PATRICIA VERÓNICA AULESTIA VIERA

**Nanofibras poliméricas carregadas com oxitetraciclina para tratamento de
alveolite seca: estudo em ratos**

São Paulo

2018

PATRICIA VERÓNICA AULESTIA VIERA

**Nanofibras poliméricas carregadas com oxitetraciclina para tratamento de
alveolite seca: estudo em ratos**

Versão Original

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

Área de concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti Luchetti

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Viera, Patricia Verónica Aulestia .

Nanofibras poliméricas carregadas com oxitetraciclina para tratamento de alveolite seca: estudo em ratos / Patricia Verónica Aulestia Viera ; orientador Rodney Garcia Rocha . -- São Paulo 2018.

127 p. : fig., tab. graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Clínica Integrada -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Alvéolo seco. 2. Tetraciclina. 3. Nanotecnologia. 4. Antibacterianos. 5. Nanofibras. 6. Ratos. I. Rocha, Rodney Garcia. II. Título.

Viera PVA. Nanofibras poliméricas carregadas com oxitetraciclina para tratamento de alveolite seca: estudo em ratos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: /   /2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Esta tese é dedicada àqueles sem os quais
esta conquista não teria sido possível.
Angel, Patricia, Roger e Martín, obrigada
pelo amor, o apoio e o exemplo.

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese de doutorado contou com a ajuda de importantes pessoas, sem as quais não teria sido possível sua conclusão, e às quais estarei sempre grata.

Agradeço ao Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha pelo seu total apoio, disponibilidade e confiança, e por ter aberto para mim as portas da Clínica Integrada.

Pela confiança, os conselhos e os generosos ensinamentos, agradeço infinitamente à Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti. Obrigada pela paciência, a dedicação e o tempo investido em mim.

À Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés e ao Prof. Dr. Rubén Sinisterra, ambos da Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de trabalhar nos seus laboratórios. Seus ensinamentos e a sua acolhida fizeram diferença neste percurso.

À Profa. Dra. Luciana Corrêa pelos valiosos ensinamentos que enriqueceram esta tese e por ter me dado a oportunidade de realizar parte do trabalho no seu laboratório.

À Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos do ICB-USP, por manter as portas sempre abertas do seu laboratório, e às técnicas Gabriela Malheiros e Gisela Ramos pela sua disponibilidade e colaboração.

Agradeço às Professoras Carina Domaneschi e Sibeles Sarti Penha por ter me permitido dividir seu espaço. Obrigada pela amizade e pelo tempo compartilhado.

A todos os docentes da Clínica Integrada, em especial ao Prof. Dr. Waldyr Antônio Jorge, pela confiança, o incentivo e os conselhos.

Aos meus Professores da pós-graduação que têm o dom de nos tornar melhores profissionais e melhores pessoas.

Agradeço também aos alunos da UFMG Flávia Gontijo, Natália Neves, Ana Paula Monteiro e Alinne Martins, e aos alunos de iniciação científica da FOU SP Lucas Maia Nogueira e Cyro Ferraz Neto, que contribuíram ativamente com este trabalho.

Às funcionárias do Departamento de Estomatologia, Cecília, Regina, Nina e Marília, por estarem sempre dispostas a ajudar e pela alegria que trazem ao departamento.

Às bibliotecárias da FOU SP pela paciência na revisão bibliográfica desta tese, e às secretárias da pós-graduação, Cátia e Alessandra, pela valiosa ajuda e orientações.

À USP e à CAPES pelo apoio financeiro.

A toda minha família pelo amor e incentivo. E finalmente, agradeço a Deus por ser a luz que guia meu caminho.

"Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão. No fundo, isso não tem importância. O que interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado."

William Shakespeare

RESUMO

Viera PVA. Nanofibras poliméricas carregadas com oxitetraciclina para tratamento de alveolite seca: estudo em ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original.

A alveolite seca é uma das complicações pós-operatórias mais comuns e sintomáticas na exodontia, porém, até o momento não possui um protocolo de tratamento definido. A oxitetraciclina (OTC) é um antibiótico de amplo espectro utilizado no tratamento de múltiplas infecções. Entretanto, nos últimos anos as tetraciclina de primeira geração, tais como a OTC, têm sido evitadas devido ao surgimento de microrganismos resistentes. Afortunadamente, nos últimos anos tem se observado uma tendência contrária graças às medidas de controle no uso de antibióticos. Sistemas de liberação controlada podem evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana e diminuir o risco de efeitos adversos. Este estudo teve como objetivo preparar uma nanofibra polimérica de policaprolactona e oxitetraciclina (PCL/OTC), e ainda avaliar suas propriedades físicas e biológicas *in vitro* e *in vivo*, visando seu futuro uso no tratamento da alveolite seca. As nanofibras poliméricas carregadas com OTC foram preparadas pelo sistema de eletrospinning, caracterizadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e avaliadas sobre seu perfil de liberação do fármaco. A atividade antibacteriana da nanofibra sobre um biofilme misto de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Streptococcus sanguis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi analisada mediante a contagem das unidades formadoras de colônias viáveis após os tempos de contato de 1, 4, 24, 30 e 48 h. O processo de reparo alveolar induzido pela nanofibra PCL/OTC foi avaliado de forma histomorfológica e histomorfométrica após o tratamento da alveolite seca em molares de ratos, e comparado ao tratamento com nanofibras de PCL pura e Alvogyl®, 7, 14 e 21 dias após a exodontia. Finalmente, foi realizada a identificação e contagem de osteoclastos através da marcação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), nos mesmos tempos de avaliação. As nanofibras PCL/OTC apresentaram orientação randômica em camadas e morfologia multiforme. O perfil de liberação do sistema apresentou um efeito de explosão nas primeiras 8 horas, seguido por um período de liberação lenta e prolongada da OTC. A nanofibra

PCL/OTC (132 µg de OTC/mL) reduziu mais de 50% das colônias do biofilme nas primeiras horas de liberação, seguido por um período de manutenção em que a porcentagem de colônias bacterianas permaneceu baixa. O grupo tratado com PCL/OTC apresentou a maior porcentagem de tecido conjuntivo no 7º dia ($p<0,05$) e maior porcentagem de osso neoformado no 14º e 21º dias após a exodontia ($p<0,05$), em comparação aos outros grupos. O tratamento de alveolite seca com a fibra PCL/OTC permitiu a regeneração tecidual do alvéolo quase em sua totalidade até o 21º dia, sendo que a cronologia de regeneração tecidual com este material foi mais rápida do que com a fibra de PCL pura, e esta última mais rápida que do que o controle positivo Alvogyl®. O grupo PCL/OTC apresentou uma quantidade menor ($p<0,05$) de osteoclastos por área em relação aos outros grupos nos três tempos experimentais. O perfil de liberação prolongando de OTC e as propriedades biológicas relevantes apresentadas pela nanofibra PCL/OTC, sugerem que esta poderia ser considerada uma alternativa para o tratamento da alveolite seca.

Palavras-chave: Alvéolo Seco. Tetraciclinas. Nanotecnologia. Antibacterianos. Nanofibras. Ratos.

ABSTRACT

Viera PVA. Oxytetracycline-loaded polymeric nanofibers for the treatment of dry socket: a study in rats [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original.

Dry socket is one of the most common and symptomatic postoperative complications in tooth extraction, however, to date, it does not have an established treatment protocol. Oxytetracycline (OTC) is a broad-spectrum antibiotic, employed in the treatment of multiple infections. Nevertheless, in the last few years, first-generation tetracyclines such as OTC, have been avoided due to the development of resistant microorganisms. Fortunately, in recent years there has been a contrary trend thanks to control measures in the use of antibiotics. Controlled release systems can prevent the development of bacterial resistance and decrease the risk of adverse effects. This study aimed to prepare a polymeric nanofiber of polycaprolactone and oxytetracycline (PCL/OTC), and to evaluate its physical and biological properties *in vitro* and *in vivo*, aiming its use in the treatment of dry socket at the future. The OTC-charged polymeric nanofibers were prepared by electrospinning, and characterized by scanning electron microscopy (SEM) and drug release profile evaluation. The antibacterial activity of the nanofiber over a mixed biofilm containing *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Streptococcus sanguis*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was analyzed by counting the viable colony-forming units after 1, 4, 24, 30 and 48 h of contact. The alveolar repair process induced by the PCL/OTC nanofiber was evaluated histomorphologically and histomorphometrically after the treatment of dry socket in rat molars, and compared to the treatment with plain PCL nanofibers and Alvogyl™, 7, 14 and 21 days after extraction. Finally, the identification and counting of osteoclasts were performed through the tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining, at the same evaluation time points. PCL/OTC nanofibers presented random orientation in layers and multiform morphology. The release profile of the PCL/OTC system showed a burst effect within the first 8 hours, followed by a prolonged slow release period. The PCL/OTC nanofiber at a concentration of 132 µg OTC/mL reduced more than 50% of the biofilm colonies in the first few hours of release, followed by a maintenance period

in which the percentage of bacterial colonies remained low. The PCL/OTC group presented the highest percentage of connective tissue on the 7th day ($p<0.05$), and of newly formed bone on the 14th and 21st days ($p<0.05$) after dental extraction, compared to the other groups. The treatment of dry socket with the PCL/OTC fiber allowed almost complete tissue regeneration up to the 21st day, and the chronology of tissue regeneration with this material was faster than with the plain PCL fiber, and the latter was more rapid than the positive control Alvogyl^{TM}. The PCL/OTC group presented a lower amount ($p<0.05$) of osteoclasts *per area* than the other two groups in the three experimental periods. The prolonged release profile of OTC and the relevant biological properties presented by the PCL/OTC nanofibers suggest that these may be considered as an alternative treatment of dry socket.

Keywords: Dry socket. Tetracyclines. Nanotechnology. Anti-Bacterial Agents. Nanofibers. Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Ativadores de plasminogênio.....	37
Figura 2.2 - Curativos intra-alveolares: vantagens.....	40
Figura 2.3 - Ação das tetraciclins na doença periodontal	45
Figura 2.4 - Sistema de eletrofiação	53
Figura 4.1 - Sistema de eletrofiação e parâmetros de produção das fibras.....	63
Figura 4.2 - Aspecto da nanofibra no início e fim da eletrofiação	63
Figura 4.3 - Microplaca contendo o biofilme em contato com as nanofibras (triplicata)	66
Figura 4.4 - Diluição das alíquotas e semeador em placa de Petri	66
Figura 4.5 - Exodontia de primeiro molar inferior de rato	68
Figura 4.6 - Processamento das fotografias das lâminas histológicas.....	69
Figura 4.7 - Células TRAP—positivas	71
Figura 5.1 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura das nanofibras poliméricas de policaprolactona.....	73
Figura 5.2 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura das nanofibras poliméricas de PCL com cloridrato de oxitetraciclina.....	73
Figura 5.3 - Liberação cumulativa de OTC dispersa em fibras de PCL (0 – 350 horas)	74

Figura 5.4 - Liberação cumulativa de OTC dispersa em fibras de PCL (0 – 24 horas)	75
Figura 5.5 - Porcentagem de colônias bacterianas remanescentes após vários tempos de incubação do biofilme misto na presença de nanofibras	75
Figura 5.6 - Cortes histológicos representativos de cada grupo em cada tempo de avaliação	78
Figura 5.7 - Box plot da porcentagem de tecido conjuntivo no alvéolo	79
Figura 5.8 - Box plot da porcentagem de tecido ósseo no alvéolo	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Características das tetraciclinas mais conhecidas.....	42
Tabela 2.2 - Resumo do efeito da variação dos parâmetros da eletrofiação na morfologia das nanofibras	55
Tabela 4.1 - Propriedades físico-químicas dos componentes	61
Tabela 5.1 - Porcentagem de tecido conjuntivo no alvéolo	79
Tabela 5.2 - Porcentagem de osso neoformado no alvéolo	80
Tabela 5.3 - Quantificação de células TRAP—positivas (células/mm ²).....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
ALV	Alvogyl®
AS	Alveolite seca
ATCC	American Type Culture Collection
BMP	Proteína morfogenética óssea
CCL	Quimiocina (C-C motif) ligante
CCR	Quimiocina (C-C motif) receptor
CO ₂	Dióxido de carbono
DCM	Diclorometano
DMP1	Proteína da matriz dentinária 1
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL	Interleucina
ITGA	Integrina alpha
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMP	Metaloproteinase de matriz
ORN	Osteoradionecrose
OTC	Oxitetraciclina
PBS	Tampão fosfato salino
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido polilático
PLGA	Poli (ácido lático-co-ácido glicólico)
RANK	Receptor do ativador do fator nuclear Kappa B
RANKL	Ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B
RNA	Ácido ribonucleico
SLC	Sistema de liberação controlada

SOST	Esclerostina
TGF	Fator de crescimento transformador
T _{max}	Tempo para atingir a concentração plasmática máxima
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TNF	Fator de necrose tumoral
TTC	Tetraciclina
UFC	Unidades formadoras de colônias
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VTN	Vitronectina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
cGy	centigrey
cm	centímetro
g	grama
g/cm ³	gramas por centímetro cúbico
g/mol	gramas por mol
h	hora
kDa	kilodaltons
kV	quilovolts
kV/m	kilovolt por metro
mg	miligrama
mg/kg	miligrama por kilograma de peso
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
m/s	metros por segundo
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
®	marca registrada
rpm	revoluções por minuto
s	segundo
v/v	volume por volume
µg	micrograma
µL	microlitro
µm ²	micrômetro quadrado
µm	micrômetro
%	por cento
≈	quase igual a

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	INFECÇÕES ÓSSEAS DOS MAXILARES	27
2.2	ALVEOLITE SECA	30
2.2.1	Reparo do alvéolo dentário sem alveolite	31
2.2.2	Etiopatogenia	35
2.2.3	Tratamento	38
2.3	TETRACICLINAS	41
2.3.1	Tetraciclinas na odontologia	44
2.3.2	Oxitetraciclina	48
2.4	NANOFIBRAS POLIMÉRICAS	50
2.4.1	Eletrofiação	52
2.4.2	Polímeros reabsorvíveis	55
3	PROPOSIÇÃO	59
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4	MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOFIBRA	61
4.1.1	Processo de eletrofiação	62
4.1.2	Microscopia eletrônica de varredura	64
4.1.3	Perfil de liberação	64
4.2	TESTE MICROBIOLÓGICO	64
4.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA	67
4.4	IDENTIFICAÇÃO DE OSTEOCLASTOS	70
5	RESULTADOS	73
5.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	73
5.2	PERFIL DE LIBERAÇÃO	74
5.3	TESTE MICROBIOLÓGICO	75
5.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA	76
5.5	IDENTIFICAÇÃO DE OSTEOCLASTOS	81
6	DISCUSSÃO	83

7	CONCLUSÕES.....	97
	REFERÊNCIAS	99
	ANEXOS.....	123

1 INTRODUÇÃO

Graças à excelente vascularização das estruturas da cabeça, a reparação óssea após procedimentos cirúrgicos orais geralmente ocorre sem intercorrências. No entanto, em certos casos, o processo normal de cicatrização óssea pode ser mais demorado e, devido a múltiplos fatores coexistentes, podem surgir quadros infecciosos de difícil tratamento (Krakowiak, 2011). A osteomilite, a osteonecrose medicamentosa, a osteoradionecrose (De Antoni, 2016; Hallmer et al., 2017) e as alveolites (Birn, 1970; Kolokythas et al., 2010) são os principais exemplos de infecções ósseas no complexo maxilofacial.

A alveolite seca (AS) é a complicação pós-operatória mais incidente após exodontias (Sigron et al., 2014). Apresenta-se como um quadro altamente doloroso, que aparece entre um e três dias após a extração dentária, causado pela perda do coágulo sanguíneo (Akinbami; Godspower, 2014). Embora seja preconizado que a prevenção é melhor que o tratamento, nenhum dos métodos preventivos isolado é totalmente eficaz (Cardoso et al., 2010). Da mesma forma, nenhum método de tratamento tem demonstrado sucesso e ganhado aceitação universal, faltando evidências científicas para estabelecer um protocolo (Alexander, 2000). O uso de curativos intra-alveolares é uma das condutas mais praticadas para o tratamento de AS. Estes podem conter substâncias analgésicas e/ou antimicrobianas (Daly et al., 2012). Entre os antibióticos estudados para prevenção e tratamento da AS, as tetraciclinas têm mostrado bons resultados (Kolokythas et al., 2010).

A oxitetraciclina (OTC) é um antibiótico de amplo espectro do grupo das tetraciclinas, utilizada no tratamento de múltiplas infecções (Stone; Chodosh, 2004; Olszewska, 2006; Petkovic et al., 2017). Também apresenta efeitos não antimicrobianos, como a supressão da produção de muco nas células epiteliais respiratórias, diminuição da inflamação (Shah et al., 2017b), e inibição da osteoclastogênese e da reabsorção óssea (Zhou et al., 2010). Na odontologia, a OTC tem sido utilizada com sucesso no tratamento de infecções endodônticas (Goncalves et al., 2016), osteoradionecrose (Millett et al., 1990), na regeneração do tecido periodontal (Kabashima et al., 2012) e na prevenção da alveolite seca (Rutledge;

Marcoot, 1984; Fridrich; Olson, 1990; Vlcek et al., 2015).

Entretanto, nos últimos anos as tetraciclina de primeira geração, como a OTC, têm sido evitadas devido ao surgimento de microrganismos resistentes. Afortunadamente, nos últimos anos tem se observado uma tendência contrária graças às medidas de controle no uso de antibióticos (Chen et al., 2017). Sistemas de liberação controlada podem diminuir o desenvolvimento de resistência bacteriana e o risco de toxicidade sistêmica (Stebbins et al., 2014), pois possibilitam a manutenção da concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica durante um tempo maior (Felice et al., 2014). Na cavidade oral, os sistemas tópicos de liberação controlada contribuem para uma maior substantividade do fármaco, conforto para o paciente, aumento do coeficiente de difusão da droga, redução da dose e diminuição dos efeitos colaterais relacionados à administração sistêmica. Exemplos destes sistemas utilizados na odontologia são os vernizes, lipossomas, nanopartículas e nanofibras poliméricas produzidas por eletrofiação (Steinberg; Friedman, 2017).

A poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero absorvível utilizado na confecção de nanofibras poliméricas para liberação controlada de fármacos (Prakasam et al., 2017). As nanofibras de PCL têm sido utilizadas na cicatrização de feridas, enxertos vasculares e liberação de antimicrobianos (Liu et al., 2017). Recentemente, estas também têm sido empregadas para o desenvolvimento de arcabouços biomiméticos, especialmente na regeneração óssea, devido ao fato de que estas nanofibras podem proporcionar um microambiente desejável para a adesão e proliferação celular e formação de tecido mineralizado (Yoshimoto et al., 2003; Gao et al., 2016).

A construção de uma nanofibra biodegradável contendo oxitetraciclina poderia ser aplicada como tratamento futuro da alveolite seca. Suas propriedades antimicrobianas e bioativas sobre o tecido ósseo podem ser aproveitadas no reparo do alvéolo dentário, e o uso de um sistema de liberação controlada pode melhorar sua biodisponibilidade. Com este trabalho pretendeu-se preparar a nanofibra PCL/OTC, avaliar sua morfologia e perfil de liberação, analisar seu efeito antimicrobiano e o processo de reparo tecidual induzido pelo produto em alvéolos de molar de ratos com alveolite.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INFECÇÕES ÓSSEAS DOS MAXILARES

Graças à excelente vascularização das estruturas da cabeça e pescoço em comparação com outros locais anatômicos, o reparo ósseo após procedimentos cirúrgicos orais costuma ocorrer sem intercorrências. No entanto, em certos casos, o processo normal de cicatrização óssea pode ser mais demorado e, devido a outros fatores coexistentes, estes sítios podem apresentar quadros infecciosos (Krakowiak, 2011). As infecções ósseas são alterações patológicas com envolvimento microbiano, que advém de uma complexa interação entre a condição sistêmica do paciente, o metabolismo ósseo, o trauma local, a vascularização e o uso de certos fármacos (Krakowiak, 2011; Lukosiunas et al., 2011; Hallmer et al., 2017). Apesar das muitas oportunidades que as bactérias dispõem para penetrar no osso, por exemplo, quando este fica exposto após uma exodontia, as infecções ósseas raramente progridem se a condição sistêmica e o metabolismo ósseo do paciente estiverem equilibrados (Hupp et al., 2014).

Geralmente a maxila é menos acometida que a mandíbula, graças ao seu rico suprimento sanguíneo derivado de uma complexa rede de vasos. Já a mandíbula possui unicamente a artéria alveolar inferior como principal suprimento sanguíneo, e a presença de osso cortical dificulta a penetração de vasos periosteais, tornando a mandíbula menos irrigada e mais suscetível à infecção (Hupp et al., 2014; Baur et al., 2015; Andre et al., 2017).

Um dos fatores predisponentes clássicos para o desenvolvimento de infecções ósseas dos maxilares é o histórico de infecções odontogênicas prévias (Hupp et al., 2014). As infecções odontogênicas são infecções do alvéolo, ossos maxilares ou face, que se originam em um dente ou estrutura de suporte (Ogle, 2017). Estas infecções são polimicrobianas, envolvendo uma combinação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas (Segura-Egea et al., 2017), com predomínio de *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Prevotella*, *Porphyromonas*,

Dialister, *Streptococcus* e *Treponema* (Rajendra Santosh et al., 2017). A maioria das vezes, estas infecções são secundárias a processos cariosos, pericoronarite, doença periodontal e infecções endodônticas, podendo se espalhar pelos espaços fasciais da cavidade oral, crânio, pescoço e tórax, tornando-se uma ameaça à vida em curtos períodos de tempo (Hupp et al., 2014; Rajendra Santosh et al., 2017). O espalhamento também pode acontecer pela medula óssea, causando uma infecção dos ossos maxilares (Gaetti-Jardim et al., 2010; Lypka; Hammoudeh, 2011; Gaetti-Jardim et al., 2012).

Complicações pós-cirúrgicas (Krakowiak, 2011; Baur et al., 2015; Yahalom et al., 2016) e traumas maxilofaciais que provocam exposição óssea (ex: fraturas expostas), influenciados pela condição imunológica e dental do paciente e a microbiota presente no sítio afetado, também podem levar ao desenvolvimento de uma infecção óssea (Lukosiunas et al., 2011; Baur et al., 2015; Leketas et al., 2016). Da mesma forma, infecções em áreas distantes do corpo, podem se espalhar para a maxila e mandíbula através da circulação sanguínea (Krakowiak, 2011; Andre et al., 2017). Ainda, nos últimos tempos tem sido observado um aumento nos casos de infecção e necrose óssea causada pelo uso de certos medicamentos empregados no tratamento de neoplasias malignas e osteoporose (Tardast et al., 2015; Hallmer et al., 2017; Voss et al., 2017), assim como pela radioterapia na região de cabeça e pescoço (Wang et al., 2017). As osteomilites, as osteonecroses medicamentosas, a osteoradionecrose (De Antoni, 2016; Hallmer et al., 2017), assim como as alveolites (Birn, 1970; Kolokythas et al., 2010), são os principais exemplos de processos infecciosos dos maxilares.

A osteomielite é definida como uma inflamação do osso e da medula óssea causada por um processo infeccioso (Qaisi; Montague, 2017). Na maioria dos casos, a osteomielite é derivada de uma infecção odontogênica que atinge as cavidades medulares (Krakowiak, 2011). Os sinais e sintomas incluem dor, saída de secreção purulenta, fístula, limitação de abertura de boca, fratura patológica, presença de sequestros ósseos e distúrbios neurossensoriais (Andre et al., 2017; Qaisi; Montague, 2017). A osteomielite aguda é tratada primariamente com antibióticos e controle dos fatores causadores (Flynn, 2014). Na osteomielite crônica, além do emprego de antibioticoterapia prolongada e em altas concentrações, é necessário realizar um

tratamento cirúrgico agressivo (Dewelhenke et al., 2007; Flynn, 2014), associado ao controle da condição sistêmica do paciente e a terapias coadjuvantes como a câmara hiperbárica (Krakowiak, 2011).

O quadro de osteonecrose medicamentosa dos maxilares se caracteriza por uma área de exposição óssea, que pode ser sondada através de fístula intra ou extraoral, não se repara em até oito semanas e acomete pacientes que estejam recebendo ou que receberam fármacos antirreabsortivos ósseos ou antiangiogênicos (Ruggiero et al., 2014). Está relacionada, principalmente, ao uso de bisfosfonatos e denosumab, fármacos que impedem a reabsorção e renovação óssea mediante a inibição da atividade dos osteoclastos, e são empregados no controle da osteoporose e de certas neoplasias malignas (Brozoski et al., 2012; Hallmer et al., 2017). Procedimentos que provocam exposição óssea, como as cirurgias dentoalveolares, são um importante fator de risco associado à ocorrência de osteonecrose medicamentosa (Tardast et al., 2015; Soundia et al., 2016). A penicilina é o antibiótico de escolha para o seu tratamento, além do uso de enxaguatórios orais, terapia em câmara hiperbárica, laserterapia e debridamento cirúrgico (Brozoski et al., 2012).

O uso de radiação ionizante no tratamento do câncer tem melhorado o prognóstico da doença, entretanto, esta pode gerar efeitos colaterais importantes na região de cabeça e pescoço, um deles é a osteoradionecrose (ORN). Na ORN ocorrem áreas de osso exposto e necrose que não se curam ao longo de meses, e podem estar associadas à dor, disestesia e supuração (Qaisi; Montague, 2017). Em pacientes tratados com mais de 6000 centigreys (cGy) de radiação, a incidência de osteoradionecrose vai de 5 a 9%, porém, com a modernização das técnicas de radiação, este índice vem caindo (Hanley; Cooper, 2017; Qaisi; Montague, 2017). Sua ocorrência se deve ao fato de que a radiação dos maxilares cria um ambiente hipovascular, hipocelular e hipóxico nos tecidos ósseos e moles, causando necrose avascular no osso (Marx, 1983; Hanley; Cooper, 2017; Chronopoulos et al., 2018). Seu tratamento deve ser conduzido de forma multidisciplinar, com procedimentos que incluem: limpeza cirúrgica do osso necrótico, antibioticoterapia, uso de câmara hiperbárica (Hanley; Cooper, 2017), e uso de fármacos antifibróticos que melhoram a circulação periférica como a pentoxifilina, inibidores da destruição osteoclástica como o clodronato, e antioxidantes como o tocoferol (Robard et al., 2014; Lyons; Brennan,

2017).

Já as alveolites, constituem um quadro inflamatório que envolve as porções ósseas mais superficiais do alvéolo dentário após extração, causando atraso no processo de reparo alveolar (Gregori et al., 2004). As alveolites podem ser classificadas de acordo com as suas características clínicas, em alveolite úmida (ou por corpo estranho) ou seca. Na alveolite úmida, observa-se o coágulo desorganizado associado à presença de um corpo estranho (restos alimentares, fragmentos de dente ou osso), odor fétido intenso e pode ter presença de secreção purulenta. A alveolite seca apresenta ausência total ou parcial do coágulo sanguíneo, paredes ósseas descobertas de cor branco-marfim e presença de odor fétido (Gregori et al., 2004; Cardoso et al., 2010; Takemoto et al., 2015). Certos autores sugerem que a alveolite seca não é uma infecção óssea verdadeira já que as bactérias estariam limitadas à superfície do osso e não produziram uma infecção óssea medular (Krakowiak, 2011). Porém, a presença de bactérias tem um papel importante na etiologia e/ou na evolução do quadro, e as medidas de prevenção e tratamento estão baseadas principalmente em agentes de controle microbiano (Cardoso et al., 2010). A alveolite seca será abordada com mais detalhes no capítulo a seguir.

2.2 ALVEOLITE SECA

A alveolite seca é uma condição altamente dolorosa que aparece entre um e três dias após a extração dentária (Bowe et al., 2011-2012). É caracterizada pela inflamação do osso alveolar ao redor do dente extraído, acompanhada pela perda do coágulo sanguíneo no interior do alvéolo, elemento importante durante o processo de reparo alveolar (Akinbami; Godspower, 2014). Blum (2002) encontrou 17 definições de alveolite seca, sendo que todas elas incluem a presença de osso exposto, e 15 das 17 definições incluem a presença de dor severa.

A alveolite seca é a complicação pós-operatória mais incidente após as extrações dentárias (Kolokythas et al., 2010; Sigron et al., 2014; Taberner-Vallverdu et al., 2015), com maior ocorrência em pessoas ao redor de 40 anos de idade, de sexo

feminino, e menos frequente na maxila do que na mandíbula (Sigron et al., 2014). Sua incidência é de 0,6 a 4% em exodontias de rotina, e pode chegar a mais de 30% para exodontias complexas, como é o caso dos terceiros molares inferiores (Bortoluzzi et al., 2010; Bowe et al., 2011-2012; Kudiyirickal; Hollinshead, 2012; Sigron et al., 2014). Acredita-se que esta grande variação na incidência de AS encontrada na literatura se deve principalmente às diferenças nos critérios de diagnóstico e métodos de avaliação do quadro (Blum, 2002).

Os sinais e sintomas se apresentam de 24 a 72h após a exodontia, sendo o mais característico a dor severa, que não responde bem aos analgésicos e geralmente é irradiada à região do temporal, orelha e pescoço (Bowe et al., 2011-2012; Daly et al., 2012). Esta sintomatologia pode ser muito debilitante, causando perda de sono e afetando as atividades diárias do paciente (Zhou et al., 2017). O alvéolo também é visto desprovido de coágulo, com osso exposto e pode estar preenchido por restos alimentares. Halitose marcada, mal gosto, edema na gengiva que circunda o alvéolo e a linfadenite regional também são sintomas frequentes, enquanto que a presença de febre é rara (Noroozi; Philbert, 2009).

Na análise histológica de alvéolos com AS observa-se ausência do coágulo ou restos do coágulo sanguíneo infiltrados com células inflamatórias e com sinais de desintegração. Também são vistas grandes áreas da lâmina dura necróticas com lacunas de osteócitos vazias. O processo inflamatório espalha-se para os espaços medulares, periósteo e na região subepitelial da gengiva. O quadro histológico é típico de uma osteomielite aguda ou subaguda com vasos trombóticos e infiltração violenta por leucócitos polimorfonucleares e mononucleares nos espaços medulares. Devido à reação inflamatória violenta, os processos de reparo sofrem atrasos e são precedidos por extensa atividade osteoclástica, que às vezes causa formação de sequestros ósseos (Birn, 1973).

2.2.1 Reparo do alvéolo dentário sem alveolite

Para entender o mecanismo que desencadeia o quadro de alveolite seca é

necessário conhecer, em primeiro lugar, o processo normal de reparo do alvéolo dentário. Este processo envolve uma interação significativa entre células ósseas e do sistema imune, durante o qual não é observado tecido cartilaginoso, evidenciando a natureza intramembranosa do processo (Vieira et al., 2015).

O reparo do alvéolo é guiado por moléculas sinalizadoras, macromoléculas da matriz extracelular e fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador (TGF), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), entre outras (Siqueira-Junior; Dantas, 2000; Lalani et al., 2005; Corredor-Gomez et al., 2016). Muitas das vias biológicas envolvidas no reparo do alvéolo têm sido extrapoladas a partir dos resultados de estudos que avaliam a regeneração óssea após fraturas, existindo poucos trabalhos que descrevam estas vias especificamente no alvéolo.

O reparo do alvéolo dentário começa logo após a exodontia e termina quando este é totalmente preenchido por osso maduro e a sua entrada fechada por epitélio. A duração do processo varia de indivíduo para indivíduo e depende do tamanho do alvéolo, sendo necessários em média, de 3 a 6 meses para a sua conclusão, embora o osso possa continuar sendo remodelado por mais tempo (Hupp, 2014b; Araujo et al., 2015). O reparo é dividido em três fases que se sobrepõem: fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento (Araujo et al., 2015).

A fase inflamatória começa imediatamente após a exodontia, quando a trombina e o fibrinogênio formam um coágulo sobre o qual o epitélio irá migrar. Durante os primeiros três dias, o coágulo sanguíneo ocupa a maior parte do alvéolo e é invadido por leucócitos, desencadeando uma resposta inflamatória aguda (Cardaropoli et al., 2003; Araujo et al., 2015). A resposta pró-inflamatória inicial envolve a secreção do fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-11 e IL-18 que recrutam células inflamatórias e promovem a angiogênese (Marsell; Einhorn, 2011). Outros dos primeiros fatores de crescimento envolvidos no reparo ósseo são o PDGF e TGF- β , que induzem a migração de células mesenquimais, a angiogênese, a quimiotaxia de células inflamatórias e a agregação plaquetária (Tsiridis et al., 2007).

O coágulo é quase totalmente remodelado na primeira semana após a remoção do dente, momento em que se observam eritrócitos espalhados entre as células mesenquimais (Trombelli et al., 2008). No centro e nas porções marginais do coágulo, os eritrócitos sofrem lise por necrose coagulativa e este vai sendo progressivamente substituído por tecido de granulação (Farina; Trombelli, 2012), caracterizado por uma delicada matriz de colágeno tipo III, fibroblastos e capilares neoformados (Yugoshi et al., 2002). Ao mesmo tempo, osteoblastos estimulados pela hipóxia durante a inflamação, liberam fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). O VEGF pode agir através dos seus receptores em células endoteliais para induzir a angiogênese, aumentando assim o suprimento de oxigênio e de nutrientes necessários para o processo de regeneração (Hing et al., 2004; Hu; Olsen, 2016).

O início da fase proliferativa, ainda na primeira semana, é caracterizado por um rápido depósito de uma matriz provisória rica em fibras colágenas, que é progressivamente invadida por capilares e células osteoprogenitoras (Araujo et al., 2015). As células osteoprogenitoras podem ser derivadas do ligamento periodontal remanescente, da medula óssea (Devlin; Sloan, 2002) ou do periósteo (Rasubala et al., 2004). As fibras principais residuais do ligamento periodontal cortado, que são perpendiculares à superfície da parede do tecido duro e inseridas ao osso, acompanham a formação desta matriz provisória em direção ao centro da cavidade. Neste momento, osteoclastos estão presentes nos espaços medulares das margens do alvéolo, contribuindo com o seu remodelamento (Farina; Trombelli, 2012).

O TGF- β 1 (liberado pelas plaquetas) e o FGF-2 (expresso por osteoblastos), são responsáveis pela promoção da proliferação e ativação de fibroblastos, que desempenham um papel essencial na síntese do tecido de granulação e de matriz provisória (Lieberman et al., 2002). Picos de outras quimiocinas e receptores, de marcadores matriz (Colágeno 1-2, ITGA4, VTN, MMP1a), de marcadores de células mesenquimais (CD105, CD106, OCT4, NANOG, CD34, CD146) e de fatores de crescimento (BMP-2-4-7), também são encontrados até o início da segunda semana (Vieira et al., 2015). Especificamente, as proteínas morfogenéticas ósseas -2, 4 e 7 são fatores centrais na diferenciação dos osteoblastos durante a osteogênese fisiológica e reparadora (Tsiridis et al., 2007).

A segunda semana é marcada pelo começo da deposição de matriz óssea a partir do ápice do alvéolo em direção cervical, que vai sendo gradualmente mineralizada (Farina; Trombelli, 2012; Hupp, 2014b). Ao mesmo tempo a porção cervical do alvéolo é progressivamente coberta por um tampão de tecido conjuntivo fibroso bem organizado, parcialmente revestido por células epiteliais (Farina; Trombelli, 2012). Neste momento existe uma expressão predominante de enzimas de remodelamento da matriz (MMP-2-9), de marcadores de formação / maturação óssea (RUNX2, DMP1, SOST), de quimiocinas e de receptores associados à regeneração como CCL2, CCL17, CCR2, envolvidos na atração de pré-osteoclastos (Vieira et al., 2015). Outra molécula cuja expressão aumenta durante esta fase é a fosfatase alcalina (ALP), responsável pelo início da mineralização da matriz extracelular durante o reparo ósseo alveolar (Rodrigues et al., 2016).

