espécimes do grupo de Membrana Celular (MC), onde as lesões de MRONJ receberam após o debridamento a MC, exibiam em 7 dias tecido conjuntivo frouxo bastante reativo, com infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear, principalmente ao redor de fragmentos de osso necrótico (Fig. 5.3A). Esses fragmentos encontravam-se em diferentes regiões da lesão, muito deles de permeio ao tecido epitelial (Fig. 3A). As lesões se encontravam recobertas parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado, envolvendo fragmentos de osso necrótico (Fig. 5.3A). Na base das lesões era encontrado osso lamelar recoberto por células de recobrimento ósseo e escassas células gigantes multinucleadas. Projeções de osso neoformado para dentro das lesões também era observado (Fig. 5.3B). Osso neoformado, de trabéculas finas e interconectadas era observado em abundância para fora da cortical óssea da maxila (Figs. 5.3B, C). Dentro das lesões fragmentos de tecido mineralizado ora similares a osso (Fig. 5.3C), ora similar a tecido dentinário (Fig.5.3D) eram observados preenchendo a área das lesões. Aos 28 dias, o epitélio que recobria parcialmente as lesões de MRONJ apresentavam características de normalidade. As lesões exibiam tecido conjuntivo ainda denso, e livres de infiltrado inflamatório (Figs. 5.3E-G). Fragmentos de osso necrótico ainda eram observados nas lesões, na sua maioria envoltos por tecido epitelial (Fig.3E). A base das lesões apresentava osso tanto abaixo, como acima da cortical óssea com trabéculas próximas e largas exibindo elementos de tecido mais maduro, como osso lamelar (Fig. 5.3G). Trabéculas de tecido ósseo neoformado eram observadas projetando-se para dentro da lesão. Essas trabéculas apresentavam-se bastante reativas, com osteoblastos e/ou células de recobrimento ósseo por toda a superfície das mesmas. Células gigantes multinucleadas também eram observadas ao redor dessas trabéculas (Fig. 5.3H).

Figura 5.3 - Fotomicrografias ilustrativas dos espécimes do grupo 3 – Membrana Celular (MC). (A-D: 7 dias) (E-H: 28 dias). (A). Tecido conjuntivo frouxo reativo, infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear, principalmente ao redor de fragmentos de osso necrótico (setas) (H&E; aumento original 40X). (B). Osso lamelar recoberto por células de recobrimento ósseo e escassas células gigantes multinucleadas. Projeções de osso neoformado na base (H&E; aumento original 40X). (C). Fragmentos de tecido mineralizado similares a osso no dentro da lesão (Tricrômico de Masson; aumento original 100X). (D). Tecido mineralizado similar a tecido dentinário de permeio a trabéculas ósseas dentro da lesão (Tricrômico de Masson; aumento original 100X). (E, F). Tecido conjuntivo denso, livre de infiltrado inflamatório. Fragmentos de osso necrótico envolto por tecido epitelial (setas) (H&E; aumento original 40X e 100X, respectivamente). (G, H). Osso abaixo e acima da cortical óssea, trabéculas próximas e largas exibindo elementos de tecido mais maduro. Trabéculas de tecido ósseo neoformado eram observadas projetando-se para dentro da lesão (H&E; aumento original 40X e 100X, respectivamente)

Fonte: O autor

5.2.4- Grupo 4- Membrana Celular + PBMT

Os espécimes do grupo MC+PBMT, onde as lesões de MRONJ receberam após o debridamento a MC e, a seguir a terapia de PBMT, exibiam em 7 dias tecido conjuntivo denso bastante reativo, com infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear, principalmente ao redor de fragmentos de osso necrótico (Fig. 5.4A). As lesões se encontravam recobertas parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado com aspecto de normalidade, algumas vezes englobando fragmentos de osso necrótico (Fig. 5.4A). Na base das lesões era encontrado osso lamelar recoberto por camada de osteoblastos ou de células de recobrimento ósseo e escassas células gigantes multinucleadas. Próximo às raízes dentárias o tecido parecia mais reativo com diversas células gigantes multinucleadas, inclusive dentro de áreas de reabsorções das raízes dentárias (Figs. 5.4A,B). Osso neoformado era observado em abundância para fora e para dentro da cortical óssea da maxila (Figs. 5.4C, D). O osso abaixo da cortical óssea da maxila exibia aspecto de osso maduro do tipo lamelar, enquanto para dentro da lesão as trabéculas apresentavam-se com espessuras variadas, interconectadas ocupando áreas extensas da lesão (Fig. 5.4D). Aos 28 dias, o epitélio que recobria parcialmente as lesões de MRONJ apresentavam características de normalidade e ainda era possível observar fragmentos de tecido ósseo necrótico envolto por células epiteliais. (Figs. 5.4E, F). As lesões exibiam tecido conjuntivo denso, e livres de infiltrado inflamatório, exceto pequenos focos ao redor de osso necrótico ou de elementos compatíveis com restos alimentares. As trabéculas ósseas apresentavam-se bastante reativas, com osteoblastos e/ou células de recobrimento ósseo por toda a superfície das mesmas. (Figs. 5.4E, F). A base das lesões apresentava osso apenas osso acima da cortical óssea com trabéculas próximas e largas exibindo elementos de tecido mais maduro, como osso lamelar (Fig. 5.4G). Trabéculas de tecido ósseo neoformado eram observadas projetando-se para dentro da lesão em continuidade com adensamentos de fibras colágenas (Fig.5.4H). Células gigantes multinucleadas também eram observadas ao redor dessas trabéculas (Fig. 5.4H).

Figura 5.4 - Fotomicrografias ilustrativas dos espécimes do grupo 4 – Membrana Celular e PBMT (MC+PBMT). (A-D: 7 dias) (E-H: 28 dias). (A). Tecido conjuntivo denso bastante reativo, com infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear ao redor de fragmentos de osso necrótico (seta) (H&E; aumento original 40X). (B). Osso lamelar recoberto por camada de osteoblastos ou de células de recobrimento ósseo e escassas células gigantes multinucleadas. Áreas de reabsorções das raízes dentárias (H&E; aumento original 100X). (C, D). Osso neoformado era observado em abundância para fora e para dentro da cortical óssea da maxila (Tricrômico de Masson; aumento original 40X e 100X, respectivamente). (E). Fragmentos de tecido ósseo necrótico envolto por células epiteliais (seta) (H&E; aumento original 40X). (F). Tecido conjuntivo denso, pequenos focos de infiltrados inflamatórios ao redor de osso necrótico ou de elementos compatíveis com restos alimentares e osteoblastos e/ou células de recobrimento ósseo (setas) (H&E; aumento original 100X). (G). Cortical óssea com trabéculas próximas e largas exibindo elementos de tecido mais maduro como o lamelar (Tricrômico de Masson; aumento original 40X). (H). Trabéculas de tecido ósseo neoformado projetando-se para dentro da lesão em continuidade com adensamentos de fibras colágenas (Tricrômico de Masson; aumento original 100X)

Fonte: O autor

5.2.5 Grupo 5 - a PDT + Membrana Celular

Os espécimes do grupo aPDT+MC, onde as lesões de MRONJ receberam após o debridamento a terapia de aPDT e então a MC exibiam em 7 dias tecido conjuntivo denso livre de infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear (Fig. 5.5A). As lesões se encontravam recobertas parcialmente por epitélio pavimentoso estratificado com aspecto de normalidade, sem projeções para o conjuntivo (Fig. 5.4A). Na base das lesões era encontrado osso lamelar recoberto por camada de osteoblastos ou de células de recobrimento ósseo. Esse osso na base da lesão se apresentava compacto e se assemelhava muito ao da cortical óssea da maxila com superfície homogênea na sua face voltada para a lesão. A delimitação entre cortical óssea e osso neoformado parecia mais tênue do que aquela dos outros grupos (Figs. 5.5A,B). Próximo às raízes dentárias o tecido parecia mais reativo com algumas células gigantes multinucleadas, inclusive dentro de áreas de reabsorções das raízes dentárias (Fig. 5.4C). Trabéculas de tecido ósseo eram observados dentro da área da lesão (Fig. 5.5C) e também material calcificado similar a tecido dentinário também eram algumas vezes observado de permeio a esse osso (Figs. 5.5D). Aos 28 dias, o epitélio que recobria parcialmente as lesões de MRONJ se apresentavam mais proliferado de permeio a material exógeno compatível com fragmentos de alimentos (Figs. 5.4E, F). As lesões exibiam tecido conjuntivo denso e livres de infiltrado inflamatório (Figs. 5.4.E, F). A base das lesões apresentava osso apenas osso acima da cortical óssea com trabéculas próximas e largas exibindo elementos de tecido mais maduro, como osso lamelar (Fig. 5.4G). Nos espécimes de 28 dias era mais fácil observar a delimitação entre cortical óssea e osso neoformado (Fig. 5.5 G). Ao redor dessas trabéculas de tecido ósseo neoformado eram observadas células gigantes multinucleadas em lacunas de Howship (Fig. 5.4H).

Figura 5.5 - Fotomicrografias ilustrativas dos espécimes do grupo 5 - aPDT + Membrana Celular (aPDT + MC). (A-D: 7 dias) (E-H: 28 dias). (A). Tecido conjuntivo denso livre de infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear (H&E; aumento original 40X). (B). Na base da lesão o osso é compacto semelhante ao da cortical óssea da maxila com superfície homogênea na sua face voltada para a lesão (H&E; aumento original 40X). (C). Áreas de reabsorções das raízes dentárias (H&E; aumento original 100X). (D). Material calcificado similar a tecido dentinário de permeio ao osso (H&E; aumento original 100X). (E/F). Epitélio mais proliferado de permeio a material exógeno compatível com fragmentos de alimentos. Tecido conjuntivo denso e livres de infiltrado inflamatório (H&E; aumento original 40X). (G). Osso acima da cortical óssea com trabéculas próximas e largas exibindo elementos de tecido mais maduro, como osso lamelar (Tricrômico de Masson; aumento original 40X). H. Células gigantes multinucleadas em lacunas de Howship ao redor das trabéculas de tecido ósseo neoformado (Tricrômico de Masson; aumento original 100X)

Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

A necrose óssea relacionada a medicamentos antirreabsortivos (MRONJ) é uma condição patológica que pode ocorrer em pacientes oncológicos, que recebem altas concentrações de BFs, ou os que recebem tratamento para doenças ósseas como a osteoporose, por exemplo. Além do tempo prolongado de tratamento, em pacientes oncológicos, as doses dos BFs são administradas por intravascular, ao contrário da maioria dos casos de osteoporose em que essas drogas são administradas por via oral (Migliorati et al., 2005). Mesmo assim, quando do uso de BFs aplicados anualmente por via intravascular, mais especificamente o ZLN, para o tratamento da osteoporose pós-menopausa, as chances de o paciente desenvolver a MRONJ também são grandes (Miniello et al., 2015). De acordo com revisões de estudos sobre a MRONJ, fica explícita a necessidade do melhor entendimento de toda a fisiopatologia da doença e consequentemente, padronização dos tratamentos para que os pacientes acometidos tenham melhor qualidade de vida.

Até o momento não há tratamento definitivo eficaz para essas lesões. Nos casos em que os pacientes apresentam lesões de MRONJ extensas, tratamentos mais invasivos são utilizados. Porém, tratamentos conservadores devem ser indicados sempre que possível. Entre esses tratamentos para MRONJ destaca-se a utilização da terapia de fotobiomodulação (PBMT) (Vescovi et al., 2007; Martins et al., 2012) por sua ação que promove a regeneração tecidual (Pereira et al., 2002; Eduardo et al., 2008; Marques et al., 2016; Diniz et al., 2018; Hosseinpour et al., 2019) e a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) por sua ação no controle de infecções (Diniz et al., 2015, Pedroni et al., 2020; Tartaroti et al., 2020). Outras alternativas são baseadas na utilização da engenharia de tecidos ou de terapias celulares, como a aplicação de membrana celular (MC) (Wei et al., 2012; Pedroni et al., 2018; Garrido et al., 2019). Baseado no exposto, a hipótese deste estudo foi a de que com a aplicação de MCs, associadas ou não às terapias de PBMT e/ou aPDT, terapias com mecanismos de ação distintos, promoveria formação de maior quantidade de osso e melhor resposta tecidual na regeneração das lesões de MRONJ induzidas por ZLN em ratos. Ao testar essa hipótese o presente estudo se

mostrou inovador e poderá abrir um novo caminho para pesquisas na área. Na verdade, até o momento, na literatura por nós compulsada, não foi possível encontrar outros estudos que tenham realizado tratamentos de lesões de MRONJ com MC associados ou não às terapias baseadas na biofotônica. Isoladamente, a PBMT e a aPDT já são utilizadas por alguns clínicos com bons resultados no que se refere ao controle ou prevenção da MRONJ (Martins et al., 2012; Beth-Tasdogan et al., 2017; Hafner et al., 2016; Pedroni et al., 2020; Tartaroti et al., 2020). Apesar do tempo experimental de 28 dias não ter sido suficiente para a observação de fechamento clínico das lesões, houve formação de osso mineralizado significativamente maior no grupo tratado com a MC quando comparado aos demais tratamentos. Além disso, a resposta tecidual nesse grupo foi a mais exuberante na avaliação histológica, em ambos os tempos experimentais. Tanto a PBMT quanto o aPDT aplicados juntamente com a MC foram capazes de modular a resposta tecidual à aplicação das MC, mostrando a formação de tecido mais organizado de permeio a trabéculas ósseas de aspecto mais maduro.

A extração dentária ou qualquer manipulação óssea nos ossos maxilares em pacientes que recebem BFs, inclusive a instalação de implantes dentários, é considerada como risco para o desenvolvimento de lesões de MRONJ, dentre outros fatores (Ruggiero et al., 2014; Miniello et al., 2015). De fato, lesões de MRONJ foram detectados 14 dias após as exodontias em 100% dos animais que receberam o ZLN por 21 dias (semanalmente) e foram submetidos à extração dentária. Ao contrário do grupo controle positivo, onde as exodontias foram realizadas em animais que não receberam o ZLN (normoreativos), a mucosa sobre os alvéolos dos animais experimentais não fechou durante todo o tempo experimental, independentemente do tratamento que foi estabelecido. Dessa forma, nosso trabalho corrobora com um dos fatores do surgimento de lesões de MRONJ, que são as exodontias.

A grande preocupação dos clínicos na atualidade é a falta de consenso na literatura sobre o melhor tratamento para essa condição (Hokugo et al., 2019). O tratamento convencional da MRONJ descrito por Wilde et al. (2011), hoje amplamente utilizado e considerado o padrão ouro, consiste na técnica de debridamento ósseo para remoção de tecido necrótico e suavização de bordas irregulares e agudas, favorecendo a cicatrização da ferida operatória. Mesmo

assim, nem sempre se obtém resultados favoráveis e melhora do quadro do paciente com o procedimento (Miniello et al., 2019). De fato, nossos dados demonstraram que os animais do grupo controle negativo (CN) tratados apenas com debridamento ósseo, apresentaram alterações teciduais com caráter inflamatório mais notório do que nos demais grupos, com presença de reabsorção de raiz, anquilose e edema na lâmina própria, evidenciando um atraso no processo cicatricial. Mais ainda, na avaliação de formação de tecido ósseo mineralizado, este grupo mostrou volume ósseo significativamente menor que um dos demais grupos, aquele tratado com membrana celular. Esse resultado provavelmente deve ser devido ao fato do grupo CN não ter recebido tratamento adicional e toda a estrutura óssea removida no debridamento causou um defeito ósseo que não recebeu estímulos para uma possível regeneração, como ocorreu quando da aplicação da MC.