Na fase de remodelamento o osso primário vai sendo substituído por osso lamelar maduro a partir da terceira e quarta semanas. Neste momento, a epiteliação do alvéolo geralmente está completa e os osteoclastos continuam atuando no remodelamento ósseo das margens do alvéolo e dos septos interradiculares presentes após a extração de dentes multirradiculares (Hupp, 2014b). A substituição do osso imaturo pelo osso lamelar requer um equilíbrio entre a reabsorção óssea mediada por osteoclastos e a formação óssea mediada por osteoblastos. O VEGF influencia a função de ambos os tipos de células ósseas, aumentando a angiogênese e ativando a osteoclastogênese (Hu; Olsen, 2016). A atividade de TNF- α , IL-1 e RANKL também promove o remodelamento ósseo por ação dos osteoclastos (Runyan; Gabrick, 2017). Geralmente de 4 a 6 meses após a cirurgia, culmina a reabsorção do osso cortical e o preenchimento do alvéolo com osso lamelar e medula óssea (Hupp, 2014b; Araujo et al., 2015). Porém, com o passar do tempo, o osso alveolar desdentado vai sendo reabsorvido. Como observado no estudo radiográfico de Schropp et al. (2003), aos 3 meses mais de 30% e aos 12 meses mais de 50% da largura vestibulo-lingual da porção marginal do rebordo alveolar é perdida após a remoção do dente.

2.2.2 Etiopatogenia

Como descrito na seção anterior, a regeneração alveolar envolve tanto processos catabólicos como metabólicos, que são influenciados por fatores locais e sistêmicos do hospedeiro, incluindo a vascularização e o suprimento de oxigênio. Acredita-se que a hipóxia possa diminuir a atividade antimicrobiana dos granulócitos em até 50%. Já a virulência bacteriana também é um fator importante no desenvolvimento de infecções de feridas cirúrgicas, e tem sido demonstrado que fatores vasculares e imunológicos do hospedeiro também afetam a incidência de atrasos na cicatrização e infecções de feridas na região de cabeça e pescoço, levando a quadros compatíveis com o de alveolite seca (Krakowiak, 2011).

Apesar da existência da doença ser conhecida há muito tempo, a causa exata da alveolite seca ainda não é bem compreendida (Krakowiak, 2011). Diversas teorias tentam explicar a etiologia da alveolite seca, incluindo infecção bacteriana, trauma e agentes bioquímicos (Vezeau, 2000). O cientista dinamarquês Herluf Birn foi o pioneiro na pesquisa da etiologia da AS e destacou o aumento da atividade fibrinolítica local como principal fator desencadeante, por causar uma dissolução prematura do coágulo dentro do alvéolo e expor o osso subjacente (Birn, 1970, 1972a, b; Birn; Myhre-Jensen, 1972; Birn, 1973).

Birn (1970) mostrou que os alvéolos doentes exibem uma atividade fibrinolítica elevada. A atividade fibrinolítica pode ser gerada por agentes químicos, bactérias e por ativadores produzidos em diferentes tecidos e fluidos corporais (ex: útero, próstata, urina e saliva), devido a uma ativação direta ou indireta do plasminogênio no sangue humano (Birn, 1972a). A medula óssea da mandíbula humana contém ativadores teciduais do tipo estável (maior quantidade) e lábil (baixa quantidade). O ativador lábil é facilmente liberado pelos tecidos em certas condições de estresse (como trauma e queimaduras) e atinge a corrente sanguínea, ativando o plasminogênio no plasma e atendendo às diversas necessidades do organismo como um todo. Por outro lado, o ativador estável é liberado quando há inflamação e permanece localmente, sendo o responsável pela atividade fibrinolítica local do tecido em questão, sem influenciar a atividade fibrinolítica geral do organismo (Birn, 1971).

Birn e Myhre-Jensen sugeriram que o ativador lábil é secretado principalmente por células endoteliais e o ativador estável pelos osteoblastos (Birn; Myhre-Jensen, 1972).

No alvéolo dentário pós-extração, uma inflamação nos espaços da medula óssea pode ocorrer devido ao trauma exercido durante a remoção do dente, à infecção da ferida cirúrgica ou aos dois. A inflamação provoca a liberação dos ativadores teciduais que transformam o plasminogênio em plasmina, que por sua vez dissolve a fibrina e, assim, produz a lise do coágulo sanguíneo (Birn, 1972a; Birn, 1973). Além disso, a fibrinólise liberta bradicinina (nonapeptídeo biologicamente ativo que produz forte dor) e cininogenases na medula óssea alveolar, as quais ativam terminações aferentes dos nervos, portanto, podem explicar a dor pronunciada na alveolite seca (Birn, 1972b; Blum, 2002). Desta forma, a plasmina pode ser considerada a causadora das duas características principais da AS, a desintegração do coágulo e a dor (Cardoso et al., 2010). Porém, o aumento da fibrinólise não pode dissolver o coágulo sanguíneo imediatamente após a cirurgia, pois este contém antiplasmina, a qual deve ser neutralizada antes de ocorrer a dissolução do coágulo. Isto explicaria porque os sintomas da AS aparecem 24-72h após a exodontia (Birn, 1970; Birn, 1973).

Outras teorias descrevem a atividade bacteriana como causa primordial da alveolite seca. Nitzan (1983) mencionou no seu estudo, que a plasmina seria ativada por um produto independente liberado pela bactéria *Treponema denticola*, a qual pode se multiplicar e fazer lise dos coágulos sanguíneos sem produzir os sintomas característicos da infecção, como vermelhidão, inchaço e formação de pûs. Outras bactérias podem causar mudanças na formação e estabilidade do coágulo pela ativação da fagocitose e geração de mediadores inflamatórios (ex: fator de necrose tumoral e interleucina-1) que interferem no processo de reparo (Hooley; Golden, 1995). Porém, estudos mais recentes apontam que a presença bacteriana está limitada à superfície óssea e a princípio não produz uma verdadeira infecção da medular óssea (Krakowiak, 2011).

O fato de nenhum microrganismo específico estar presente na alveolite seca, também limita a teoria das bactérias constituírem o principal fator etiológico. Estudos utilizando modelos experimentais de alveolite têm identificado uma ampla diversidade de espécies bacterianas nos sítios doentes tais como, o *Streptococcus viridians*,

Enterococcus do grupo D, *Proteus vulgaris*, *Bacillus corineforme*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* (de Melo Junior et al., 2002), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus lactis*, *Neisseria*, *Corynebacterium* (MacGregor; Hart, 1970) e *Streptococcus mutans* (Rozanis et al., 1977).

Mais recentemente também tem sido observado que a fibrinólise mediada por plasminogênio não é unicamente causada pelos ativadores teciduais de plasminogênio (Figura 2.1). Outros possíveis fatores têm sido classificados em fisiológicos e não fisiológicos. Dentre os fisiológicos, os intrínsecos são originários de componentes do plasma/sangue, e os extrínsecos originam-se fora do plasma (Vezeau, 2000; Blum, 2002). Além disso, também existem mecanismos de fibrinólise não mediados por plasminogênio induzidos por substâncias liberadas por bactérias e por leucócitos, como resultado da resposta inflamatória local aguda (Vezeau, 2000). Tudo isto sugere que a alveolite seca tem uma origem multifatorial.

Figura 2.1 – Ativadores de plasminogênio

Fonte: Adaptado de Vezeau (2000) e Blum (2002)

* Base da teoria de Birn

† Secretado nas vias urinárias e posteriormente distribuído através do sangue

Fatores locais e sistêmicos que aumentam o risco de alveolite seca incluem: trauma cirúrgico, desenho do retalho, infecção local pré-existente, tabagismo, uso de anticoncepcionais orais, desordens ósseas, doenças sistêmicas como diabetes *mellitus*, distúrbios de coagulação, negligência dos cuidados pós-operatórios, higiene

oral pobre, uso de vasoconstritores e quadros prévios de alveolite (Cardoso et al., 2010; Akinbami; Godspower, 2014; Tarakji et al., 2015).

O cigarro pode ter efeitos químicos e físicos sobre a dinâmica de formação e estabilidade do coágulo sanguíneo, aumentando assim a incidência de AS em pacientes fumantes, nos quais têm sido relatadas taxas dentre 6,4 e 40% após exodontias de terceiros molares, e de 3,4 a 12% após exodontias simples (Murph et al., 2015). Vários fatores relacionados ao cigarro podem influenciar no aumento de casos de AS. O monóxido de carbono provoca uma redução do transporte de oxigênio no sangue. Já, a nicotina é um potente vasoconstritor e aumenta a agregação plaquetária, incrementando o risco de trombozes microvasculares, isquemia periférica e diminuindo o preenchimento imediato do alvéolo com sangue (Lawrence et al., 1984; Meechan et al., 1988; Karayel et al., 2015). O cigarro também aumenta a taxa de necrose dos retalhos (Karayel et al., 2015), e o ato de fumar pode promover a introdução de substâncias nocivas na ferida cirúrgica (Cardoso et al., 2010) e remover o coágulo pela sucção e pressão negativa durante a inalação (Sweet; Butler, 1979).

O uso de anticoncepcionais orais aumenta em quase duas vezes a incidência de AS, devido ao fato de que o sistema fibrinolítico pode ser ativado pelos estrogênios, levando à lise do coágulo (Xu et al., 2015). Já o trauma cirúrgico pode causar compressão do osso superficial do alvéolo e trombose do leito vascular subjacente, diminuindo a perfusão e aumentando risco de infecção (Blum, 2002). O uso excessivo de anestésicos locais com vasoconstritores, como a epinefrina, também podem reduzir fluxo sanguíneo e a tensão de oxigênio, prejudicando o reparo (Noroozi; Philbert, 2009). A falta de higiene oral e a consequente contaminação do alvéolo também favorece à instalação de alveolite seca (Akinbami; Godspower, 2014).

2.2.3 Tratamento

A alveolite seca é geralmente considerada um processo autolimitante que evolui para a cura em um período de 5 a 10 dias (Aleman Navas; Martinez Mendoza, 2010). Porém, até o retorno do processo normal de reparo alveolar, o paciente

apresenta grande desconforto (dor, odor e gosto desagradáveis) e dificuldade para se alimentar e para manter a higiene oral (Zhou et al., 2017). Ainda, o paciente pode precisar de múltiplas visitas ao dentista, o que o afasta das suas atividades diárias e pode causar perdas econômicas para a sociedade (Vezeau, 2000; Kolokythas et al., 2010; Eshghpour; Nejat, 2013).

Tratando-se de um quadro autolimitante, certos autores afirmam que o principal objetivo do tratamento da alveolite seca seja o alívio da dor (Hupp, 2014a). Tendo em conta esta hipótese, alguns profissionais fazem uso de fármacos que possuem exclusivamente propriedades analgésicas (Burgoyne et al., 2010; Bowe et al., 2011-2012; Daly et al., 2012). Entretanto, em determinados casos o controle inadequado da infecção, inicialmente superficial, pode espalhar os microrganismos para os espaços medulares, causando osteomielite ou até prejudicando estruturas nobres mais distantes como o nervo facial (Patel et al., 2010; Ramoglu et al., 2015).

Além disso, quem determina a gravidade e a duração da condição é o potencial de cura do hospedeiro, pelo qual é necessário ter ainda mais cuidado com o tratamento de pacientes imunocomprometidos (Fazakerley; Field, 1991; Noroozi; Philbert, 2009; Aleman Navas; Martinez Mendoza, 2010). Isto ressalta a importância, não unicamente das medidas preventivas, mas também do desenvolvimento e aperfeiçoamento de protocolos de tratamento para que, uma vez instalada a complicação, esta possa ser controlada rapidamente, proporcionando qualidade de vida ao paciente e evitando uma evolução a quadros mais graves (Viera, 2016).

Embora haja um consenso entre clínicos e cientistas que afirmam que a prevenção é melhor do que o tratamento, nenhum dos métodos preventivos isolado é totalmente eficaz e bem aceito (Cardoso et al., 2010). Da mesma forma, nenhum método único de tratamento tem ganhado sucesso ou aceitação universal, e um grande número de profissionais continua a usar "seu protocolo", sem evidências científicas que sustentem seu uso (Alexander, 2000; Cardoso et al., 2011).

A literatura mostra uma série de métodos que foram sugeridos para o tratamento da AS (Bowe et al., 2011-2012). Condutas terapêuticas incluem a irrigação local com soro fisiológico, concomitante ao uso de antibióticos e analgésicos

sistêmicos (Blum, 2002); a aplicação de LASER de baixa potência que também parece proporcionar um efeito analgésico (Kaya et al., 2011; Eshghpour et al., 2015); e o uso de plasma rico em fatores de crescimento e plasma rico em fibrina que podem garantir um reparo tecidual adequado após a AS (Pal et al., 2013; Chakravarthi, 2017). Porém, o uso de curativos de revestimento intra-alveolar é umas das condutas mais praticadas no consultório odontológico.

Os curativos intra-alveolares proporcionam importantes vantagens no tratamento da AS (Figura 2.2), entretanto também existem relatos que descrevem atraso no processo de reparo alveolar e ocorrência de outras complicações locais decorrentes ao uso inadequado de certos materiais (princípios ativos ou carregadores) como celulite (Wegenast, 2013), osteomielite crônica (Aleman Navas; Martinez Mendoza, 2010), miosferulose (Lynch et al., 1984; Belfiglio et al., 1986; Houston et al., 2002), neurite (Zuniga; Leist, 1995) e reações de corpo estranho (Mainous, 1974; Moore; Brekke, 1990).

Figura 2.2 – Curativos intra-alveolares: vantagens

Fonte: Adaptado de Alexander (2000) e Blum (2002)
PA: princípio ativo

Estes curativos podem conter substâncias analgésicas (ex: anestésicos locais como a lidocaína e o butamben) e/ou antimicrobianas, como antissépticos (ex:

clorexidina e iodofórmio), compostos fenólicos (ex: eugenol) e antibióticos (Bowe et al., 2011-2012; Daly et al., 2012). Dentre os vários antibióticos estudados para prevenção e tratamento da AS tais como, tetraciclina, oxitetraciclina, metronidazol, e clindamicina, as tetraciclinas têm mostrado bons resultados (Kolokythas et al., 2010; Daly et al., 2012).

2.3 TETRACICLINAS

As tetraciclinas constituem uma família de antibióticos produzidos naturalmente por bactérias da espécie *Streptomyces* spp (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina); ou semissintéticos produzidos em laboratórios (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina, tigeciclina). Possuem um núcleo de estrutura tetracíclica linear, composto de quatro anéis benzeno fusionados. Todas as tetraciclinas formam complexos quelantes com distintos cátions (ex: cálcio, magnésio ou ferro) (Vicente; Pérez-Trallero, 2010).

As tetraciclinas penetram no interior da célula microbiana por um mecanismo duplo de difusão passiva e transporte ativo (Morejón García et al., 2003). Sua atividade bacteriostática se deve à inibição da síntese proteica, através da união à subunidade ribossomal 30S onde o códon do mRNA é reconhecido pelo anticódon do tRNA (Vicente; Pérez-Trallero, 2010; Nguyen et al., 2014). Sua duração de ação é variada, podendo ser de ação curta (meia vida de 6-8 h), de ação intermediária (meia vida ± 12 h) ou de ação prolongada (meia vida ≥ 16 h) (Cheng et al., 2012).

De acordo com a ordem do seu descobrimento, podem ser divididas em três gerações (Tabela 2.1). As tetraciclinas de primeira geração são ativas frente a um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As de segunda geração, além do efeito bacteriostático, podem agir frente a outros microrganismos como protozoários, vírus e helmintos (Chukwudi, 2016). Já as tetraciclinas de terceira geração possuem melhores propriedades farmacocinéticas, menor toxicidade e o seu espectro de ação abarca os microrganismos frente aos quais são ativas as tetraciclinas clássicas, além da grande maioria das bactérias resistentes, incluindo as

enterobactérias multirresistentes (Morejón García et al., 2003; Vicente; Pérez-Trallero, 2010).

Tabela 2.1 – Características das tetraciclinas mais conhecidas

Geração	Nome	Meia vida	Outras características
1 ^{ra}	Clortetraciclina	Curta	<i>Descoberta em 1948</i>
	Oxitetraciclina (OTC)	Curta	Década de 1950
	Tetraciclina (TTC)	Curta	Derivado semissintético
	Demeclociclina	Intermediária	
	Limeciclina	Intermediária	
	Metaciclina	Intermediária	
2 ^{da}	Doxiciclina	Longa	Derivado semissintético da OTC
	Minociclina	Longa	
3 ^{ra}	Tigeciclina	Longa	Derivado semissintético da minociclina
	Aminometilciclinas		Em desenvolvimento

Fonte: Adaptado de Morejón García et al. (2003) e Vicente e Pérez-Trallero (2010)

Durante um período de tempo, o uso de tetraciclinas para o tratamento de processos infecciosos teve um declínio devido ao desenvolvimento de resistência microbiana. No entanto, nos últimos anos tem se observado uma tendência contrária graças às medidas de controle no uso de antibióticos as quais diminuíram significativamente esta resistência (Chen et al., 2017). Dos mecanismos de resistência à tetraciclina adquiridos, o mais comum é o efluxo, sendo que já foram identificadas pelo menos 28 classes distintas de bombas de efluxo. Outro mecanismo de resistência muito comum é comandado pelas chamadas proteínas de proteção do ribossomo, que se ligam a ele e removem o medicamento do seu local de ligação (Nguyen et al., 2014).