Estudos *in vitro* e *in vivo* das terapias celulares baseadas em CTs de origem dentoalveolar, o que inclui as hDPSCs, demonstraram resultados favoráveis e promissores no que se refere à sua aplicação para a regeneração de tecidos (Moreira et al., 2017; Diniz et al., 2018; Ferreira et al., 2019; Moreira et al., 2018). O tecido ósseo é um dos que apresenta grandes dificuldades regenerativas no quesito quantidade (volume) e qualidade, visto que são as maiores barreiras encontradas pelos profissionais para a reabilitação oral, seja com próteses ou implantes dentários. O padrão ouro de enxertia óssea ainda é o autólogo, porém, a absorção imprevisível em longo prazo e a morbidade do paciente pela necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica na área doadora pode contraindicar seu uso (Dimitriou et al., 2011). No entanto, mesmo que técnicas de enxertia óssea sejam muitas vezes favoráveis à regeneração óssea em pacientes normoreativos, no que se refere à regeneração em pacientes em uso ou que já utilizaram BFs, esse tratamento não tem a mesma taxa de sucesso haja vista os vários fatores fisiopatológicos presentes nestes pacientes que atrasam ou impedem uma adequada cicatrização tecidual (Papapoulos; Cremers, 2007; Chang et al., 2017). Nesse cenário, as MCs passam a ser uma alternativa promissora aos enxertos autógenos pela similaridade de características de regeneração óssea, com a vantagem de MC poder, possivelmente, fornecer melhores ou iguais condições de formação de

VO que os autógenos pela sua própria constituição que é rica em CTs prontas para se diferenciarem em células formadoras de osso.

Até o momento, não há relatos sobre o uso de tais técnicas em humanos para regeneração óssea dos maxilares, mas as MCs foram testadas em estudos translacionais que mostraram resultados promissores. Nakamura et al. (2010) mostraram que a fratura do fêmur foi completamente curada pelo transplante de MC de células da medula óssea de rato e os autores sugeriram que a técnica poderia ser aplicada na reconstrução de tecidos duros em casos difíceis, como defeitos ósseos críticos e osteonecroses. Já Wang et al. (2017) incorporaram MC em grânulos de fibrina ricos em plaquetas e hidroxiapatita para a enxertia óssea, que promoveram extensa regeneração óssea na calvária de coelhos. Ueyama et al. (2016) demonstraram a neoformação óssea em abundância em um grupo de ratos com modelo de sínfise mandibular tratado com transplante de MC de células mesenquimais osteogênicas. Esses estudos, assim como o nosso, indicam que a aplicação da técnica da MC de CTs é uma abordagem terapêutica promissora para a substituição óssea de forma eficaz, seja em quantidade e/ou volume de tecido, associadas ou não a biomateriais. Mais ainda, nosso estudo mostra que ela isoladamente pode trazer melhores condições regenerativas que o tratamento com debridamento somente, por exemplo. Assim, essa técnica seria útil para o tratamento de defeitos ósseos de pacientes portadores de doenças que prejudicam o reparo ósseo, como diabetes *mellitus*, osteoporose e osteonecrose dos maxilares.

Células tronco mesenquimais (CTMs) originadas de tecidos dentais, como as utilizadas no presente estudo, as CTs do ligamento periodontal (Wada et al., 2009), CTs da papila apical e aquelas derivadas de gengiva (Zhang et al., 2009) demonstraram ter efeitos imunomoduladores enquanto inibem a proliferação e a função dos linfócitos T (De Sá Silva et al., 2012). Além destas, nosso grupo já demonstrou em estudo anterior que as SHEDs (do inglês *mesenchymal stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth*) induzem um fenótipo regulador imunológico em células moDCs (moDCs do inglês *monocyte-derived dendritic cells*), evidenciadas por mudanças na maturação e taxas de diferenciação, inibição da estimulação linfocitária e capacidade para expandir as células T CD4 (do inglês *cluster of differentiation*) + FoxP3 + (do inglês *regulatory T cells [Tregs]*) (De Sá Silva et al., 2014). Assim

sendo, CTs de polpa dentária humana podem ser aplicadas em ratos, não havendo a necessidade de se utilizar animais imunossuprimidos, já que estas células apresentam baixa imunogenicidade. Alguns dos questionamentos que podem surgir sobre a obtenção e manipulação das MCs é o tempo que elas levariam para serem obtidas e utilizadas clinicamente. O cultivo é simples e elas podem ser facilmente preparadas em laboratório com o objetivo de utilização em engenharia tecidual. As hDPSCs podem ser isoladas, expandidas, congeladas e armazenadas em quantidades suficientes para serem utilizadas em momento oportuno, garantindo-se que não perdem suas propriedades após o descongelamento (Li et al., 2017). Adicionalmente, a extração do terceiro molar para obtenção de DPSCs é um procedimento eletivo e corriqueiro na odontologia. As MCs possuem uma matriz extracelular que atua como *scaffold* natural para as CTs e essa característica nos leva a pensar na sua utilização para o tratamento de perda óssea sem necessidade de *scaffolds* artificiais ou substitutos ósseos, como já se utiliza atualmente e muitas vezes sem sucessos regenerativos. Outro modo de utilização seria na interface de enxertos em bloco (autógenos, alógenos, heterógenos ou sintéticos) onde as falhas em *gap* e dificuldade de celularização e vascularização são os maiores desafios para o sucesso imediato e tardio da técnica de enxertia óssea.

Nossos resultados mostraram que o volume de osso mineralizado formado nas lesões dos animais tratados com a MC foi superior ao dos demais grupos. Ainda no histológico foi observado que os grupos tratados com MC associado ou não à PBMT e ao aPDT também apresentaram os melhores padrões de reparação tecidual quando comparados aos grupos CP e CN. Esses resultados poderiam ser baseados nos processos de obtenção das MCs de hDPSCs por serem capazes de manter a fisiologia celular, e as ligações célula-célula e células-matriz extracelular praticamente intactas, o que estabeleceria condições ambientais favoráveis ao início da regeneração sendo essa propriedade mantida no decorrer do tempo (Yang et al., 2005; Zhou et al., 2012). Mais ainda, a preservação da matriz extracelular secretada pelas células na formação das MCs colaboram com o processo cicatricial por sua função de mediadora da transmissão de sinais químicos e mecânicos para a adesão, migração, proliferação, diferenciação e morte celular, além de prover suporte e sítios físicos para agregação das células (Freshney, 2005; 2006). Pedroni et al.

(2019) demonstraram *in vitro* que as CTs de MCs já formadas tem a capacidade de se soltar e aderir em superfície sólida onde passa a proliferar e que a matriz extracelular das MCs tem potencial de diferenciação óssea/odontogênica. Portanto, há que se supor que ao aplicarmos a MC dentro da lesão óssea de MRONJ, essas células possam não só povoar a lesão, como se diferenciar e passar a formar tecido ósseo. Essa formação de tecido ósseo dentro das lesões não seria então só a partir das margens da lesão, mas também a partir do centro da lesão. Talvez essa seja a explicação do maior volume ósseo observado de forma quantitativa no grupo MC nas avaliações microtomográficas.

Nos grupos onde a MC foi utilizada o que chamou a atenção foi a exuberância da resposta tecidual. Em todos os 3 grupos (MC; MC+PBMT e aPDT+MC) apresentaram grande formação óssea principalmente observada na base da lesão, como uma reação periosteal. Houve formação de novas trabéculas ósseas tanto para dentro da lesão como para fora da tábua óssea externa. Essa neoformação óssea nos grupos com MC se mostrou mais espalhada e com trabéculas mais dispersas em 7 dias e no grupo MC, enquanto em 28 dias, em especial nos grupos MC+PBMT e aPDT+MC essa formação óssea pareceu mais compacta com trabéculas mais espessas e interconectadas, inclusive com a presença de osso lamelar bem diferenciado. Assim acreditamos que as células tronco das MCs devem ter liberado fatores de crescimento por si só que levaram a essa grande formação óssea e que as terapias baseadas em biofotônica com suas propriedades antibacteriana (aPDT) e bioestimuladora (PBMT) tiveram uma ação de organização desse processo de formação óssea permitindo um aceleração na maturação desse tecido. De fato, nesses grupos a inflamação apresentou-se mais quiescente e a presença de células formadoras de osso ao redor das trabéculas era mais evidente.

Se por um lado os achados histológicos apontaram para uma cicatrização mais avançada nos grupos tratados com MC associada ou não à PBMT ou à aPDT, por outro o estudo quantitativo, a microCT, mostrou volume ósseo significativamente maior no grupo tratado somente com MC, sem nenhuma outra terapia complementar associada. Mais ainda, todas as demais análises feitas com as imagens de microCT não mostraram diferenças entre os grupos, nem mesmo entre os grupos controle, tanto negativo quanto positivo, e experimentais. Esses achados causaram estranheza, uma vez que, baseados na nossa

experiência prévia com essas terapias em biofotônica no tratamento de pacientes com MRONJ (Martins et al., 2012; Pedroni et al., 2020; Tarataroti et al., 2020), era esperado que nesses grupos houvesse maior formação de tecido ósseo e regeneração das lesões nos animais desses grupos. De fato, no estudo de Hafner et al. (2016) ficou claro o efeito superior da aPDT em relação a outras terapias antimicrobianas no controle de bactérias *A. naeslundii* isoladas de um paciente com MRONJ. Portanto, o tratamento da aPDT+MC estabeleceria um ambiente favorável para a MC, com o controle de microrganismos no leito cirúrgico. Adicionalmente, Martins et al. (2012), mostraram que a associação de terapia farmacológica e terapia cirúrgica com PRP e PBMT melhorou significativamente a cura de lesões de BRONJ em pacientes oncológicos. No entanto, há que se considerar que a metodologia de microCT mede o volume de trabéculas ósseas mineralizadas, portanto, diferenças podem não ter sido observadas, mesmo se houvesse um adiantamento na cicatrização de lesões dos diferentes grupos. Pela avaliação qualitativa ficou claro que os grupos experimentais apresentavam grandes áreas da lesão e mesmo fora da lesão povoadas por trabéculas ósseas e, às vezes, até por tecido similar a tecido dentinário. Então, provavelmente o que houve foi uma aceleração na deposição de minerais nas trabéculas do grupo MC, enquanto nos demais grupos MC (MC+PBMT e aPDT+MC) essa mineralização fosse ocorrer mais tardiamente, porém resultando em mais osso do que nos demais grupos. No presente estudo optamos por avaliar espécimes de no máximo 28 semanas porque tínhamos que os animais não resistissem e sucumbissem em função da administração do ZLN que ocorreu semanalmente até o momento da eutanásia dos animais. Portanto, a hipótese acima apresentada deverá ser testada em experimentos de prazos mais longos, onde tanto o fechamento da mucosa sobre as lesões e a formação de osso mineralizado dentro da lesão poderão ser ou não detectados nesses grupos.

Baseado nos resultados podemos inferir que a aplicação de MCs de hDPSCs associadas ou não à PBMT ou aPDT no tratamento de lesões de MRONJ pode colaborar para a mais rápida e organizada resposta de neoformação óssea. Novas pesquisas poderiam ser conduzidas para testar a hipótese de que a MC de hDPSC, previamente induzida para diferenciação osteogênica, levariam a um melhor reparo tecidual. As análises

imunoistoquímicas (com expressão de marcadores envolvidos no processo de osteogênese e *cell tracking*) deverão ser realizadas para melhor análise dos resultados.

7 CONCLUSÕES

De acordo com as análises dos dados obtidos da MicroCT, o grupo MC apresentou maior VO em 28 dias. A análise dos demais parâmetros da MicroCT também mostrou uma tendência a superioridade na capacidade regenerativa óssea do grupo MC quando comparado aos demais grupos.

Quando associada à PBMT ou mesmo precedido por aPDT, a MC não se comportou como esperado, mesmo estes grupos tendo apresentado dados que indicam tendência de regeneração óssea no tempo experimental inicial, não foram superiores aos do grupo MC.

Novas pesquisas poderiam ser conduzidas para testar a hipótese de que a MC de hDPSC, previamente induzida para diferenciação osteogênica, levariam a um melhor reparo tecidual. As análises imunohistoquímicas (com expressão de marcadores envolvidos no processo de osteogênese e *cell tracking*) deverão ser realizadas para melhor análise dos resultados.

REFERÊNCIAS¹

Aghaloo T, Felsenfeld A, Tetradis S. Osteonecrosis of the jaw in a patient on denosumab. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:959–63.

Aghaloo TL, Cheong S, Bezouglaia O, Kostenuik P, Atti E, Dry SM, Pirih FQ, Tetradis S. RANKL inhibitors induce osteonecrosis of the jaw in mice with periapical disease. *J Bone Miner Res*. 2014 Apr;29(4):843-54. doi: 10.1002/jbmr.2097.

Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, Bezouglaia O, Dry SM, Tetradis S. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res*. 2011 Aug;26(8):1871-82. doi: 10.1002/jbmr.379.

Anders JJ, Lanza RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg*. 2015 Apr;33(4):183-4. doi: 10.1089/pho.2015.9848.

Arany PR, Cho A, Hunt TD, Sidhu G, Shin K, Hahm E, et al. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. *SciTransl Med*. 2014;6(238):238-69.

Arany PR. Photobiomodulation: poised from the fringes. *Photomed Laser Surg*. 2012 Sep;30(9):507-9. doi: 10.1089/pho.2012.9884.

Ascani G, Campisi G, Junquera Gutierrez LM. Current controversies in classification, management, and prevention of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Int J Dent*. 2014;2014:565743. doi: 10.1155/2014/565743.

Asutay F, Polat S, Gül M, Subaşı C, Kahraman SA, Karaöz E. The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat calvarial defect model: micro-computed tomography and histomorphometric analysis. *Arch Oral Biol*. 2015 Dec;60(12):1729-35. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.09.002.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Bassetti M, Schär D, Wicki B, Eick S, Ramseier CA, Arweiler NB, Sculean A, Salvi GE. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: 12-month outcomes of a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Mar;25(3):279-87. doi: 10.1111/clr.12155.

Baur DA, Altay MA, Teich S, Schmitt Oswald M, Quereshy FA. Osteonecrosis of the jaw in a patient on raloxifene: a case report. *Quintessence Int*. 2015;46(5):423-8. doi:10.3290/j.qi.a32918.