Sabe-se que as tetraciclinas são eficazes no tratamento de doenças infecciosas como a malária, toxoplasmose, leishmaniose, acne, rosácea e elefantíase. Especificamente no tratamento das infecções envolvendo tecido ósseo, as tetraciclinas apresentam resultados variados na literatura. Um estudo realizado em pacientes com infecção em sítios cirúrgicos implantados com próteses ortopédicas

mostrou que o microrganismo isolado em todos os casos foi o *Staphylococcus aureus*, o qual se apresentou sensível à tetraciclina (TTC) em 71,4% dos casos (Shah et al., 2017a). Em um modelo experimental de osteomielite aguda causada por *Enterococcus faecalis* em ratos, foi visto que a bactéria na forma planctônica e em biofilme foi sensível à TTC (Frank et al., 2015). Outro estudo que pesquisou as características microbiológicas associadas a infecções ósseas e articulares por *Streptococcus* do grupo B, apontou uma alta porcentagem de resistência (81%) da tetraciclina frente a estas cepas bacterianas (Kerneis et al., 2017).

Além da eficácia no tratamento de infecções, as tetraciclinas são utilizadas no controle de doenças não infecciosas como a osteoartrite, osteoporose, diabetes, dermatite, aterosclerose, doença de Parkinson, Alzheimer e Huntington. Isto acontece devido a que, diferentemente de outros antibióticos, estas possuem atividade anti-inflamatória, neuroprotetora e anti-apoptótica, além da sua atividade antimicrobiana. O mecanismo de ação nestas atividades ainda é pouco compreendido, porém acredita-se que esteja relacionado com a modulação da resposta do hospedeiro (Gu et al., 2012; Garrido-Mesa et al., 2013; Chukwudi, 2016).

Ainda, as tetraciclinas são utilizadas como marcadores no estudo do *turnover* e da neoformação óssea (Cheng et al., 2012). Isto é possível graças a sua capacidade quelante que permite a captura do cálcio dos ossos e a incorporação do íon em sítios de neoformação óssea. Desta forma, quando as tetraciclinas são absorvidas, elas são incorporadas no tecido ósseo em processo de mineralização e podem ser detectadas por fluorescência (Pautke et al., 2010). Também por este motivo, as tetraciclinas começaram a ser utilizadas como um composto químico potente para direcionar/transportar outras drogas cujo alvo é o tecido ósseo (*bone-targeting*) (Wang et al., 2015).

Outros efeitos biológicos das tetraciclinas sobre o osso incluem efeitos diretos nas atividades de osteoclastos e osteoblastos (Cheng et al., 2012). Sabe-se que as tetraciclinas podem levar a uma inibição da atividade de várias metaloproteinasas de matriz (MMPs). Estas MMPs têm um papel importante na osteólise mediada por osteoclastos durante a fase de degradação da matriz desmineralizada, pois possuem atividade collagenolítica. O uso de tetraciclinas também pode reduzir a secreção de

interleucina-6, citocina que induz a formação e ativação dos osteoclastos, mediando a destruição inflamatória do osso (Kirkwood et al., 2003; Saikali; Singh, 2003). Ao mesmo tempo, foi observado que várias tetraciclinas, incluindo a doxiciclina, foram capazes de induzir apoptose em osteoclastos maduros (em coelhos) e inibir a osteoclastogênese *in vitro*, possivelmente por atividades independentes das suas propriedades antibiótica e anticolagenase (Bettany et al., 2000).

As tetraciclinas em doses baixas também podem aumentar a neoformação óssea devido a sua capacidade de induzir a proliferação e diferenciação osteoblástica (Chang; Yamada, 2000; Cheng et al., 2012; Limirio et al., 2016). No entanto, sabe-se que concentrações superiores a 60 µg/mL podem inibir a proliferação de osteoblastos humanos, possivelmente através da destruição das mitocôndrias (Dewelhenke et al., 2007). Portanto, acredita-se que as tetraciclinas têm um efeito dose-dependente sobre os osteoblastos (Cheng et al., 2012).

Apesar das suas inúmeras vantagens, o uso sistêmico de tetraciclinas está contraindicado em mulheres grávidas por causar deformidades ósseas e dentárias graves no feto. Seu uso também deve ser evitado em crianças menores de 8 anos de idade, pois pode causar escurecimento dos dentes e pode estar associada à ocorrência de hipoplasia do esmalte, pela ligação do fármaco ao cálcio (Bjorvatn et al., 1985; Tavares, 2014).

2.3.1 Tetraciclinas na odontologia

As tetraciclinas são utilizadas no tratamento de uma variedade de condições orais, tanto na forma local quanto sistêmica. A sua eficácia no tratamento da periodontite está bem estabelecida e são altamente recomendadas no tratamento de dentes avulsionados com necessidade de reimplante. Além disso, existe uma tendência crescente do uso de tetraciclinas para tratamento da estomatite aftosa recorrente, e há relatos do seu uso no nevo branco esponjoso, herpes labial, penfigóide e diversas infecções bacterianas que afetam a região orofaríngea, com bons resultados (Gu et al., 2012; Kennedy et al., 2014).

A atividade confirmada das tetraciclina na modulação da resposta do hospedeiro, incluindo a inibição das MMPs (gelatinases e collagenases) encontrou aplicação em uma das muitas doenças que apresentam ativação patológica dessas enzimas, a periodontite (Saikali; Singh, 2003). Especificamente, a doxicilina em doses baixas (subantimicrobianas) é um dos poucos fármacos aprovados pela Food and Drug Administration e outras agências reguladoras no Canadá e na Europa, como modulador da resposta imune do hospedeiro. Esta foi projetada para suprimir a lesão periodontal inflamatória, inibindo a degradação patológica de vários colágenos e a reabsorção óssea (Figura 2.3); e evitar complicações da administração de tetraciclina sistêmicas em doses regulares, como distúrbios gastrointestinais, aumento da fotossensibilidade e o surgimento de microrganismos resistentes (Gu et al., 2012; Golub et al., 2016).

Figura 2.3 – Ação das tetraciclina na doença periodontal

Fonte: Adaptado de Golub et al. (2016)

Setas vermelhas: inibição

TTC: tetraciclina

No estudo de Golub et al. (2001) foi observado que pacientes tratados com cápsulas de doxicilina (20 mg; 2x por dia) como adjuvante no tratamento periodontal, mostraram reduzir significativamente a atividade da collagenase e melhorar a inserção periodontal em comparação com indivíduos que não receberam o antibiótico. Sadaf et al. (2012) utilizaram tetraciclina (TTC) de forma local, impregnada em fibras de

colágeno. O grupo teste foi tratado com raspagem e alisamento radicular e a inserção das fibras com TTC na bolsa periodontal; o grupo controle foi tratado unicamente com raspagem e alisamento. Após 90 dias observaram uma redução significativa do Índice de Placa, Índice Gengival e na prevalência de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermédia* nas bolsas periodontais do grupo teste. Em um estudo mais recente, foi visto que a irrigação de bolsas periodontais com tetraciclina TTC (10 mg/mL) melhorou os parâmetros clínicos e microbiológicos da periodontia de forma mais expressiva que os grupos irrigados com soro fisiológico e com iodo-povidine 2% (Perayil et al., 2016).

De igual maneira, estudos vêm revelando a eficácia das tetraciclinas no controle da peri-implantite. Em cães, o tratamento da peri-implantite com cloridrato de tetraciclina (50 mg/mL) forneceu uma descontaminação suficiente da superfície do implante para permitir a resolução do defeito ósseo (Ramos et al., 2017). Fibras poliméricas impregnadas com cloridrato de tetraciclina mostraram grande potencial para inibir ou reduzir o biofilme formado por patógenos presentes na peri-implantite (Shahi et al., 2017). Um relato de caso com seguimento de 30 meses mostra sucesso na eliminação da inflamação peri-implantar e promoção do ganho de osso em torno dos implantes em sítios tratados com a aplicação tópica de TTC e osso autógeno (Nicoli et al., 2016). Em outro relato de caso, a TTC foi utilizada com sucesso (acompanhamento de 12 meses) no tratamento de defeitos ósseos em pacientes com osteonecrose perimplantar, causada pelo uso prolongado de bisfosfonatos. O antibiotico foi misturado com osso medular (proporção 4:1) e inserido no defeito (Wang et al., 2007).

Por ter propriedades anti reabsortivas, além de propriedades antibacterianas, a tetraciclina foi considerada como antibiótico de primeira escolha após avulsão dentária com indicação de reimplante (Andersson et al., 2012). Estudos em animais investigaram o efeito da imersão de dentes avulsionados em tetraciclina antes do reimplante, e estes dentes apresentaram melhores resultados em relação aos grupos que não receberam terapia antibiótica prévia (Day; Duggal, 2010). Do mesmo modo, foram observados bons resultados com o uso sistêmico da tetraciclina em casos de avulsão dentária (Gomes et al., 2015; Melo et al., 2016).

As tetraciclinas também são utilizadas na endodontia como agentes irrigantes

para remoção da “*smear layer*” na superfície dos canais radiculares. Pela sua natureza bacteriostática, as tetraciclinas não produzem lise celular e, portanto, não causam a liberação de substâncias antigênicas como a endotoxina. Além disso, podem agir como quelantes de cálcio e causar desmineralização superficial (Ahir et al., 2014).

Não foram encontrados estudos experimentais avaliando o uso de tetraciclinas no tratamento da alveolite seca, porém, existe uma literatura variada sobre a sua utilização na prevenção desta condição. Tetraciclinas tópicas incorporadas em diversos veículos, como suspensões aquosas, pó, gazes e esponjas gelatinosas, mostraram resultados promissores na redução da incidência de AS (Sorensen; Preisch, 1987; Swanson, 1989; Akota et al., 1998; Kolokythas et al., 2010). Swanson (1989) observou que os casos de AS foram menos numerosos no grupo que recebeu suspensão de tetraciclina tópica (3,9%) em relação ao grupo controle negativo (20,4%), após exodontia de terceiros molares mandibulares. Sorensen e Preisch (1987) viram uma redução de 28,7% a 14,6% na incidência de alveolite seca e Akota et al. (1998) uma diminuição de 35% a 4% em alvéolos de terceiros molares inferiores tratados com TTC. Uma revisão sistemática concluiu que existe forte evidência mostrando que o tratamento local com tetraciclina tem um efeito clinicamente relevante na prevenção de AS (Hedstrom; Sjogren, 2007). Já um estudo mais recente mostrou que o grupo que recebeu TTC teve menor dor e inflamação pós-operatória, porém, a diferença com o grupo controle não foi estatisticamente significativa (Sanchis et al., 2004).

Efeitos colaterais causados pela aplicação profilática de tetraciclina tópica têm sido notificados. Isto se deve principalmente ao tipo de veículo e forma farmacêutica empregada. A aplicação de uma tetraciclina incorporada em um carregador à base de petróleo causou uma lesão inflamatória granulomatosa conhecida como miosferulose, provocada pela emulsão de substâncias lipídicas em eritrócitos extravasados (Lynch et al., 1984; Belfiglio et al., 1986). Por outro lado, o uso de pó de tetraciclina carregado em fibras de ácido polilático causou uma reação de células gigantes. Acredita-se que isto foi provocado pela falta de solubilidade do pó e ainda agravado por certas características hidrofóbicas do polímero biodegradável associado (Moore; Brekke, 1990). Outro relato descreveu a ocorrência de neurite do nervo alveolar inferior seis meses depois da exodontia de terceiro molar e aplicação tópica de tetraciclina

(Zuniga; Leist, 1995). Não obstante, o próprio autor afirma que a tetraciclina pode ser capaz de induzir uma hiperalgesia inflamatória quando aplicada em contato direto sobre um nervo com lesão prévia do epineuro e, portanto, é provável que a aplicação de tetraciclina sobre um feixe nervoso não danificado, não teria resultado em uma neurite.

Em um trabalho realizado em ratos, foi criado um ambiente propício para a ocorrência de alveolite seca através da aplicação de adrenalina (1:1000) no alvéolo após exodontia. No mesmo tempo cirúrgico, o alvéolo foi irrigado com cloridrato de tetraciclina (100 mg/mL). Verificou-se que a incidência de AS foi menor no grupo que recebeu TTC após a aplicação de adrenalina. A tetraciclina também causou alterações significativas na microbiota dos sítios cirúrgicos, diminuindo o número de anaeróbios, porém, aumentando a participação de microrganismos resistentes, especialmente os anaeróbios facultativos. Desta forma o uso de tetraciclina intra-alveolar foi desaconselhado como um procedimento de rotina profilática após exodontias (Bosco et al., 2008).

2.3.2 Oxitetraciclina

No início da década de 1950, Alexander Finlay da Pfizer descobriu a oxitetraciclina (OTC), um metabólito secundário da bactéria *Streptomyces rimosus* encontrada no solo da região de Terra Haute – Indiana, e na época a chamou de terramicina (Morejón García et al., 2003; Nguyen et al., 2014). A oxitetraciclina é um inibidor da síntese proteica eficaz frente a uma série de patógenos gram-positivos e gram-negativos, pelo qual é considerada um antibiótico de amplo espectro (Petkovic et al., 2017).

É utilizada no tratamento de múltiplas infecções (ex: intestinais, respiratórias, dermatológicas, oftalmológicas) tanto em humanos como em animais (Stone; Chodosh, 2004; Olszewska, 2006; Dougnon et al., 2017; Herrero-Fresno et al., 2017; Petkovic et al., 2017). Quando ingerida por via oral, a oxitetraciclina é absorvida no estômago, duodeno e intestino delgado. Sua meia vida é $\approx 9,2$ h e o tempo para atingir

a concentração plasmática máxima (T_{max}) é de ≈ 3 h (Agwuh; MacGowan, 2006).

A oxitetraciclina também possui efeitos não antimicrobianos. Em um estudo em cultura de células foi observado que a oxitetraciclina (10 $\mu\text{g/mL}$) suprimiu a produção de muco nas células epiteliais respiratórias humanas e diminuiu a inflamação pela redução na produção da proteína Mucin 5AC e das interleucinas IL-1 β e IL-8 (Shah et al., 2017b). Outro estudo laboratorial mostrou que a oxitetraciclina inibiu a osteoclastogênese e a reabsorção óssea e estimulou a apoptose em culturas de macrófagos da medula óssea do rato. Além disso, a análise histomorfométrica de tíbias de ratos revelou que a OTC (administração subcutânea, 2 aplicações, 20 mg/kg) diminuiu a superfície erodida, o número de osteoclastos por perímetro ósseo e a superfície dos osteoclastos por superfície óssea em cerca de 50% (Zhou et al., 2010).

Na odontologia, a oxitetraciclina tem sido utilizada no tratamento de diversas condições. Uma publicação relatou o sucesso do tratamento de uma infecção endodôntica refratária causada por *Staphylococcus epidermidis*, mediante o uso de cloridrato de oxitetraciclina sistêmica (500 mg a cada 6 horas durante 7 dias), complementada com uma dose de ceftriaxona (1 g intramuscular) (Goncalves et al., 2016). A oxitetraciclina também foi utilizada com sucesso no tratamento de osteorradionecrose da mandíbula (500 mg a cada 6 horas durante 3 semanas) em conjunto com o debridamento cirúrgico (Millelt et al., 1990).

Outro estudo propôs o uso de OTC na terapia da sialoadenite e sialorréia recorrentes com a hipótese de que a OTC causaria uma atrofia glandular. Os autores injetaram 0,3 mL de oxitetraciclina (100 mg/mL) na glândula submandibular de coelhos e observaram a formação de fibrose, porém, não houve atrofia glandular. Por este motivo recomendaram mais estudos com seguimento maior para comprovar sua hipótese (Guclu et al., 2016). Por outra parte, também foi observado que a oxitetraciclina tópica pode ser terapeuticamente útil para retardar a ruptura patológica do tecido periodontal, e ainda para induzir a regeneração de tecidos periodontais perdidos em casos de avulsão e necessidade de reimplante dental, devido ao seu efeito antimicrobiano e à inibição da collagenase e da atividade osteoclástica (Kabashima et al., 2012).

Um produto comercial com OTC desenvolvido pela Pfizer, Terra-Cortril®, tem sido empregado para a prevenção de alveolite seca. Trata-se de um fármaco contendo cloridrato de oxitetraciclina e hidrocortisona como princípios ativos, além dos excipientes petrolato branco e petrolato líquido na pomada, ou óleo mineral com estearato de alumínio na suspensão oftálmica (Pfizer, 1999, 2013). Uma série de estudos clínicos testaram Terra-Cortril® impregnado em esponjas gelatinosas reabsorvíveis no alvéolo após exodontia de terceiros molares inferiores, e observaram que o produto foi eficaz para reduzir a incidência de alveolite seca (Julius et al., 1982; Rutledge; Marcoot, 1984; Fridrich; Olson, 1990). Ao longo dos anos, o uso deste produto começou a ser evitado devido ao surgimento de casos de miosferulose, causados pela presença de petrolatos na sua composição (Lynch et al., 1984; Belfiglio et al., 1986; Wallace; Neville, 1990); não obstante, um estudo epidemiológico mais recente, realizado na Suíça, mostrou que Terra-Cortril® ainda é um produto amplamente utilizado pelos dentistas após extrações dentárias (Vlcek et al., 2015).

2.4 NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

Os métodos convencionais de administração de fármacos são desenvolvidos para liberar rapidamente o princípio ativo. Os sistemas de liberação controlada (SLC), dentre eles as nanofibras poliméricas, possibilitam a liberação do fármaco de forma mediata durante um tempo prolongado, assim como a manutenção da concentração dentro da faixa terapêutica durante um tempo maior e a redução do número de doses. Ainda, podem proteger substâncias instáveis e melhorar a entrega do fármaco em áreas de difícil acesso, como a barreira hematoencefálica, e locais onde a solubilidade de fármacos hidrofóbicos esteja prejudicada (Felice et al., 2014).

Os SLC são muito utilizados no transporte e liberação de antibióticos e outros agentes antimicrobianos, diminuindo o risco de toxicidade sistêmica e desenvolvimento de resistência bacteriana, e aumentando a sua meia vida (Stebbins et al., 2014). Especificamente nas infecções ósseas, a dificuldade enfrentada pelos agentes patogênicos invasivos na tentativa de colonizar o osso, é diretamente proporcional à dificuldade enfrentada pelos clínicos para garantir a entrega de

antibióticos no local da infecção e curá-la, pelo qual os SLC são especialmente úteis (Uskokovic, 2015).

Na cavidade oral, os sistemas tópicos de liberação controlada têm múltiplas vantagens clínicas e farmacológicas tais como: maior substantividade, conforto para o paciente, aumento do coeficiente de difusão da droga, redução da dose e diminuição dos efeitos colaterais relacionados à administração sistêmica. Exemplos destes sistemas utilizados na odontologia são os vernizes, lipossomas, nanopartículas, nanoesferas e nanofibras (Steinberg; Friedman, 2017).

As nanofibras vêm sendo exploradas como sistemas de liberação controlada de fármacos para tratamento de distúrbios, infecções e na engenharia tecidual (Singh et al., 2018). São consideradas como nanométricas, as fibras com diâmetros inferiores a 1000 nm ou 1 μ m (Valizadeh; Mussa Farkhani, 2014). Estas possuem características importantes, como baixa densidade, alta porosidade e flexibilidade, poros de tamanho pequeno, maior área de superfície em relação ao volume, boas propriedades mecânicas e aceitam vários tipos de modificação da superfície (Huang et al., 2003; Tonglairoum et al., 2016). As vantagens do uso de nanofibras em relação a outros SLC como as nanocápsulas, nanopartículas ou micelas é a possibilidade de terapias locais (tópicas), mantendo o dispositivo em áreas específicas do corpo e diminuindo a incidência de efeitos adversos próprios dos tratamentos sistêmicos (Greiner; Wendorff, 2007; Liu et al., 2017).

As nanofibras podem ser produzidas pelo método de eletrofiação, uma técnica barata, eficaz e versátil para incorporar diversos tipos de polímeros, misturas poliméricas, cerâmicas, sol-gel e compósitos (Celebioglu et al., 2016). As nanofibras produzidas por eletrofiação são efetivos curativos de revestimento em ferimentos, por providenciarem um ambiente propício para a regeneração tecidual. Estas fibras formam um arcabouço com estrutura similar à matriz extracelular dos tecidos, providenciando resistência mecânica e facilitando a migração celular. Além disso, sua alta porosidade facilita o intercâmbio de oxigênio, nutrientes, citocinas e resíduos (Choi et al., 2015; Kishan; Cosgriff-Hernandez, 2017).

Além das nanofibras sólidas clássicas de superfície lisa, as nanofibras geradas por eletrofiação também podem ser modificadas a fim de melhorar o desempenho desses dispositivos e aumentar sua similaridade com os tecidos do organismo. Isto inclui a funcionalização da superfície e/ou núcleo com moléculas ou nanopartículas bioativas (durante ou após o processo de eletrofiação) e a formação de filmes com diversos arranjos de arquitetura tridimensional (Luong-Van et al., 2006; Sill; von Recum, 2008; Kishan; Cosgriff-Hernandez, 2017; Xue et al., 2017).

2.4.1 Eletrofiação

Várias técnicas já foram empregadas para a obtenção de fibras poliméricas (ex: separação de fases, síntese de modelo e automontagem), porém, a eletrofiação ou fiação eletrostática é o único método que pode ser utilizado na produção em massa de nanofibras de diversos polímeros, de forma simples e barata (Huang et al., 2003; Goonoo et al., 2014). A eletrofiação é um processo controlado por forças eletrostáticas, onde a extração contínua de nanofibras de um fluido viscoelástico depende da repulsão eletrostática entre as cargas de superfície (Rutledge; Fridrikh, 2007; Xue et al., 2017), sendo necessário que exista uma diferença de potencial entre a seringa que contém o material polimérico e o suporte onde serão depositadas as fibras (Luong-Van et al., 2006; Sill; von Recum, 2008).

Em um sistema de típico de eletrofiação (Figura 2.4), uma solução polimérica é bombeada através de um capilar cuja ponta possui um diâmetro interno na ordem de 100 μm , e que se encontra a uma distância de 10 a 25 cm de um coletor aterrado (contra-eletrodo) onde serão depositadas as fibras (normalmente uma placa metálica ou um cilindro rotativo). Ao mesmo tempo, este capilar funciona como um eletrodo, ao qual é aplicado um campo elétrico elevado (100-500 kV/m). A tensão aplicada provoca inicialmente uma deformação em forma de cone (cone de Taylor) na gota de solução de polímero (Greiner; Wendorff, 2007). Com tensões maiores, um jato é formado a partir da gota deformada quando a sua força eletrostática ultrapassa a tensão superficial da gota de polímero. Este jato eletricamente carregado se move em direção ao coletor formando múltiplos filamentos que sofrem alongamento e afinamento. No

caminho do coletor, o solvente evapora e uma rede de fibras sólidas interconectadas são precipitadas em altas velocidades (≥ 40 m/s) sobre o coletor (Greiner; Wendorff, 2007; Choi et al., 2015; Kishan; Cosgriff-Hernandez, 2017).

Figura 2.4 – Sistema de eletrofiação

Fonte: Adaptado de Greiner e Wendorff (2007)

As fibras formadas durante a eletrofiação podem ter morfologia variada. Em alguns casos, as fibras não são redondas, mas são fitas planas e, em outros casos, a distribuição dos diâmetros das fibras é ampla. Às vezes, grânulos são formados em lugar de fibras, e fibras com grânulos dispostos como pérolas em uma corda também podem ser vistas (Greiner; Wendorff, 2007). A morfologia e a dimensão das fibras eletrofiadas dependem de um conjunto de parâmetros de processamento (Tabela 2.2) tipicamente divididos em: propriedades intrínsecas da solução (peso molecular e solubilidade do polímero, condutividade elétrica, viscosidade, tensão superficial), condições de processamento (voltagem aplicada, distância ao coletor, taxa de fluxo)

e condições ambientais (umidade, temperatura) (Huang et al., 2003; Kishan; Cosgriff-Hernandez, 2017).

A viscosidade da solução, que é controlada pela concentração de polímero e pelo peso molecular, deve ser suficiente para resistir às forças de repulsão eletrostática durante o desenho das fibras, caso contrário, a quebra de fibras resulta na formação de gotículas e pulverização. O aumento da viscosidade da solução dificulta a formação do jato, porém, gera fibras de diâmetros maiores e diminui a formação de grânulos ao longo da fibra (Choi et al., 2015; Kishan; Cosgriff-Hernandez, 2017).

Já as forças de repulsão eletrostática podem ser moduladas alterando a condutividade da solução. Aumentar a condutividade da solução pode resultar em fibras livres de defeitos, diminuição da formação de grânulos e diâmetros menores pela repulsão de carga aumentada. A escolha do solvente, a adição de sais e a utilização de polímeros condutores podem mudar este parâmetro (Kishan; Cosgriff-Hernandez, 2017). A tensão superficial também é importante, pois uma maior tensão superficial pode causar a formação de grânulos. Este parâmetro pode ser influenciado pelo uso de surfactantes (Greiner; Wendorff, 2007; Choi et al., 2015).

A taxa de fluxo determina o tamanho da gota da solução que está exposta ao campo elétrico na ponta da agulha. O aumento do fluxo pode resultar em aumento da umidade das fibras e aumento da formação de grânulos. A distância entre a ponta da agulha e o coletor determina o tempo de percurso do jato, sendo que uma distância maior permite uma maior evaporação do solvente e diminuição da umidade das fibras. O aumento do tempo de percurso também prolonga a exposição do jato fibroso ao campo elétrico, podendo causar divisão de fibras e diminuição do seu diâmetro (Choi et al., 2015; Kishan; Cosgriff-Hernandez, 2017). Já a voltagem altera a repulsão de carga eletrostática e o campo elétrico entre a ponta da agulha e o coletor, sendo que uma voltagem maior pode diminuir o diâmetro das fibras e aumentar a formação de grânulos e uma força de campo abaixo do normal pode causar uma falha na formação do jato (Sill; von Recum, 2008; Kishan; Cosgriff-Hernandez, 2017).

Tabela 2.2 – Resumo do efeito da variação dos parâmetros da eletrofiação na morfologia das nanofibras

Parâmetro	Efeito na morfologia das nanofibras
↑ Voltagem	Diâmetro da fibra inicialmente ↓, posteriormente ↑
↑ Taxa de fluxo	Diâmetro da fibra ↑; estruturas peroladas quando o fluxo é muito alto
↑ Distância capilar — coletor	Diâmetro da fibra ↓; estruturas peroladas quando a distância é muito curta
↑ Viscosidade	Diâmetro da fibra ↑
↑ Condutividade	Diâmetro da fibra ↓
↑ Volatilidade do solvente	Fibras exibem microtextura (poros na superfície, ↑ superfície)

Fonte: Adaptado de Sill e von Recum (2008)

São conhecidos cinco métodos de incorporação de agentes ativos nas fibras, incluindo a mistura do agente com a solução de polímero antes da eletrofiação, fabricação de uma estrutura casca-núcleo (*core-shell*) através de eletrofiação coaxial, encapsulamento do agente ativo antes de misturá-lo com a solução polimérica, tratamento da fibra após a eletrofiação para converter um precursor em sua forma ativa, ou untar a superfície da fibra com o agente ativo (Liu et al., 2017).

2.4.2 Polímeros reabsorvíveis

A literatura apresenta mais de cinquenta diferentes polímeros que foram utilizados com sucesso na obtenção de fibras ultrafinas, com diâmetros variando de menos de 3 nm a mais de 1 µm. Porém, nos últimos anos, os biopolímeros e polímeros biodegradáveis (naturais e sintéticos) têm despertado um grande interesse devido a suas múltiplas utilidades na área médica (Huang et al., 2003). Estes são degradados progressivamente ao longo de um período de tempo no qual vão funcionar como arcabouços e/ ou liberar princípios ativos. Dependendo do tipo de disposição das cadeias do polímero (linear, ramificada ou reticulada) e sua natureza cristalina /

amorfa, a taxa de degradação pode ser alterada (Goonoo et al., 2014; Prakasam et al., 2017).

O ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e a poli (ϵ -caprolactona) (PCL) são alguns exemplos de polímeros que vêm sendo utilizados na confecção de nanofibras pelo processo de eletrofiação, entretanto, seu uso na medicina começou há muitos anos, por exemplo, em suturas absorvíveis e em sistemas de osteossíntese (Huang et al., 2003; Felice et al., 2014; Al-Moraissi; Ellis, 2015; Prakasam et al., 2017). Na odontologia, os polímeros biodegradáveis têm destaque na área de periodontia, principalmente na liberação de antibióticos e antissépticos tais como: tetraciclina (Shahi et al., 2017), metronidazol (Varshosaz et al., 2002) e clorexidina (Yue et al., 2004; Morelli et al., 2017). Na regeneração tecidual eles também desempenham um papel importante na repopulação celular guiada pela formação de arcabouços e liberação de fatores de crescimento. Dentro de defeitos ósseos agem como membrana de barreira e no tratamento de infecções são importantes ferramentas para a liberação de antibióticos (Shalaby; Salz, 2006).

O poli (ácido láctico-co-glicólico) é um dos biomateriais mais utilizados para microencapsulação e liberação prolongada de fármacos, proteínas e antígenos. O PLGA possui boa biodegradabilidade e é reconhecido como seguro pelas agências reguladoras internacionais, incluindo a Food and Drug Administration dos Estados Unidos (Han et al., 2016). No entanto, alguns autores relatam que podem existir problemas de biocompatibilidade relacionados ao pH ácido produzido pelos resíduos de degradação do PLGA, que alteram a bioatividade do fármaco ou induzem irritação e inflamação ao paciente (Felice et al., 2014; Goonoo et al., 2014). O ácido polilático é um éster biodegradável sintetizado a partir de fontes naturais como amido e grãos. Apresenta boa rigidez, resistência e bioatividade e já foi utilizado em vários tipos de implantes ósseos e na regeneração tecidual guiada (Al-Moraissi; Ellis, 2015; Yao et al., 2017). O PLA também foi utilizado dentro do alvéolo dentário para a prevenção de alveolite seca. Acreditava-se que este material poderia constituir uma matriz estável de suporte para o coágulo sanguíneo, e posteriormente para o tecido de granulação e osteóide (Hooley; Golden, 1995; Kolokythas et al., 2010). Não obstante, foram reportadas complicações com seu uso e foi visto um aumento nos casos de AS nos

pacientes que receberam PLA após exodontia (Moore; Brekke, 1990; Hooley; Golden, 1995).

A poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um poliéster alifático semi-cristalino, que possui excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, boa resistência mecânica, boa porosidade e maior resistência à fratura do que a maioria de polímeros biocompatíveis. Ao mesmo tempo, a PCL possui variadas opções de flexibilidade e modelagem, permitindo a obtenção de produtos de diversos formatos (Elangomannan et al., 2017; Prakasam et al., 2017). Este polímero é degradado essencialmente por hidrólise das ligações éster, pela reação com a água dos tecidos (Goonoo et al., 2014). É mais estável em comparação aos polilactídeos porque tem menos ligações éster por monômero e, por conseguinte, leva mais tempo para que os fragmentos da cadeia PCL sejam hidrolisados. O produto de degradação da PCL é o ácido 6-hidroxicaproico; molécula que pode ser absorvida por células, metabolizadas e eliminadas pela excreção renal, sem ficar acumuladas no corpo (Malikmammadov et al., 2017). O pH do meio é influente na taxa de degradação, pois, no meio alcalino a degradação da PCL é mais rápida do que no ambiente ácido (Hernández et al., 2013).

A PCL é amplamente utilizada em implantes médicos, geralmente implantes de longo prazo devido à sua alta cristalinidade, e em sistemas de liberação controlada graças a sua permeabilidade (Prakasam et al., 2017). Nos últimos anos, as nanofibras de PCL têm sido empregadas em arcabouços biomiméticos, especialmente para a regeneração óssea, pois estas têm uma extensa área superficial (poros) e, portanto, podem proporcionar um microambiente desejável para a adesão e proliferação celular precoce, e formação de tecido mineralizado (Yoshimoto et al., 2003; Gao et al., 2016; Khandaker et al., 2017).

O polímero PCL puro e em misturas poliméricas também tem sido utilizado na elaboração de nanofibras para cicatrização de feridas, enxertos vasculares (de Valence et al., 2012; Augustine et al., 2014; Bertram et al., 2017; Sharif et al., 2017) e até na interface de dois tecidos (Lee et al., 2011). Assim como para a liberação de antimicrobianos como triclosan (del Valle et al., 2012), nanopartículas de prata (Augustine et al., 2016) e tetraciclina (Zahedi et al., 2011; Liu et al., 2017). Além disso,

foi descrito anteriormente que a caprolactona (monômero da PCL) seria capaz de inibir a atividade proteolítica e fibrinolítica da plasmina (Auerswald; Doleschel, 1967).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal deste estudo foi preparar uma nanofibra polimérica de policaprolactona e oxitetraciclina (PCL/OTC), e ainda avaliar suas propriedades físicas e biológicas *in vitro* e *in vivo*, visando seu futuro uso no tratamento de alveolite seca.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar o preparo da nanofibra polimérica (PCL/OTC) e sua caracterização física através da microscopia eletrônica de varredura e avaliação do seu perfil de liberação.

Avaliar as propriedades antimicrobianas do cloridrato de oxitetraciclina quando incorporado na nanofibra PCL/OTC, frente a um biofilme bacteriano composto por *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Streptococcus sanguis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Observar os aspectos histomorfológicos e histomorfométricos do processo de reparo do alvéolo de molar de ratos com alveolite seca induzida, sob ação da nanofibra PCL/OTC.

Quantificar os osteoclastos presentes no alvéolo durante o tratamento da alveolite seca com a fibra PCL/OTC, mediante a coloração da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOFIBRA

A fase de preparo e caracterização das nanofibras foi realizada no Instituto de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais). A policaprolactona (PCL), com um peso molecular de 43.000 - 50.000 kDa, foi comprado da Polyscience Inc. (Warrington, PA, USA). O diclorometano (DCM), metanol (MeOH) e o cloridrato de oxitetraciclina foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos os reagentes foram de grau analítico (grau de pureza elevada) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Propriedades físico-químicas dos componentes

	Cloridrato de Oxitetraciclina^a	Policaprolactona^b	Caprolactona^c
Fórmula molecular	$C_{22}H_{25}ClN_2O_9$	$[C_6H_{10}O_2]_n$	$C_6H_{10}O_2$
Estrutura molecular			
Massa molar	496,897 g/mol	43000 - 50000 g/mol	114,144 g/mol
Ponto de fusão	184,5 °C	60 °C	-1.5 °C
Ponto de ebulição	-	-	237 °C
Densidade	1,63 g/cm ³ (20 °C)	-	1,07 g/cm ³

^aNational Center for Biotechnology Information (2004b); ^bPolysciences Inc (2013);

^cNational Center for Biotechnology Information (2004a)

4.1.1 Processo de eletrofiação

Durante esta fase, os parâmetros utilizados no estudo de Karuppuswamy et al. (2015) foram seguidos como base e adaptados. Duas fibras foram preparadas pelo processo de eletrofiação, uma contendo o polímero policaprolactona com cloridrato de oxitetraciclina (PCL/OTC) e outra contendo unicamente o polímero PCL para ser utilizada como controle nos testes *in vivo*.