Beth-Tasdogan NH, Mayer B, Hussein H, Zolk O. Interventions for managing medication-related osteonecrosis of the jaw. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;10(10):CD012432. Published 2017 Oct 6. doi:10.1002/14651858.CD012432.pub2.

Carda C, Silvestrini G, de Ferraris MG, Peydro A, Bonucci, E. Osteoprotegerin (OPG) and RANKL expression and distribution in developing human craniomandibular joint. *Tissue Cell*. 2005; 37(3), 247-55.

Chang C, Greenspan A, Beltran J, Gershwin ME. Osteonecrosis. Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. 2017:1764–1787.e5. doi: 10.1016/B978-0-323-31696-5.00103-0.

Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol*. 2018 Sep;44(5):571-589. doi: 10.1080/1040841X.2018.1467876.

Clezardin P. Mechanisms of action of bisphosphonates in oncology: a scientific concept evolving from antiresorptive to anticancer activities. *Bonekey Rep*. 2013;2:267.

Corrado A, Colia R, Cantatore FP. Neridronate: From Experimental Data to Clinical Use. *Clinical Medicine Insights: Therapeutics*. 2017; 9, p. 1179559X17732971. doi: 10.1177/1179559X17732971.

De Ponte FS, Catalfamo L, Micali G, Runci M, Cutroneo G, Vermiglio G, Centofanti A, Rizzo G. Effect of bisphosphonates on the mandibular bone and gingival epithelium of rats without tooth extraction. *ExpTher Med*. 2016 May;11(5):1678-84.

De Sá Silva F, Almeida PN, Rettore JV, Maranduba CP, de Souza CM, de Souza GT, Zanette Rde S, Miyagi SP, Santos Mde O, Marques MM, Maranduba CM. Toward personalized cell therapies by using stem cells: seven relevant topics for safety and success in stem cell therapy. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:758102. doi: 10.1155/2012/758102.

De Sá Silva F, Ramos RN, de Almeida DC, Bassi EJ, Gonzales RP, Miyagi SP, et al. Mesenchymal stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) induce immune modulatory profile in monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One*. 2014 May 20;9(5):e98050. doi: 10.1371/journal.pone.0098050. eCollection 2014.

Denham M, Conley B, Olsson F, Cole TJ, Mollard R. Stem cells: an overview. *Curr Protoc Cell Biol*. 2005;23(23):1. doi: 10.1002/0471143030.cb2301s28.

Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2:S3-15.

Diniz IMA, Carreira ACO, Sipert CR, Uehara CM, Moreira MSN, Freire L, Pelissari C, Kossugue PM, de Araújo DR, Sogayar MC, Marques MM. Photobiomodulation of mesenchymal stem cells encapsulated in an injectable rhBMP4-loaded hydrogel directs hard tissue bioengineering. *J Cell Physiol*. 2018 Jun;233(6):4907-4918. doi: 10.1002/jcp.26309.

Diniz IM, Horta ID, Azevedo CS, Elmadjian TR, Matos AB, Simionato MR, Marques MM. Antimicrobial photodynamic therapy: a promise candidate for caries lesions treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015 Sep;12(3):511-8. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.04.006.

Diniz IM, Teixeira KI, Araújo PV, Araújo MS, Marques MM, Poletto LT, Cortés ME. Evaluation of antibacterial photodynamic therapy effects on human dental pulp cell cultures. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014 Sep;11(3):300-6. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.03.010.

Diz P, López-Cedrún JL, Arenaz J, Scully C. Diz P, López-Cedrún JL, Arenaz J, Scully C. Denosumab-related osteonecrosis of the jaw. *J Am Dent Assoc*. 2012 Sep;143(9):981-4. doi: 10.14219/jada.archive.2012.0323.

Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Feb;296(2):235-42.

Eduardo FP, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo Cde P, Zatz M. Stemcellproliferationunderlowintensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med*. 2008 Aug;40(6):433-8. doi: 10.1002/lsm.20646.

Eguia A, Bagán-Debón L, Cardona F. Review and update on drugs related to the development of osteonecrosis of the jaw. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020 Jan 1;25(1):e71-e83. doi: 10.4317/medoral.23191.

Eid A, Atlas J. The role of bisphosphonates in medical oncology and their association with jaw bone necrosis. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am*. 2014;26:231-7.

Ervolino E, Statkievicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone*. 2018 Oct16;120:101-13.

Farmacovigilância no Estado de São Paulo 1998 a 2013 - quinze anos de monitoramento de eventos adversos a medicamentos. BEPA, Bol. Epidemiol. Paulo. (Online) [revista na Internet]. Agosto de 2013 [citado em 12 de outubro de 2020]; 10 (116): 15-22. Disponível em: http://periodicas.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-42722013000800002&lng=es Acesso em 12/10/2020 às 19:28h.

Fassio A, Bertoldo F, Idolazzi L, Viapiana O, Rossini M, Gatti D. Drug-induced osteonecrosis of the jaw: the state of the art. *Reumatismo*. 2017;69(1):9-15. Published 2017 May 22. doi:10.4081/reumatismo.2017.983.

Fernandes C, Leite RS, Lanças FM. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. *Química Nova*, 2005; 28(2), 274-80. doi:10.1590/S0100-40422005000200019.

Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology*. 2010 Feb;98(1):2-14.

Ferreira Junior CD, Casado PL, Barboza ESP. Osteonecrose associada aos bisfosfonatos na odontologia. *Rev Periodontia*. 2007;17(4):24-30.

Ferreira LS, Diniz IMA, Maranduba CMS, Miyagi SPH, Rodrigues MFSD, Moura-Netto C, et al. Short-term evaluation of photobiomodulation therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental pulp stem cells. *Lasers Med Sci*. 2019 Jun;34(4):659-66.

Freshney RI. Basic principles of cell culture. Hoboken: John Wiley & Sons; 2006.

Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 5th. New York: Edition, Wiley; 2005.

Garrido PR, Pedroni ACF, Cury DP, Moreira MS, Rosin F, Sarra G, Marques MM. Effects of photobiomodulation therapy on the extracellular matrix of human dental pulp cell sheets. *J Photochem Photobiol B*. 2019 May;194:149-57.

Goytia RN, Salama A, Khanuja HS. Bisphosphonates and osteonecrosis: potential treatment or serious complication? *Orthop Clin North Am* 2009;40:223-33.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:13625-30.

Gutta R and Louis PJ: Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: Science and rationale. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:186-93.

Hafner S, Ehrenfeld M, Storz E, Wieser A. Photodynamic Inactivation of *Actinomyces naeslundii* in Comparison With Chlorhexidine and Polyhexanide--A New Approach for Antiseptic Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw?. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016;74(3):516-22. doi:10.1016/j.joms.2015.09.014.

Hellstein JW, Adler RA, Edwards B, Jacobsen PL, Kalmar JR, Koka S, et al. American Dental Association Council on Scientific Affairs Expert Panel on Antiresorptive Agents. Managing the care of patients receiving antiresorptive therapy for prevention and treatment of osteoporosis: executive summary of recommendations from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J Am Dent Assoc*. 2011 Nov;142(11):1243-51.

Harada M, Kenmotsu S, Nakasone N, Nakamura KO, Ohshima H. Cell dynamics in the pulpal healing processing following cavity preparation in rat molars. *Histochem Cell Biol.* 2008 Oct;130(4):773-83.

Harumi SPM, Kerkis I, Maranduba CMC, Gomes CM, Martins MD, Marques MM. Expression of extracellular matrix proteins in human dental pulp stem cells depends on the donor tooth conditions. *J Endod.* 2011;36(5):826-31.

Hikita H1, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(6):663-72. doi: 10.1007/s00774-009-0090-6.

Hiremath H, Gada N, Kini Y, Kulkarni S, Yakub SS, Metgud S. Single-step apical barrier placement in immature teeth using mineral trioxide aggregate and management of periapical inflammatory lesion using platelet-rich plasma and hydroxyapatite. *J Endod* 2008;34:1020–24.

Hirose Y, Yamamoto T, Nakashima M, Funahashi Y, Matsukawa Y, Yamaguchi M, et al. Injection of Dental Pulp Stem Cells Promotes Healing of Damaged Bladder Tissue in a Rat Model of Chemically Induced Cystitis. *Cell Transplant.* 2016;25(3):425-36. doi: 10.3727/096368915X689523.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000 Jan;15(1):2-12. doi: 10.1359/jbmr.2000.15.1.2.

Hokugo A, Kanayama K, Sun S, Morinaga K, Sun Y, Wu Q, et al. Rescue bisphosphonate treatment of alveolar bone improves extraction socket healing and reduces osteonecrosis in zoledronate-treated mice. *Bone.* 2019 Jun;123:115-128. doi: 10.1016/j.bone.2019.03.027.

Hopper C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 2000 Dec;1:212-9.

Hosseinpour S, Fekrazad R, Arany PR, Ye Q. Molecular impacts of photobiomodulation on bone regeneration: A systematic review. *Prog Biophys Mol Biol.* 2019 Dec;149:147-159. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2019.04.005.

Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*. 2004;(83):590-95.

Jahanbin A, Rashed R, Alamdari DH, Koohestanian N, Ezzati A, Kazemian M, Saghafi S, Raisolsadat MA. Success of Maxillary Alveolar Defect Repair in Rats Using Osteoblast-Differentiated Human Deciduous Dental Pulp Stem Cells. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Apr;74(4):829.e1-9. doi: 10.1016/j.joms.2015.11.033.

Jayaraman P, Govindasamy V, Gnanasegaran N, Kunasekaran W, Vasanthan P, Kasim NH. Expression patterns of immune genes in long-term cultured dental stem cells. *Clin Oral Investig*. 2016 Jan;20(1):109-16.

Jung TY. Osteonecrosis of jaw after antiangiogenic agent administration in a renal cell carcinoma patient. *Oral Maxillofac Surg Cases*. 2017;3:27-33.

Kaibuchi N, Iwata T, Yamato M, Okano T, Ando T. Multipotent mesenchymal stromal cell sheet therapy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a rat model. *Acta Biomater*. 2016 Sep 15;42:400-10. doi: 10.1016/j.actbio.2016.06.022.

Kajizono M, Sada H, Sugiura Y, Soga Y, Kitamura Y, Matsuoka J, Sendo T. Incidence and Risk Factors of Osteonecrosis of the Jaw in Advanced Cancer Patients after Treatment with Zoledronic Acid or Denosumab: A Retrospective Cohort Study. *Biol Pharm Bull*. 2015;38(12):1850-5. doi: 10.1248/bpb.b15-00385.

Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Atti E, Dry SM, Pirih FQ, Aghaloo TL, Tetradis S. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res*. 2013 Jul;28(7):1631-40. doi: 10.1002/jbmr.1894.

Khosla S, Westendorf JJ, Modder UI. Concise review: Insights from normal bone remodeling and stem cell-based therapies for bone repair. *Stem Cells* 2010; 28:2124-2128. doi: 10.1002/stem.546.

Komine C, Tsujimoto Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* 2013; 39:411-414. Page 15 of 33.
Langer R, Vacanti J. *Tissue Engineering Science*. 1993;(260):920.

Kong L, Zheng LZ, Qin L, Ho KKW. Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment. *J Orthop Translat*. 2017;9:89-103. Published 2017 Apr 12. doi:10.1016/j.jot.2017.03.006.

Kremer KL, Smith AE, Sandeman L, Inglis JM, Ridding MC, Koblar SA. Transcranial Magnetic Stimulation of Human Adult Stem Cells in the Mammalian Brain. *Front Neural Circuits*. 2016 Mar 17;10:17. doi: 10.3389/fncir.2016.00017. eCollection 2016.

Lesclous P, Abi Najm S, Carrel JP, Baroukh B, Lombardi T, Willi JP, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a key role of inflammation? *Bone*. 2009 Nov;45(5):843-52. doi: 10.1016/j.bone.2009.07.011.

Li M, Feng C, Gu X, He Q, Wei F. Effect of cryopreservation on proliferation and differentiation of periodontal ligament stem cell sheets. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Apr 17;8(1):77.

Lin J, Bi LJ, Zhang ZG, Fu YM, Dong TT. Toluidine blue-mediated photodynamic therapy of oral wound infections in rats. *Lasers Med Sci*. 2010 Mar;25(2):233-8. doi: 10.1007/s10103-009-0700-5.

Lodi G, Sardella A, Salis A, Demarosi F, Tarozzi M, Carrassi A. Tooth extraction in patients taking intravenous bisphosphonates: a preventive protocol and case series. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Jan;68(1):107-10. doi: 10.1016/j.joms.2009.07.068.

Lombard T, Neirinckx V, Rogister B, Gilon Y, Wislet S. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: New Insights into Molecular Mechanisms and Cellular Therapeutic Approaches. *Stem Cells Int*. 2016;2016:8768162. doi: 10.1155/2016/8768162.

Lubart R, Friedmann H, Sinyakov M, Cohen N, Breibart H. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. *Laser Surg Med* 1997;21:493–9.

Marques MM, Diniz IM, de Cara SP, Pedroni AC, Abe GL, D'Almeida-Couto RS, Lima PL, Tedesco TK, Moreira MS. Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. *Photomed Laser Surg*. 2016 Nov;34(11):500-8.

Martins AS, Correia JA, Salvado F, Caldas C, Santos N, Capelo A, et al. Relevant factors for treatment outcome and time to healing in medication-related osteonecrosis of the jaws - A retrospective cohort study. *J Craniomaxillofac Surg*. 2017 Oct;45(10):1736-1742. doi: 10.1016/j.jcms.2017.07.014.

Martins MA, Martins MD, Lascale CA, Curi MM, Migliorati CA, Tennis CA, et al. Association of laser phototherapy with PRP improves healing of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in cancer patients: a preliminary study. *Oral Oncol*. 2012 Jan;48(1):79-84. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.08.010.

Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61:1115-7.

Mawardi H, Giro G, Kajiya M, Ohta K, Almazrooa S, Alshwaimi E, et al. A role of oral bacteria in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res*. 2011 Nov;90(11):1339-45. doi: 10.1177/0022034511420430.

Migliorati CA, Covington JS 3rd. New oncology drugs and osteonecrosis of the jaw (ONJ). *J Tenn Dent Assoc* 2009;89(4):36-38.

Migliorati CA, Epstein JB, Abt E, et al: Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates in cancer: a narrative review. *Nat Rev Endocrinol*, 2011;7:34-42.

Migliorati CA, Schubert MM, Peterson DE and Seneda LM: Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: An emerging oral complication of supportive cancer therapy. *Cancer*, 2005;104:83-93.

Migliorati CA, Woo SB, Hewson I, Barasch A, Elting LS, Spijkervet FK, et al. A systematic review of bisphosphonate osteonecrosis (BON) in cancer. Bisphosphonate Osteonecrosis Section, Oral Care Study Group, Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC)/International Society of Oral Oncology (ISOO). *Support Care Cancer* 2010;18:1099–106.

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.

Miniello TG, Araújo JP, Lopes RN, Alves FA. Osteonecrosis related to once-yearly zoledronic acid treatment in an osteoporotic patient after dental implant. *Braz Dent J*. 2015;26(1):86-8. doi:10.1590/0103-6440201300255.