Para a elaboração da fibra PCL/OTC, em primeiro lugar foi preparada a solução polimérica dissolvendo 1 g de PCL em 10 mL do solvente diclorometano/metanol previamente preparado na proporção de 7:3 (v/v). A solução foi agitada a temperatura ambiente até a completa dissolução do polímero. Posteriormente 15 mg do antimicrobiano OTC foi acrescentado na solução polimérica. A mistura foi mantida sob agitação constante até o momento em que foi colocada na seringa do equipamento de eletrofiação. Desta forma obtivemos fibras contendo 14,78 µg de OTC/ mg de fibra:

$$\text{Peso total} = 1000 \text{ mg PCL} + 15 \text{ mg OTC} = 1015 \text{ mg}$$

$$\text{OTC/mg fibra} = (15 \times 1) / 1015 = 0,01478 \text{ mg OTC} = 14,78 \text{ µg OTC/mg fibra}$$

O sistema de eletrofiação foi montado utilizando-se uma fonte de alta tensão (Gamma High Voltage Research ES40), uma bomba de infusão que controla a velocidade de bombeamento da solução (Harvard Apparatus PHD 2000) e um coletor de fibras (placa metálica). A bomba de infusão foi acoplada a uma seringa contendo 8 mL da solução polimérica preparada previamente. A fonte de alta voltagem foi conectada à cânula da seringa e ao coletor das fibras. Todo o equipamento foi coberto com papel escuro para evitar que a solução fosse exposta à luz e ocorresse oxidação do fármaco. A distância entre a ponta da cânula e a superfície do coletor foi de 15 cm, a velocidade de bombeamento de 5 mL/h e a voltagem de 20 kV (Figura 4.1). O processo foi acompanhado por microscopia óptica e pelo aspecto do material observado no coletor. Após a eletrofiação, as fibras (Figura 4.2) foram armazenadas em embalagem plástica escura.

Figura 4.1 – Sistema de eletrofiação (UFMG) e parâmetros de produção das fibras

Fonte: A autora

Nanofibras contendo apenas o polímero PCL foram preparadas pelo mesmo método para comparação dos resultados durante os testes biológicos.

Figura 4.2 – Aspecto da nanofibra no início e fim da eletrofiação

Fonte: A autora

a) primeiras nanofibras depositadas sobre a placa coletora, b) aspecto macroscópico final do filme nanofibrilado de PCL, após o depósito de várias camadas de nanofibras

4.1.2 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia da superfície e o diâmetro das fibras foram analisados com microscopia eletrônica de varredura (MEV). As nanofibras foram imobilizadas no porta-amostras e metalizadas com uma camada de 5 nm de ouro. As análises foram realizadas em alto vácuo com uma tensão de aceleração do feixe de elétrons de 20 kV em microscópio FEG - Quanta 200 FEI (FEI Company, Hillsboro, OR).

4.1.3 Perfil de liberação

O perfil de liberação do princípio ativo OTC incorporado nas nanofibras foi avaliado em triplicatas (Monteiro et al., 2017). Vinte mg de fibra foram depositados em Eppendorfs contendo 1 mL de tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4). Estes frascos foram colocados em incubadora à 37 °C e rotação de 50 rpm. Em intervalos de tempo predeterminados (entre 0 e 350 h), as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado para análise. Em seguida o mesmo volume de solução tampão PBS foi adicionado em cada frasco para manter o volume inicial da solução, e as amostras foram incubadas novamente sob as mesmas condições. A liberação de OTC foi determinada com espectrofotômetro UV-VIS a 475 nm (Thermo Scientific, USA), de acordo com a curva de calibração do fármaco (realizada previamente com soluções de OTC pura, em concentrações conhecidas).

4.2 TESTE MICROBIOLÓGICO

Esta fase do estudo foi realizada na Faculdade de Odontologia da UFMG (Laboratório de Pesquisa da Profa. Maria Esperanza Cortés). A fibra polimérica sem fármaco (PCL) e a fibra carregada com OTC (PCL/OTC) foram testadas em um biofilme contendo seis cepas bacterianas de interesse odontológico: *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) ATCC 49417, *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) ATCC

49046, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) ATCC 25586, *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*) ATCC 23834, *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*) ATCC 10557 e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) ATCC 29522. Todas as cepas foram provenientes da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ).

Para iniciar, os líófilos bacterianos foram reidratados em caldo Brain Heart Infusion (Himedia, Mumbai, India). Para a cultura de *A.a*, este foi suplementado com 1% de hemina e 1% de menadiona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As bactérias permaneceram em crescimento durante 48 h a 37 °C em estufa bacteriológica. *S. sanguis* e *E. corrodens* cresceram em ambiente microaerófilo, pelo qual foram colocadas em uma jarra de anaerobiose com uma vela acesa no interior para remoção parcial de oxigênio. *F. nucleatum*, *A.a.*, *P. intermédia* e *P. gingivalis* cresceram em ambiente anaeróbio dentro de uma jarra de anaerobiose que foi conectada a uma bomba a vácuo, para remoção total do oxigênio interno, e preenchida com 10% de CO₂ e 90% de nitrogênio.

Após o período crescimento, foi preparado o biofilme bacteriano pela introdução de uma alíquota (240 µL) do meio de cultura de cada uma das bactérias mencionada acima, em meio de cultura Mueller Hinton (Difco, Detroit, MI, USA). A quantidade de meio de cultura Mueller Hinton foi suficiente (aproximadamente 900 µL) para atingir uma absorbância em torno de 0,08, observada no espectrofotômetro Spectrumbab 22PC (Spectrum Laboratories Inc., Houston, TX, USA) a 625 nm. Uma absorbância entre 0,08 e 0,13 correspondente a 0,5 na escala de McFarland (equivalente a 1x10⁸ células/mL) (Cruz Olivo et al., 2017).

Em seguida, 50 µL deste biofilme misto foram colocados em 35 poços de uma microplaca de 96 poços adicionados a 50 µL de caldo Mueller Hinton. As nanofibras PCL e PCL/OTC foram cortadas em espécimes quadrados de 5 mm², contendo aproximadamente 6,6 µg de oxitetraciclina cada um. Dois destes espécimes foram colocados em cada poço, obtendo uma quantidade de ≈13,2 µg de OTC/poço (132 µg/mL). As amostras foram testadas em triplicatas. Cinco poços com biofilme e sem nenhuma fibra também foram acrescentados na placa como controle de crescimento (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Microplaca contendo o biofilme em contato com as nanofibras (triplicata)

Fonte: A autora

Cada poço da microplaca contém: biofilme misto, caldo Mueller-Hinton e as nanofibras de policaprolactona pura (PCL) e com oxitetraciclina (PCL/OTC). ● Controle de crescimento

Após os tempos de contato predeterminados (1, 4, 24, 30 e 48 h), alíquotas de cada poço (40 μ L) foram removidas e colocadas na primeira coluna de outra microplaca de 96 poços (uma placa para cada amostra da triplicata em cada tempo de análise). A partir da amostra na primeira coluna, foi feita uma diluição seriada até a décima coluna da microplaca. A continuação, 10 μ L da primeira, segunda, quarta, sexta, oitava e décima coluna foram semeadas em placas de Petri com Agar Mueller Hinton (Difco, Detroit, MI, USA), previamente divididas em seis partes (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Diluição das alíquotas e semeadura em placa de Petri

Fonte: A autora

Processo de diluição das alíquotas obtidas após os tempos de contato do biofilme com as nanofibras e semeadura em seis partes da placa de Petri, correspondentes às seis diluições

As placas de Petri foram incubadas durante 24 h e após este tempo, o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi contada (Tonglairoum et al., 2016). A porcentagem de colônias remanescentes foi obtida a partir do controle de crescimento, equivalente a 100%.

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Este experimento prospectivo foi realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e obteve aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais (Anexo A, B e C). Foram utilizados 72 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) machos, pesando entre 250-350 gramas. Os animais foram alimentados com ração sólida (triturada no pós-operatório) e água “*ad libitum*”, e acondicionados em gaiolas forradas com maravalha. O ambiente permaneceu com luz controlada com ciclo claro-escuro de 12 horas e a 21°C no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP. Foi realizada a extração de um molar inferior e a indução de alveolite seca (AS). Posteriormente os animais foram distribuídos em três grupos (n=24) segundo o tratamento que iriam receber:

- ALV → Controle positivo: Alvogyl® (Septodont, Saint Maur des Fosses, França);
- PCL/OTC → Alvéolo preenchido com nanofibra de PCL com oxitetraciclina;
- PCL → Alvéolo preenchido com nanofibra de PCL sem OTC.

Previamente à cirurgia, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (85 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Todos os animais foram submetidos à exodontia de primeiro molar inferior direito utilizando instrumento de Hollembach para luxação e avulsão do dente (Figura 4.5). Após a avulsão, os alvéolos das raízes mesial e distal foram irrigados com 0,1mL de solução de epinefrina 1:1000, com o intuito de evitar a formação de coágulo. Após a cirurgia, todos os animais receberam o analgésico paracetamol na dose de 200 mg/Kg dissolvido na água disponível no bebedouro.

Figura 4.5 – Exodontia de primeiro molar inferior de rato

Fonte: A autora

a) Infiltração de anestésico local na área cirúrgica, b) luxação do molar com Hollembach, c) alvéolo após a remoção do dente.

No dia 2 após a cirurgia, confirmada a ausência de coágulo, foi realizada nova anestesia para aplicação dos fármacos. No caso das nanofibras, um disco de aproximadamente 5 mm de diâmetro foi condensado nos alvéolos mesial e distal, com ajuda de cureta de dentina. No 7º, 14º ou 21º dia após a exodontia (8 ratos por tempo) foi realizado o procedimento de eutanásia em câmara de CO₂ para remoção do fragmento de mandíbula da região do dente extraído (Viera, 2016).

As amostras obtidas foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% (pH 7,4) durante 30 horas e descalcificadas em E.D.T.A. 4,13% durante seis semanas (troca do líquido: 3 vezes por semana). Após a descalcificação, as peças foram desidratadas, incluídas em parafina e cortadas com espessura de 6 µm. Três cortes de cada animal foram montados em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e corados com hematoxilina-eosina. Um histologista experiente, de forma cega, avaliou os cortes histológicos em microscópio de luz com aumento de 2,5 a 200x, considerando a morfologia tecidual quanto à presença de coágulo sanguíneo e infiltrado inflamatório, proliferação de tecido de granulação, tecido necrótico, presença de bactérias e síntese de matriz óssea para descrição histomorfológica.

Para a avaliação histomorfométrica, fotos de todas as lâminas foram adquiridas utilizando um microscópio Leica DM 2500 com câmera digital e o software Leica Application Suite V.4.1 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), no aumento de 2,5x.

Posteriormente, cada foto foi cortada com um tamanho padrão (5,5 x 9 cm), de tal forma que unicamente o alvéolo distal foi capturado nesta área (Adobe Photoshop C64, Adobe Systems Incorporated, San José, USA). Finalmente foi utilizado o software WCIF ImageJ (Bethesda, USA) para delimitação da área de interesse (ferramenta Freehand) e mensuração da mesma em μm^2 (Figura 4.6).

Figura 4.6 – Processamento das fotografias das lâminas histológicas

Fonte: A autora

a) Fotografia inicial da lâmina (aumento 2,5x), b) delimitação da área que engloba o alvéolo distal, c) mensuração da área de neoformação óssea (WCIF ImageJ)

Foram quantificadas as seguintes áreas de interesse:

- Tecido conjuntivo (7º e 14º dias)
- Neoformação óssea (14º e 21º dias)

Os resultados foram expressos em porcentagem da área de interesse em relação à área total da foto ($4110349,67 \mu\text{m}^2$). Os resultados foram analisados com o teste de ANOVA 1 fator de variação e Tukey ou com o teste de Kruskal Wallis e Dunn, de acordo à homogeneidade e normalidade dos resultados avaliados com o teste de Shapiro Wilk. O valor de alfa para todos os testes foi de 5% (GraphPad Prism 6, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE OSTEOCLASTOS

A densidade de osteoclastos no alvéolo dentário em processo de reparo foi avaliada através da marcação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), proteína altamente expressa em osteoclastos e relacionada à sua atividade de reabsorção óssea (Kirstein et al., 2006). Para isto, dois cortes de cada animal (n= 5 animais /grupo) foram montados em lâminas silanizadas. Estas lâminas foram desparafinadas e reidratadas com banhos sequencias de xilol e álcool etílico. Posteriormente foram submersas na solução TRAP (descrita a seguir) e colocadas em equipamento de banho-maria (37 °C) dentro de uma jarra de Coplin.

Preparação da solução TRAP:

Em um tudo de ensaio foram misturados 0,5 mL de solução granada permanente GBC e 0,5 mL de solução de nitrito de sódio. A mistura permaneceu em repouso durante 2 minutos antes de ser depositada em um béquer contendo 45 mL de água pré-aquecida (37 °C). Finalmente foram acrescentados 0,5 mL de solução de naftanol e 2 mL de solução de acetato neste béquer. O kit de soluções para a coloração TRAP foi comprado da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Uma vez que a solução interna da jarra de Coplin atingiu 37 °C, foi adicionado 1 mL de solução de tartaratos. As lâminas permaneceram em incubação no banho-maria durante 2h45. Passado este tempo, foram lavadas com abundante água destilada e, em seguida, foi realizada uma contracoloração com hematoxilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 10 min. Após este tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas com concentrações crescentes de álcool e xilol e montadas com lamínula.

Cinco campos microscópicos consecutivos (aumento de 40x) da parede mesial do alvéolo distal foram fotografados para realizar a contagem de osteoclastos (duas seções por animal). Osteoclastos foram identificados como células multinucleadas TRAP-positivas (coloração avermelhada, Figura 4.7) e sua contagem foi feita de forma cega (Pazzini et al., 2017).

Figura 4.7 – Células TRAP-positivas

Fonte: A autora

Aparência do tecido corado pela reação de TRAP, mostrando os osteoclastos (setas) junto às trabéculas ósseas (aumento 40x). Barra: 50 µm

Os resultados foram expressos em número de células por mm² e foram analisados com o teste de ANOVA 1 fator de variação e Tukey ou com o teste de Kruskal Wallis e Dunn, de acordo com a normalidade dos resultados avaliados com o teste de Shapiro Wilk. O valor de alfa para todos os testes foi de 5% (GraphPad Prism 6, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As Figuras 5.1 e 5.2 apresentam micrografias para as fibras de PCL puro e de PCL com oxitetraciclina (PCL/OTC), respectivamente.

Figura 5.1 – Imagens de MEV das nanofibras poliméricas de policaprolactona

Fonte: A autora

MEV para as nanofibras de PCL puro obtidas por eletrofiação. Micrografias com magnificação de 5.000x (a) e 20000x (b)

Figura 5.2 – Imagens de MEV das nanofibras poliméricas de PCL com oxitetraciclina

Fonte: A autora

MEV para as nanofibras de PCL com oxitetraciclina obtidas por eletrofiação. Micrografias com magnificação de 5.000x (a) e 20000x (b)

Observa-se nas micrografias que o processo de eletrofiação foi eficaz para obter fibras de PCL puro e de PCL com oxitetraciclina de diâmetro interno nanométrico em torno de 300 nm, e com orientação randômica em camadas. Porém, observa-se que essas fibras possuem morfologia multiforme, algumas com vários feixes unidos, o que pode causar o acúmulo de fármaco em certas microáreas. Nota-se que a adição de oxitetraciclina ao polímero não prejudicou a formação e a morfologia das nanofibras.

5.2 PERFIL DE LIBERAÇÃO

As Figuras 5.3 e 5.4 apresentam as curvas de porcentagem de liberação cumulativa de oxitetraciclina das fibras de PCL. A curva mostra que em 350 horas as fibras liberaram 100% de oxitetraciclina para o meio constituído de PBS com pH 7,4.

Figura 5.3 – Liberação cumulativa de OTC dispersa em fibras de PCL (0 – 350 h)

Fonte: A autora

Nas primeiras oito horas de experimento, uma liberação correspondente a 70% da quantidade total do fármaco pode ser observada. Esta liberação inicial pode estar relacionada ao efeito de explosão do sistema.

Figura 5.4 – Liberação cumulativa de OTC dispersa em fibras de PCL (0 – 24 h)

Fonte: A autora

5.3 TESTE MICROBIOLÓGICO

Na figura 5.5 se observa que a oxitetraciclina dentro de uma nanofibra polimérica de PCL, inibiu o crescimento do biofilme a partir de 4 h de incubação. A porcentagem de unidades formadoras de colônias teve seu valor mínimo após 30 h.

Figura 5.5 – Porcentagem de colônias bacterianas remanescentes após vários tempos de incubação do biofilme misto na presença de nanofibras

Fonte: A autora

Na hora 48, o crescimento bacteriano se mostrou ligeiramente superior à hora

30, mostrando uma possível redução da liberação da oxitetraciclina. O grupo de fibras poliméricas sem o fármaco não inibiu o crescimento bacteriano em nenhum dos tempos de avaliação ($\approx 100\%$ de crescimento) (Figura 5.5).

5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Setenta e dois ratos foram utilizados para este experimento. Quatro animais foram excluídos devido à fratura do ápice radicular durante a exodontia e impossibilidade de remoção dos fragmentos. Mais 2 amostras foram excluídas pela má qualidade do corte histológico e processamento da lâmina.

Alvogyl® (controle positivo)

No 7º dia, o grupo controle positivo apresentou restos de material exógeno, principalmente na porção cervical do alvéolo dentário, e intenso infiltrado inflamatório ao redor deste material. Tecido de granulação com abundantes vasos sanguíneos foi visto nas regiões não preenchidas pelo material obtundente e não foi possível observar formação de matriz óssea ou reepitelização do tecido sobre o alvéolo. Também se evidenciaram regiões de necrose tecidual e presença de bactérias na superfície, além de osteoclastos ao longo da lâmina dura. No dia 14, foi visto um avanço no processo de reepitelização do alvéolo. A presença de restos de material ainda era evidente, com uma grande quantidade de células inflamatórias circundando estes *debris* de coloração acastanhada. Em certas regiões, a matriz de tecido conjuntivo foi observada com aparência de fibrose, e não mais como tecido de granulação. Pouca formação óssea foi evidenciada exclusivamente na região apical do alvéolo. No 21º dia, a reepitelização do alvéolo se encontrava praticamente completa. Mesmo que em menor quantidade, em certos animais ainda era possível observar a presença de material exógeno na porção cervical do alvéolo (Figura 5.6). Notou-se fibrose no alvéolo e ocorreu pouca formação óssea nos terços médio e apical, com trabéculas ainda finas e espaçadas.