Miniello TG, Araújo JP, Silva MLG, et al. Influence of bisphosphonates on clinical features of osteoradionecrosis of the maxilla and mandible. *Oral Dis*. 2019; 25: 1344– 1351. <https://doi.org/10.1111/odi.13081>.

Miniello TG, Brasileiro GB, Bertoletti AV, Bianchi D, Hirota C, Marques MM. Medication Related Osteonecrosis of the Jaws Lesions in Wistar Rats: A Translational Pilot Study. Accepted for publication in *Revista da Universidade Ibirapuera INSS*: 2238-6335. October 2020.

Ministério da Saúde. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais*. Brasília, 2012.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Shi S, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12.

Moreira MS, de FreitasArchilla JR, Lascalea CA, Ramalho KM, Gutknecht N, Marques MM. Post-Treatment Apical Periodontitis Successfully Treated with Antimicrobial Photodynamic Therapy Via Sinus Tract and Laser Phototherapy: Report of Two Cases. *Photomed Laser Surg*. 2015 Oct;33(10):524-8. doi: 10.1089/pho.2015.3936.

Moreira MS, Diniz IM, Rodrigues MF, de Carvalho RA, de Almeida Carrer FC, Neves II, et al. In vivo experimental model of orthotopic dental pulp regeneration under the influence of photobiomodulation therapy. *J PhotochemPhotobiol B*. 2017 Dec 2;166:180-6. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.11.022.

Moreira MS, Velasco IT, Ferreira LS, Ariga SK, Abatepaulo F, Grinberg LT, et al. Effect of laser phototherapy on wound healing following cerebral ischemia by cryogenic injury. *J PhotochemPhotobiol B*. 2011 Dec 2;105(3):207-15. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.09.005.

Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, TadokoroM, Morita Y, Tanaka Y, et al. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone*. 2010;(46):418–24.

Nicola FD, Marques MR, Odorcyk F, Arcego DM, Petenuzzo L, Aristimunha D, et al. Neuroprotector effect of stem cells from human exfoliated deciduous teeth transplanted after traumatic spinal cord injury involves inhibition of early neuronal apoptosis. *Brain Res.* 2017 May 15;1663:95-105. doi: 10.1016/j.brainres.2017.03.015.

Nixon JE. Avascular necrosis of bone: a review. *J Roy Soc Med.* 1983; 76:681-92.

O'riordan K, Akilov OE, Hasan T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2005; 2:247-62.

Papapoulos SE, Cremers SC. Prolonged bisphosphonate release after treatment in children. *N Engl J Med.* 2007;356:1075-6.

Pedroni ACF, Diniz IMA, Abe GL, Moreira MS, Sipert CR, Marques MM. Photobiomodulation therapy and vitamin C on longevity of cell sheets of human dental pulp stem cells. *J Cell Physiol.* 2018 Oct;233(10):7026-35.

Pedroni ACF, Miniello TG, Hirota C, Carvalho MH, Lascalea CA, Marques MM. Successful application of antimicrobial photodynamic and photobiomodulation therapies for controlling osteoradionecrosis and xerostomia after laryngeal carcinoma treatment: A case report of full oral rehabilitation. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Sep;31:101835. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101835.

Pedroni ACF, Sarra G, de Oliveira NK, Moreira MS, Deboni MCZ, Marques MM. Cell sheets of human dental pulp stem cells for future application in bone replacement. *Clin Oral Investig.* 2019 Jun;23(6):2713-21.

Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002;31(4):263-7.

Petridis X, Diamanti E, Trigas GCh, Kalyvas D, Kittraki E. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015 May;43(4):483-90. doi: 10.1016/j.jcms.2015.02.003.

Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation.* 2005 Sep 27;80(6):836-42.

Ralston SH, Gaston MS. Management of Osteogenesis Imperfecta. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;10:924. Published 2020 Feb 11. doi:10.3389/fendo.2019.00924.

Ramaglia L, Guida A, Iorio-Siciliano V, Cuozzo A, Blasi A, Sculean A. Stage-specific therapeutic strategies of medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review and meta-analysis of the drug suspension protocol. *Clin Oral Investig*. 2018;22(2):597-615. doi:10.1007/s00784-017-2325-6.

Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg*, 2004;22:141–50.

Ribeiro GH, Chrun ES, Dutra KL, Daniel FI, Grando LJ. Osteonecrosis of the jaws: a review and update in etiology and treatment. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2018a;84:102-8. doi.org/10.1016/j.bjorl.2017.05.008.

Ribeiro GH, Minamisako MC, Rath IBDS, Santos AMB., Simões A, Pereira KCR, Grando LJ. Osteoradionecrosis of the jaws: case series treated with adjuvant low-level laser therapy and antimicrobial photodynamic therapy. *J Appl Oral Sci*, 26:e20170172. 2018b. doi:10.1590/1678-7757-2017-0172.

Ribeiro V, Garcia M, Oliveira R, Gomes PS, Colaço B, Fernandes MH. Bisphosphonates induce the osteogenic gene expression in co-cultured human endothelial and mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med*. 2014 Jan;18(1):27-37. doi: 10.1111/jcmm.12154.

Romão MM, Marques MM, Cortes AR, Horliana AC, Moreira MS, Lascala CA. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of human alveolar bone repair induced by laser phototherapy: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Dec;44(12):1521-8. doi: 10.1016/j.ijom.2015.08.989.

Romeo U, Galanakis A, Marias C, Vecchio AD, Tenore G, Palaia G, et al. Observation of Pain Control in Patients with Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis Using Low Level Laser Therapy: Preliminary Results. *Photomed Laser Surg* 2011;29:447–52.

Ross MH, Pawlina W. Histologia - Texto e Atlas: correlações com biologia celular e molecular. 7ª Ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2016; p. 382-401.

Ruggiero S, Mehrotra B, Rosenberg T. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. J Oral Maxillofac Surg. 2004;62:527-34.

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 May;67(5 Suppl):2-12. doi: 10.1016/j.joms.2009.01.009.

Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O'Ryan F; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons..American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. J Oral Maxillofac Surg. 2014 Oct;72(10):1938-56. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.031. Erratum in: J Oral Maxillofac Surg. 2015 Sep;73(9):1879. J Oral Maxillofac Surg. 2015 Jul;73(7):1440.

Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;102:433-41.

Schär D, Ramseier CA, Eick S, Arweiler NB, Sculean A, Salvi GE. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: six-month outcomes of a prospective randomized clinical trial. Clin Oral Implants Res. 2013 Jan;24(1):104-10. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02494.x.

Silveira PCL, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. J Photochem Photobiol B 2007;86:279–282.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Huang GT, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. J Endod. 2008 Feb;34(2):166-71.

Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, et al. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol*, 2010;28:5132–39.

Tartaroti NC, Marques MM, Naclério-Homem MDG, Migliorati CA, Zindel Deboni MC. Antimicrobial photodynamic and photobiomodulation adjuvant therapies for prevention and treatment of medication-related osteonecrosis of the jaws: Case series and long-term follow-up. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;29:101651. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101651.

Taylor K, Middlefell L, Mizen K. Osteonecrosis of the jaws induced by anti-RANK ligand therapy. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2010;48:221–3.

Toosi S, Behravan N, Behravan J. Nonunion fractures, mesenchymal stem cells and bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2018 Sep;106(9):2552-2562. doi: 10.1002/jbm.a.36433.

Ueyama Y, Yagyuu T, Maeda M, Imada M, Akahane M, Kawate K, Tanaka Y, Kirita T. Maxillofacial bone regeneration with osteogenic matrix cell sheets: an experimental study in rats. *Arch Oral Biol*. 2016;72:138–45.

Vescovi P, Merigo E, Manfredi M, Meleti M, Fornaini C, Bonanini M, et al. Nd:YAG laser biostimulation in the treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: clinical experience in 28 cases. *Photomed Laser Surg* 2008;26:37–46.

Vescovi P, Merigo E, Meleti M, Fornaini C, Nammour S, Manfredi M. Nd:YAG laser biostimulation of bisphosphonate-associated necrosis of the jaw bone with and without surgical treatment. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2007;45:628–32.

Virk MS, Lieberman JR. Biologic adjuvants for fracture healing. *Arthritis Res Ther*. 2012 Nov 30;14(6):225. doi: 10.1186/ar4053.

Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol*. 2009 Jun;219(3):667-76. doi: 10.1002/jcp.21710.

Walter C, Grötz KA, Kunkel M, Al-Nawas B. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. *Support Care Cancer*. 2007 Feb;15(2):197-202.

Wang X, Li G, Guo J, Yang L, Liu Y, Sun Q, et al. Hybrid composites of mesenchymal stem cell sheets, hydroxyapatite, and platelet-rich fibrin granules for bone regeneration in a rabbit calvarial critical-size defect model. *Exp Ther Med*. 2017 May;13(5):1891-1899.

Wei F, Qu C, Song T, Ding G, Fan Z, Wang S, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. *J Cell Physiol*. 2012;(9)2:3216-24.

Wilde F, Heufelder M, Winter K, Hendricks J, Frerich B, Schramm A, et al. The role of surgical therapy in the management of intravenous bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111:153-63.

Yamamoto D, Tsubota Y, Utsunomiya T, et al. Osteonecrosis of the jaw associated with everolimus: A case report. *Mol Clin Oncol*. 2017;6(2):255-7. doi:10.3892/mco.2016.1100.

Yang C, Li X, Sun L, Guo W, Tian W. Potential of human dental stem cells in repairing the complete transection of rat spinal cord. *J Neural Eng*. 2017 Apr;14(2):026005. doi: 10.1088/1741-2552/aa596b.

Yang J, Yamato M, Kohno C, Nishimoto A, Sekine H, Okano T, et al. Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials*. 2005;(33)26:6415-22.

Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol*. 2009 Dec 15;183(12):7787-98.

Zhou Y, Li Y, Mao L, Peng H. Periodontal healing by periodontal ligament cell sheets in a teeth replantation model. *Arch Oral Biol*. 2012;(2)57:169-76.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA USP - SÃO PAULO
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA														
Título da Pesquisa: Investigação do uso de cell sheet de células-tronco da polpa dentária humana associada ou não à terapia de fotobiomodulação ou à terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da necrose óssea dos maxilares por medicamentos anti-reabsorptivos em ratos														
Pesquisador: Márcia Martins Marques														
Área Temática:														
Versão: 2														
CAAE: 66555117.6.0000.0075														
Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo														
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio														
DADOS DO PARECER														
Número do Parecer: 2.135.174														
Apresentação do Projeto: O presente projeto apresenta-se subdividido em duas fases, uma in vitro, onde serão utilizadas células-tronco de polpa dentária humana, previamente coletadas. Essas células serão utilizadas para a confecção de membranas celulares, as quais serão utilizadas na fase dois do estudo, onde necrose óssea dos maxilares por medicamentos anti-reabsorptivos, será induzida nos animais e tratada com diferentes tipos de tratamento, incluindo a membrana previamente citada, na presença ou não, da terapia de fotobiomodulação e terapia fotodinâmica antimicrobiana.														
Objetivo da Pesquisa: O objetivo do presente projeto é analisar o efeito de membranas celulares de células-tronco da polpa dentária humana associadas ou não à terapia de fotobiomodulação ou à terapia fotodinâmica antibacteriana no tratamento de lesões de necrose óssea dos maxilares por medicamentos anti-reabsorptivos (MRONJ).														
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Segundo os autores, os riscos são mínimos e os benefícios são genéricos, com a possibilidade de estudar mais um tipo de tratamento para lesões ósseas necróticas causadas por drogas anti-														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227</td> <td>CEP: 05.508-900</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Cidade Universitária</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: SÃO PAULO</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (11)3091-7980</td> <td>Fax: (11)3091-7814</td> <td>E-mail: cepfo@usp.br</td> </tr> </table>			Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227		CEP: 05.508-900	Bairro: Cidade Universitária			UF: SP	Município: SÃO PAULO		Telefone: (11)3091-7980	Fax: (11)3091-7814	E-mail: cepfo@usp.br
Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227		CEP: 05.508-900												
Bairro: Cidade Universitária														
UF: SP	Município: SÃO PAULO													
Telefone: (11)3091-7980	Fax: (11)3091-7814	E-mail: cepfo@usp.br												
Página 01 de 03

FACULDADE DE ODONTOLOGIA USP - SÃO PAULO

Continuação do Parecer: 2.135.174

reabsorptivas, esperando que este tratamento seja eficaz.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as pendências foram esclarecidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: folha de rosto, informações básicas do projeto, projeto completo, orçamento, carta do biobanco, cronograma, declaração dos pesquisadores, declaração de solicitação de financiamento, aprovação do CEUA e resposta ao revisor.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_871040.pdf	08/08/2017 22:17:07		Aceito
Outros	Resposta ao Parecer Consubstanciada do CEP.docx	08/08/2017 22:16:23	Márcia Martins Marques	Aceito
Outros	Aprovacao_CEUA.pdf	08/08/2017 22:14:57	Márcia Martins Marques	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.docx	08/08/2017 22:11:40	Márcia Martins Marques	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaração_de_pesquisadores.pdf	08/08/2017 22:11:01	Márcia Martins Marques	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorrepositório /	Declaração_biobanco.pdf	08/08/2017 22:10:33	Márcia Martins Marques	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)3091-7980 Fax: (11)3091-7914 E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO

Continuação do Parecer: 2.135.174

Biobanco	Declaracao_biobanco.pdf	08/06/2017 22:10:33	Márcia Martins Marques	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	08/06/2017 22:09:46	Márcia Martins Marques	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	08/06/2017 22:08:32	Márcia Martins Marques	Aceito
Declaração do Patrocinador	Declaração_solicitacao_financiamento.docx	31/03/2017 16:03:34	Márcia Martins Marques	Aceito
Orçamento	Orçamento.xlsx	31/03/2017 16:01:33	Márcia Martins Marques	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	31/03/2017 15:29:34	Márcia Martins Marques	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SÃO PAULO, 23 de Junho de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Hays Blazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: capfo@usp.br

ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética no uso de Animais

Fundada em 1930
Em constante busca da excelência

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
 Tel: (11) 3091-7842
 ceuaf@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do uso de *cell sheet* de células-tronco da polpa dentária humana associada ou não à terapia de fotobiomodulação ou à terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da necrose óssea dos maxilares por medicamento anti-reabsortivos induzida em ratos," registrada com o nº 001/2017, sob a responsabilidade de Marcia Martins Marques, Thais Gimenez Miniello, Ana Clara Fagundes Pedroni, Maria Stella Moreira, Natácha Kalline de Oliveira, Natalia Caroline Aguiar Tartarotti, Fernando Amorim Mendonça Alves, Giovanna Sarra, Giovanna Lopes e Pamela Kuliez Rolling Gonçalves, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 13/03/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	13/03/2017 A 13/03/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	200g / 6 semanas
Sexo	Masculino
Origem	Biotério do ICB-USP

São Paulo, 15 de março de 2017.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
 Coordenador do CEUA-FOUSP