Nanofibra de policaprolactona

O grupo tratado com nanofibras de PCL pura também apresentou restos de material e uma grossa camada de tecido inflamatório no 7º dia. Tecido conjuntivo com numerosos vasos sanguíneos foi visto especialmente no terço apical e médio do alvéolo e ocorreu formação de tecido epitelial. Notaram-se pequenos depósitos de matriz óssea na região apical e vários osteoclastos estavam presentes ao longo da lamina dura. Aos 14 dias, o grupo PCL apresentou o processo de epitelização completo, com restos de material acima do epitélio. A região cervical mostrava tecido conjuntivo e poucas células inflamatórias na região subepitelial. No terço médio foram vistas áreas de formação de trabéculas ósseas finas e tecido conjuntivo, e no terço apical, trabéculas ósseas mais grossas e confluentes. Aos 21 dias, este grupo apresentou quase dois terços do alvéolo preenchidos por trabéculas ósseas, contendo numerosos osteócitos e vasos sanguíneos no seu interior. A reepitelização foi completa, com a presença de numerosas camadas de células epiteliais (Figura 5.6).

Nanofibra de policaprolactona com oxitetraciclina

No 7º dia, o grupo que recebeu a nanofibra PCL/OTC apresentou a maior parte do alvéolo preenchida por tecido de granulação e observou-se o início da epitelização sobre o alvéolo. Houve presença de material exógeno superficial e células inflamatórias nas proximidades. O terço apical apresentou finas trabéculas de tecido ósseo com grande quantidade de osteoblastos ao redor. Alguns osteoclastos foram vistos na lâmina dura. No 14º dia, este grupo apresentou trabéculas ósseas chegando até o terço cervical. Nesta região elas eram finas e espaçadas, com tecido conjuntivo entre elas. No terço médio as trabéculas eram confluentes com abundantes osteoblastos ao redor, e no terço apical, mais grossas, confluentes e com osteócitos. O epitélio estava completo, com alguns restos de material acima. Em vários animais já não era possível identificar os limites do alvéolo. Aos 21 dias, o grupo PCL/OTC apresentou um tecido ósseo mais maduro. O terço cervical mostrou trabéculas ósseas confluentes, quase sem presença de tecido conjuntivo. No terço médio e apical foram vistas trabéculas mais grossas, confluentes e cheias de osteócitos. A figura 5.6 apresenta cortes histológicos representativos de cada grupo de tratamento, em cada tempo de avaliação.

Figura 5.6 – Cortes histológicos representativos de cada grupo

Fonte: A autora

Aspecto histológico dos terços apical, médio e início do terço cervical dos alvéolos tratados com Alvogyl® (ALV), nanofibra de policaprolactona (PCL) ou nanofibra de policaprolactona com oxitetraciclina (PCL/OTC) no 7º, 14º e 21º dias após a exodontia de molar de rato (n= 8 /tempo/grupo)

A tabela 5.1 e a figura 5.7 mostram a porcentagem de tecido conjuntivo presente no alvéolo dentário, no 7º e 14º dias de avaliação. O grupo PCL/OTC apresentou a maior porcentagem de tecido conjuntivo no 7º dia; porém, no 14º dia, este grupo apresentou menor quantidade de tecido conjuntivo, em comparação aos outros grupos. A tabela 5.2 e a figura 5.8 revelam a porcentagem de matriz óssea formada dentro do alvéolo no 14º e 21º dias de avaliação. A maior porcentagem de osso neoformado foi observada no grupo PCL/OTC, nos dois tempos de avaliação.

Tabela 5.1 – Porcentagem de tecido conjuntivo no alvéolo

	Alvogyl		PCL		PCL/OTC	
	Média ± DP	Mediana (AIQ)	Média ± DP	Mediana (AIQ)	Média ± DP	Mediana (AIQ)
7º dia	16,8 ± 7,7	18 (16,2)	24,2 ± 5,9	26,3 (12,1)	36,6 ± 3,4	36,3 (6,1)
14º dia	26,8 ± 4,2	26,9 (6,51)	22,8 ± 6,6	22,5 (9,18)	18,9 ± 4	18,9 (6,35)
p-valor	0,0005 [†]		0,473 [‡]		<0,0001 [†]	

Fonte: A autora

Diferença ($\alpha = 5\%$) entre os tempos de avaliação dentro de cada grupo, estimada com o teste t de student[†] ou Mann-Whitney[‡], de acordo à sua normalidade e homogeneidade

DP: desvio padrão; AIQ: amplitude interquartil

Figura 5.7 – Box plot da porcentagem de tecido conjuntivo

Fonte: A autora

Box plot da porcentagem de tecido conjuntivo presente nos alvéolos tratados com Alvogyl® (ALV), nanofibra de policaprolactona (PCL) e de policaprolactona com oxitetraciclina (P/OTC). Letras iguais representam diferença significativa entre grupos dentro do mesmo tempo de avaliação. Para **a**, $p < 0,0001$; e para **b**, $p = 0,0001$ pelo Teste de Kruskal-Wallis e Dunn. Para **c**, $p = 0,0007$ pelo Teste de ANOVA e Tukey

Tabela 5.2 – Porcentagem de osso neoformado no alvéolo

	Alvogyl		PCL		PCL/OTC	
	Média ± DP	Mediana (AIQ)	Média ± DP	Mediana (AIQ)	Média ± DP	Mediana (AIQ)
14º dia	11,9 ± 4,6	13,5 (8,9)	12,1 ± 5,5	10,2 (2)	23,2 ± 4,9	22,1 (7,4)
21º dia	19,6 ± 3,1	18,8 (4,6)	22,5 ± 7,5	24,8 (15,3)	52,1 ± 9,1	52,8 (16,7)
p-valor	<0,0001 [†]		<0,0001 [‡]		<0,0001 [†]	

Fonte: A autora

Diferença ($\alpha= 5\%$) entre os tempos de avaliação dentro de cada grupo, estimada com o teste t de student[†] ou Mann-Whitney[‡], de acordo à sua normalidade e homogeneidade

DP: desvio padrão; AIQ: amplitude interquartil

Figura 5.8 – Box plot da porcentagem de tecido ósseo

Fonte: A autora

Box plot da porcentagem de tecido ósseo presente nos alvéolos tratados com Alvogyl® (ALV), nanofibra de policaprolactona (PCL) e nanofibra de policaprolactona com oxitetraciclina (P/OTC). Letras iguais representam diferença significativa entre grupos dentro do mesmo tempo de avaliação (Testes de Kruskal-Wallis e Dunn). Para **a**, $p=0,0002$; para **b**, $p=0,0001$; para **c** e **d**, $p<0,0001$

5.5 IDENTIFICAÇÃO DE OSTEOCLASTOS

A tabela 5.3 apresenta a quantidade de osteoclastos presentes nos alvéolos dentários tratados com Alvogyl®, PCL ou PCL/OTC e corados pela reação de TRAP. Observa-se que todos os grupos de tratamento apresentam uma quantidade maior de osteoclastos no 7º dia, em comparação aos outros dois tempos de avaliação. O grupo PCL/OTC apresenta uma quantidade significativamente menor de osteoclastos em relação aos outros grupos, nos três tempos experimentais.

Tabela 5.3 – Quantificação de células TRAP—positivas (células/mm²)

Grupo		7º dia	14º dia	21º dia	Teste intragrupo
Alvogyl	Média ± DP	77,5 ± 9,6 ^{a,†,‡}	24,1 ± 4,3 [†]	30,1 ± 10,3 ^{a,b,‡}	ANOVA e Tukey
	Mediana (AIQ)	76,7 (18,1)	24,1 (6) ^a	27,1 (17,3)	
	n	8	10	10	
PCL	Média ± DP	66,6 ± 24,8 ^b	20,7 ± 1,9	19,9 ± 9,1 ^{a,c}	Kruskal-Wallis e Dunn
	Mediana (AIQ)	73,7 (51,2) ^{†,‡}	21,1 (2,3) ^{b,†}	18,1 (17,3) [‡]	
	n	8	8	8	
PCL/OTC	Média ± DP	47 ± 8,2 ^{a,b}	12 ± 1,6	9,9 ± 4,3 ^{b,c}	Kruskal-Wallis e Dunn
	Mediana (AIQ)	45,1 (13,6) ^{†,‡}	12 (0) ^{a,b,†}	9 (9) [‡]	
	n	10	8	10	
Teste intergrupo		ANOVA e Tukey	Kruskal-Wallis e Dunn	ANOVA e Tukey	

Fonte: A autora

Letras iguais sobrescritas apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos (intergrupo; mesma coluna). Símbolos iguais sobrescritos apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre tempos do mesmo tratamento (intragrupo; mesma fila)

DP: desvio padrão; AIQ: amplitude interquartil

6 DISCUSSÃO

Embora a cavidade oral esteja colonizada por numerosos microrganismos, os procedimentos envolvendo o osso alveolar usualmente não trazem complicações. Entretanto, em certos casos, a interação entre as condições sistêmicas do paciente, o metabolismo ósseo e outros fatores locais, pode levar a processos inflamatórios e infecciosos no osso (Hupp et al., 2014). Uma destas complicações é a alveolite seca, quadro altamente doloroso que surge no alvéolo após a extração dentária, e ainda não possui um tratamento estabelecido (Bowe et al., 2011-2012; Sigron et al., 2014).

O principal objetivo deste estudo foi desenvolver um material alternativo para o tratamento da alveolite seca que, de preferência, também tivesse potencial para ser aplicado futuramente em outras doenças infecciosas do osso. Sabendo que o uso local de antibióticos tem a vantagem de reduzir os efeitos colaterais associados à sua administração sistêmica (Dashti et al., 2010), surgiu a possibilidade de desenvolver um produto de aplicação tópica, que liberasse o princípio ativo lentamente, aumentando a sua biodisponibilidade na região intra-alveolar. O sistema de liberação escolhido foi um nanofilme polimérico. Estes dispositivos possuem características que os tornam excelentes materiais de uso tópico (Liu et al., 2017) tais como, a alta porosidade e flexibilidade, boa área de superfície em relação ao volume, boas propriedades mecânicas (Huang et al., 2003; Tonglairoum et al., 2016) e propriedades biológicas propícias para a regeneração tecidual (Kishan; Cosgriff-Hernandez, 2017). Além disso, os nanofilmes podem ser construídos a partir de materiais reabsorvíveis que não precisam ser removidos em procedimentos clínicos adicionais (Huang et al., 2003), simplificando o tratamento e aumentando a adesão do paciente.

A poli (ϵ -caprolactona) (PCL) foi utilizada como matriz reabsorvível para o transporte do antibiótico oxitetraciclina. Nanofibras de policaprolactona são bastante conhecidas na área biomédica graças a sua disponibilidade, preço relativamente baixo e possibilidade de sofrer vários tipos de modificações (Malikmammadov et al., 2017). Estas fibras já foram empregadas com sucesso para a liberação de antimicrobianos como a doxiciclina (Ramirez-Agudelo et al., 2018), ciprofloxacino (Dzikowski et al., 2017) e vancomicina (Jang et al., 2015), apresentando perfis de liberação favoráveis.

A PCL também foi empregada na engenharia tecidual, especialmente na regeneração óssea. Estudos têm demonstrado que a PCL tem a capacidade de mimetizar arcabouços de matriz extracelular óssea graças a sua porosidade e resistência mecânica (Yoshimoto et al., 2003; Gao et al., 2016; Tham et al., 2016), aumentar a formação óssea na superfície de implantes de titânio revestidos com este polímero (Khandaker et al., 2017) e ajudar na regeneração tecidual, inclusive em defeitos articulares mistos (osteocondrais) (Shao et al., 2006). Estas características da PCL sugeriram que o polímero poderia ser um material adequado para o tratamento de infecções e defeitos ósseos. Além disso, foi verificado que o monômero da PCL, a caprolactona, pode inibir a atividade fibrinolítica da plasmina humana (Auerswald; Doleschel, 1967), atividade que pode estar aumentada na alveolite seca (Birn, 1972a).

No presente estudo, observamos que o processo de eletrofiação possibilitou a obtenção de uma nanofibra polimérica de PCL com o antibiótico oxitetraciclina (OTC) incorporado nela (PCL/OTC). A malha PCL/OTC mostrou uma morfologia multiforme quando observada na microscopia eletrônica, prevalecendo o aspecto fibrilar com distribuição randômica e união de feixes em algumas áreas. É conhecido que a incorporação de fármacos em soluções de polímero pode afetar significativamente as propriedades das fibras eletrofiadas (Goonoo et al., 2014). Contudo, no presente estudo foi observado que esta morfologia multiforme já estava presente na fibra de PCL pura (Figura 5.1), não tendo sido modificada pela presença do antibiótico (Figura 5.2). Assim mesmo, não houve mudança visível do diâmetro das fibras. Este resultado difere de outros estudos que incorporaram fármacos em fibras de PCL, como o de Gao et al. (2016) onde foi vista uma diminuição do diâmetro das fibras de PCL após a incorporação do peptídeo derivado da BMP-7 e hidroxiapatita, e do estudo de Shahi et al. (2017), no qual houve um aumento no diâmetro das fibras de PCL/PLA/gel após a incorporação de cloridrato de tetraciclina. Com esta morfologia, a nanofibra PCL/OTC mostrou relevante atividade biológica, como comprovado nos testes *in vitro* e *in vivo*.

Também foi observado que nas primeiras oito horas ocorreu uma liberação correspondente a 70% da quantidade total do fármaco (Figura 5.4), o que pode ser resultante do efeito de explosão do sistema. O efeito de explosão é um fenômeno encontrado em muitos sistemas de liberação controlada, no qual acontece uma

entrega inicial elevada da droga, antes que a taxa de liberação atinja um perfil estável. Este efeito não é visto sempre como uma desvantagem, já que existem tratamentos nos quais é necessário proporcionar uma dose inicial de ataque, seguida por uma liberação mais lenta e prolongada do fármaco (Huang; Brazel, 2001; Zong et al., 2002).

Os resultados do estudo de Zahedi et al. (2011) trazem informações interessantes sobre a relação entre o perfil de liberação e a atividade antimicrobiana de fibras eletrofiadas. Eles produziram nanofibras de várias misturas poliméricas (PCL, PLA e PCL/PLA) carregadas com tetraciclina, e observaram que o efeito antibacteriano era positivo unicamente nas fibras que permitiam uma liberação de pelo menos 50% do fármaco total dentro das primeiras 8 h, sugerindo mais uma vez que o efeito de explosão não é uma desvantagem.

Acredita-se que a explosão inicial esteja relacionada à droga na superfície das fibras, a qual é liberada diretamente, sem ser desacelerada pelos fenômenos de difusão (Stanzione et al., 2013). No presente trabalho, este alto efeito de explosão pode estar relacionado ao acúmulo de fármaco na superfície, gerado pelas gotas presentes na extensão das nanofibras. Outros estudos realizados com diferentes fármacos incorporados em dispositivos de policaprolactona também mostraram este efeito. Stanzione et al. (2013) desenvolveram nanofibras de PCL carregadas com o antitumoral titanoceno, observando um efeito de explosão inicial, seguido por um longo período de liberação controlada. Com o uso da PCL na forma de micelas com cetoprofeno, também foi observado este efeito de explosão em um primeiro momento, e posteriormente um período de liberação do fármaco de 10 a 60 horas (Tiwari; Prabakaran, 2010). Nanopartículas de PCL carregadas com curcumina apresentaram o mesmo perfil de liberação no estudo de Kasinathan et al. (2016).

Também foi verificado que após o efeito de explosão, ocorreu uma liberação lenta e prolongada da oxitetraciclina. Aproximadamente 95% do total do fármaco foi liberado até o quinto dia de tratamento (Figura 5.3), proporcionando uma desinfecção inicial importante (verificado no teste microbiológico, Figura 5.5) e tempo para que o organismo possa voltar ao processo normal de reparo alveolar. Isto sugere que a nanofibra com OTC seria capaz de prevenir ou, pelo menos, reduzir o risco de infecção no tecido ósseo, mesmo quando as condições clínicas fossem favoráveis ao

estabelecimento de um processo infeccioso. Contudo, ajustes nos parâmetros de eletrofiação como a diminuição da velocidade de fluxo e o aumento da viscosidade da solução polimérica (Goonoo et al., 2014) poderiam diminuir a presença de gotas nas fibras, padronizando de forma mais acurada o perfil de liberação do fármaco, e ainda mantendo uma importante liberação inicial.

A taxa de degradação também é uma propriedade importante do material reabsorvível, já que esta pode influenciar a liberação do fármaco, assim como a regeneração do tecido onde será inserido. A taxa de degradação ideal é aquela que se assemelha à taxa de regeneração do tecido. Uma degradação mais lenta dificulta o crescimento do tecido, e uma mais rápida, leva à perda de conexão entre o tecido e o arcabouço polimérico, resultando no atraso do processo de cicatrização (Malikmammadov et al., 2017). Estudos *in vitro* mostram que o tempo de degradação da policaprolactona é longo (aproximadamente 24 meses até a reabsorção total) e, portanto, costuma ser utilizada principalmente na substituição de tecidos rígidos do corpo ou em tratamentos que levam um longo período de tempo. Porém, também foi observado que a PCL é degradada muito mais rapidamente *in vivo*, devido à degradação enzimática do polímero por lipases, que se soma à degradação hidrolítica (Zeng et al., 2004; Bölgen et al., 2005).

Pensando unicamente no tratamento da alveolite seca, não existiria a necessidade de manter o material dentro do alvéolo por um período prolongado, unicamente até o retorno do processo normal de reparo alveolar (aproximadamente 10 dias) (Fazakerley; Field, 1991; Aleman Navas; Martinez Mendoza, 2010). Considerando exclusivamente o tempo de degradação, a nanofibra de PCL não seria o material obtundente mais adequado porque poderia ocupar o espaço físico do tecido de granulação (e futura matriz óssea) durante muito tempo. Não obstante, as propriedades mecânicas da PCL são favoráveis para oferecer um bom tamponamento mecânico do alvéolo seco (característica esperada em um curativo intra-alveolar) e estas nanofibras podem funcionar como arcabouços celulares por serem compatíveis com a estrutura do tecido ósseo (Malikmammadov et al., 2017).

Além da degradação própria do polímero, o material obtundente também pode ser eliminado por via alveolar ao longo do tempo. Ao contrário do que acontece com

a maioria de implantes, que precisam permanecer imobilizados e em ambientes fechados, o curativo intra-alveolar se encontra em uma área aberta, e não fica isolado dos movimentos que ocorrem dentro da cavidade oral e da ação da saliva, portanto, sua eliminação mecânica é possível. Ainda, a formação de tecido no alvéolo ocorre predominantemente de apical para cervical (Farina; Trombelli, 2012; Hupp, 2014b), por tanto, com uma direção favorável para que o tecido neoformado possa empurrar o material obtundente, se necessário.

Outros produtos utilizados como materiais obtundentes, como a pasta de óxido de zinco e eugenol e o Alvogyl®, contêm componentes não reabsorvíveis e sua permanência prolongada pode causar atrasos no reparo (Kaya et al., 2011; Wegenast, 2013; Faizel et al., 2015). No presente estudo, a avaliação histológica comprovou que o uso das fibras de PCL não impediu o retorno ao processo normal de cicatrização alveolar (Figura 5.6) nem induziu reações de corpo estranho em ratos. Estudos em animais que possuem alvéolos dentários maiores e, portanto, demoram mais para ser regenerados, podem ser realizados para comprovar a ausência de interferência da PCL e sua degradação no reparo alveolar.

Embora não tenham sido constatados inconvenientes relacionados à degradação das fibras, existe a possibilidade de fazer modificações que aceleram a taxa de degradação como a adição de surfactantes (Zeng et al., 2004), a elevação do pH do meio (Hernández et al., 2013) e a formação de compósitos, blendas e copolímeros (Stanzione et al., 2013; Malikmammadov et al., 2017), ajustando o tempo de degradação do material ao tempo de preenchimento e reparo alveolar que é de 4 a 6 meses (Hupp, 2014b). Do mesmo modo, o uso de uma blenda de polímeros em futuros estudos também poderia aprimorar outras características das fibras, como a sua morfologia e propriedades mecânicas. Um exemplo seria a mistura de polímeros PCL/PLA, onde a incorporação do PLA (ácido polilático) proporcionaria fibras com um tempo de degradação mais curto e propriedades mecânicas melhores do que os arcabouços de PCL pura (Shahi et al., 2017; Yao et al., 2017). Porém, vale ressaltar que ao modificar estes parâmetros, a bioatividade da fibra também pode mudar e, portanto, seria necessário realizar novos testes biológicos.

Outro polímero reabsorvível, o ácido polilático, já foi empregado como curativo intra-alveolar para a prevenção da alveolite seca, mas não obteve sucesso. Moore e Brekke (1990) destacaram 18 casos de complicações (reação de corpo estranho) com o uso de PLA em humanos. Já, Hooley e Golden (1995) observaram que o uso de PLA pode aumentar a ocorrência de AS. Outro estudo mostrou que em alvéolos preenchidos com PLA, células gigantes multinucleadas ainda eram visíveis após 60 dias da inserção do polímero e que a presença de PLA impediu o preenchimento ósseo até o nível da crista óssea (Olson et al., 1982). Além do espaço físico ocupado pelo material e possível contaminação do mesmo, a redução da formação óssea também poderia estar relacionada à queda de pH, causada pelos produtos de degradação do polímero que possuem uma natureza ácida (Ruan et al., 2017) e podem ter gerado problemas de biocompatibilidade (Goonoo et al., 2014).

Por outra parte, os testes microbiológicos demonstraram que a nanofibra polimérica contendo o antibiótico cloridrato de oxitetraciclina (14,8 µg OTC/ mg de fibra) conseguiu inibir o crescimento de mais de 50% das colônias do biofilme misto nas primeiras horas de liberação (Figura 5.5). Isto coincide com o efeito de explosão, observado no teste de liberação, que estaria proporcionando uma potente ação antibacteriana inicial (Zong et al., 2002), seguida por um período de manutenção prolongado (também coincidente com o perfil de liberação), dentro do qual a porcentagem de colônias permanece baixa (<10%), provavelmente, facilitando o controle por parte do sistema imunológico. Também foi possível observar que a nanofibra de PCL pura não teve efeito antibacteriano frente ao biofilme, pelo qual não pode ser atribuído esse efeito ao polímero puro.

A oxitetraciclina é um antibiótico de amplo espectro, porém, seu uso ficou bastante reduzido devido ao surgimento de microrganismos resistentes (Nguyen et al., 2014; Chen et al., 2017). No presente estudo foi visto que a oxitetraciclina dentro das fibras de PCL se mostrou eficaz frente ao biofilme composto por bactérias da cavidade oral (*P. gingivalis*, *P. intermédia*, *F. nucleatum*, *E. corrodens*, *S. sanguis* e *A. actinomycetemcomitans*) na concentração de 132 µg/mL. Este resultado difere do trabalho de Baker et al. (1985) que testaram 133 cepas de bactérias encontradas na boca, e observaram que a maioria delas era moderadamente suscetível ou mesmo resistente à OTC. Este resultado chama a atenção já que biofilmes costumam ser mais

resistentes que as bactérias em estado planctônico (Chai et al., 2007). Uma possível explicação para esta diferença de resultados é que no trabalho de Baker et al. (1985), o antibiótico foi utilizado em concentrações baixas (5 µg/mL) e fora de qualquer sistema de liberação controlada. Além disso, esse estudo foi realizado em uma época em que a circulação de microrganismos resistentes às tetraciclinas era muito alta e, portanto, passaram a ser evitadas. Nos últimos anos tem se observado uma tendência inversa graças às medidas de controle no uso de antibióticos (Chen et al., 2017).

Por outro lado, Chai et al. (2007) testaram a eficácia da oxitetraciclina (50 mg/mL) frente a um biofilme de *Enterococcus faecalis*, bactéria Gram-positiva comensal do sistema digestório. Eles observaram que a OTC conseguiu eliminar 100% das unidades formadoras de colônias no período de 1 h, sendo mais eficaz que outros antibióticos como a ampicilina e a vancomicina. Esta ação inibitória parece ter sido mais rápida que a ação encontrada no nosso estudo, não obstante, é importante lembrar que além de ter usado uma concentração maior de OTC, Chai et al. (2007) não utilizaram um sistema de liberação controlada e, portanto, a totalidade do fármaco agiu desde o momento da sua aplicação. Em um estudo diferente, Bjorvatn et al. (1985) partiram da hipótese de que a hidroxiapatita impregnada com tetraciclinas poderia adquirir um efeito antibacteriano. Ao finalizar o estudo eles verificaram que a exposição em curto prazo de esmalte e dentina às tetraciclinas, dentre elas a oxitetraciclina, pode resultar em uma capacidade antibacteriana duradoura destes tecidos frente a *S. sanguis*.

A escolha da oxitetraciclina foi feita pelo amplo espectro antibiótico, sendo efetiva contra bactérias orais. Ainda destaca-se a atividade anti-metaloproteinases, o que melhoraria o processo de regeneração óssea, e a sua concentração preferencialmente no osso (Cheng et al., 2012). Apesar da atividade satisfatória mostrada pela OTC, também é importante ressaltar que o material em desenvolvimento no presente estudo não deverá ser indicado em pacientes com hipersensibilidade às tetraciclinas (ou ao polímero), mesmo sendo este um material de uso tópico. A literatura mostra relatos de reações de hipersensibilidade às tetraciclinas (principalmente à minociclina) de severidade variada (Lebrun-Vignes et al., 2012), quando administradas por vias tópicas como a intracanal (Kaufman et al.,

2014), dérmica e oftálmica (Rudzki; Rebandel, 1997), e sistêmicas como a via oral (Ogita et al., 2011; Jang et al., 2010; Lan et al., 2016).

Não foram encontrados na literatura, estudos nos quais a oxitetraciclina tenha sido incorporada em nanofibras de policaprolactona ou em outros sistemas de liberação controlada feitos de PCL. Entretanto, nanofibras de PCL contendo outras tetraciclinas apresentaram resultados promissores. Monteiro et al. (2017) observaram que uma nanofibra de PCL carregada com tetraciclina (TTC) também proporcionou um efeito antibacteriano marcante nas primeiras 4 horas frente a *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, inibindo o crescimento de cerca de 90% de colônias, porém, no caso de *A. actinomycetemcomitans*, o efeito permaneceu unicamente durante 24 h, enquanto que em nosso estudo com a OTC, o efeito permaneceu por pelo menos 48 h (Figura 5.5) para o biofilme de patógenos orais. Shahi et al. (2017) também incorporaram TTC em uma nanofibra composta por uma mistura polimérica de PCL, PLA e gelatina, e observaram que esta blenda se mostrou eficaz frente a quatro bactérias presentes na peri-implantite, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia*, sendo que a última resultou ser a mais difícil de inibir. O trabalho de Zahedi et al. (2011) mostrou que fibras de PCL e fibras da blenda PCL/PLA fabricadas com 250 e 500 µg/mL de TTC foram eficazes para inibir o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* em um teste de disco difusão (discos com 7 mm de diâmetro e 1 mg de peso), entretanto, com as informações disponíveis nesse estudo não é possível determinar a concentração de TTC em cada disco, a fim de comparar com o nosso estudo.

O efeito da nanofibra de PCL/OTC sobre o reparo do alvéolo dental foi avaliado, nesta pesquisa, através da análise histológica em modelo experimental em molares de ratos. Por apresentar marcadas diferenças em relação ao alvéolo dentário humano (Merzel; Salmon, 2008), o incisivo não foi escolhido para este estudo *in vivo*. O alvéolo humano leva de 4 a 6 meses para culminar o processo de reparação, com preenchimento ósseo trabecular e medular (Hupp, 2014b). Já no alvéolo de molar de rato, o preenchimento ósseo está quase finalizado aos 21 dias (Vieira et al., 2015). Entretanto, embora existam estas diferenças referentes ao tamanho do alvéolo de molar inferior e ao tempo de reparo, o modelo permite simular os eventos de reparo alveolar em humanos em poucos dias (Rodrigues et al., 2011).

O efeito tecidual da nanofibra foi comparado a aquele proporcionado pela fibra sem antibiótico e pelo controle positivo Alvogyl®, curativo pós-extração conhecido mundialmente, que contém eugenol, iodofórmio e butamben como princípios ativos, além de fibras vegetais como excipientes (Kaya et al., 2011). Já, a comparação entre os eventos de reparo alveolar observados no nosso estudo e em outros estudos da literatura foi dificultada, devido às diferenças nos modelos experimentais de alveolite utilizados, por exemplo, o uso de um dente distinto (geralmente o incisivo), diferentes tempos de avaliação e método de indução de alveolite (de Melo Junior et al., 2002; Cardoso et al., 2011; Rodrigues et al., 2011).

Foi possível visualizar no 7º dia, que os três grupos apresentaram um infiltrado inflamatório inicial, especialmente nas proximidades dos materiais obtundentes (Figura 5.6). Sabe-se que o início do reparo alveolar é marcado por uma fase inflamatória em resposta à agressão tecidual da exodontia, independente da presença de alveolite (Rodrigues et al., 2011). Como era esperado, este infiltrado foi diminuindo ao longo do tempo, entretanto, persistiu por um período mais prolongado no grupo tratado com Alvogyl®. Além da intensa inflamação, este grupo também apresentou a pior taxa de preenchimento do alvéolo com tecido de granulação no 7º dia, possivelmente porque grande parte do mesmo se encontrava ocupado por restos de material (Figura 5.7). No 14º e 21º dias, este mesmo grupo obteve taxas significativamente inferiores de preenchimento ósseo em relação ao grupo que recebeu a nanofibra PCL/OTC (Figura 5.8).

Este atraso no processo de reparo alveolar, causado pela presença do fármaco Alvogyl®, já foi relatada em estudos anteriores. Kaya et al. (2011) compararam o uso do LASER de baixa potência e Alvogyl®, no tratamento de alveolite seca. Seu resultado mostrou que após três dias de tratamento, todos os pacientes do grupo LASER apresentavam grande parte do alvéolo preenchido por tecido conjuntivo, enquanto que no grupo Alvogyl®, pelo menos metade dos pacientes não mostravam sinais do início do processo de reparo e a exposição óssea era maior. Em outro estudo, foi observado que o grupo teste Neocon® (neomicina e benzocaína) promoveu um reparo alveolar mais rápido que o Alvogyl® (Faizel et al., 2015). Da mesma forma, Wegenast (2013) afirmou ter observado alguns casos de infecção após a colocação de Alvogyl® em alvéolos humanos, e em um relato de caso mais recente foi verificada

a ocorrência de uma lesão de corpo estranho, com aparência de infestação parasitária (Tasoulas et al., 2017), causada pelo mesmo fármaco. A descrição histológica relatada neste último artigo, destacou a presença de tecido conjuntivo de granulação e fibroso, contendo múltiplas estruturas redondas e lineares de cor marrom e tamanho variável, cercadas por infiltrado inflamatório, o que resulta ser muito similar aos achados das nossas lâminas com esse fármaco. Estes efeitos teciduais adversos podem ter uma explicação na composição do fármaco já que, diferentemente do polímero reabsorvível utilizado no nosso estudo (PCL), o Alvogyl® contem fibras vegetais (celulose) da planta Penghawar (Kaya et al., 2011), as quais não podem ser reabsorvidas pelo organismo, podendo permanecer encapsuladas no tecido.

Contudo, o alívio da dor proporcionado pelo eugenol e o butamben do Alvogyl® nas primeiras horas de uso pode ser considerado uma vantagem do fármaco. Estudos têm destacado que no primeiro dia de aplicação, o Alvogyl® proporciona um efeito analgésico maior que outros tratamentos, porém, este efeito é rapidamente perdido (Kaya et al., 2011; Eshghpour et al., 2015; Faizel et al., 2015). Esta rápida diminuição do efeito analgésico, o atraso no processo de cicatrização do alvéolo e a ocorrência de quadros infecciosos nos grupos tratados com Alvogyl®, sugerem que o fármaco perde suas propriedades mais precocemente que a fibra PCL/OTC, embora esta fibra não apresente qualquer componente analgésico. Estudos futuros visam a associação de algum composto com essas características à mistura.

O grupo tratado com PCL/OTC apresentou no 7º dia, grande parte do alvéolo já preenchido por tecido conjuntivo, caracterizado por fibroblastos e abundantes vasos sanguíneos neoformados. Neste mesmo tempo de avaliação, na região apical foi observado o início da osteogênese. Uma resposta similar foi vista no grupo PCL, porém, com uma taxa inferior de preenchimento alveolar com tecido conjuntivo e quantidade de osso neoformado. Em comparação aos alvéolos sadios de incisivos de rato do estudo de Vieira et al. (2015), o reparo dos nossos grupos no sétimo dia estaria ligeiramente atrasado, já que nos animais sem alveolite, a formação óssea não foi vista unicamente na região apical e esta se encontrava em fase mais avançada, com grande quantidade de osteócitos e confluência de trabéculas ósseas.

No 14º dia, o grupo PCL mostrou um aumento no depósito de matriz óssea (Tabela 5.2), mas manteve a porcentagem de tecido conjuntivo inalterada (Tabela 5.1). Isto aconteceu provavelmente, porque houve um maior preenchimento da região cervical do alvéolo com tecido conjuntivo e ao mesmo tempo, uma substituição do tecido conjuntivo por matriz óssea na região apical. Já o grupo PCL/OTC mostrou uma diminuição significativa na porcentagem de tecido conjuntivo no segundo tempo de avaliação, e ao mesmo tempo um aumento na porcentagem de matriz óssea. Em comparação aos achados do estudo de Rodrigues et al. (2011), que avaliaram alvéolos de incisivos de ratos com alveolite não tratados, o processo de reparo estaria mais avançado, pois eles não verificaram formação óssea no 15º dia pós-exodontia. Porém, nesse estudo a alveolite foi induzida com adrenalina e inserção de secreção purulenta, o que pode ter piorado o quadro infeccioso e o processo regenerativo, além das diferenças na estrutura alveolar do incisivo em relação ao molar.

No 21º dia, a ossificação se estendeu para o terço cervical, com maior intensidade e grau de maturação óssea no grupo PCL/OTC. No estudo de Rodrigues et al. (2011), aos 28 dias foram vistas discretas trabéculas ósseas unicamente na região apical. Esta diferença de resultados sugere que o controle da infecção proporcionado pelo antibiótico no grupo PCL/OTC, possa ter contribuído com a formação óssea. Já o grupo tratado com a fibra de PCL sem a oxitetraciclina, pode ter apresentado um resultado melhor que o de Rodrigues et al. (2011) por ter tido um tamponamento mecânico do alvéolo. Além disso, a caprolactona contida na PCL pode ter contraposto a atividade fibrinolítica causadora da alveolite seca, acelerando o reparo (Auerswald; Doleschel, 1967).

Outro fator que pode ter favorecido a ossificação no grupo PCL/OTC é o efeito sobre os osteoclastos (pela inibição de MMPs e interleucinas) e osteoblastos (indução da proliferação e diferenciação) atribuído às tetraciclina (Kirkwood et al., 2003; Cheng et al., 2012). A *comprovação* da possível atividade osteogênica e anti-osteolítica da fibra PCL/OTC, traria perspectivas promissoras, não apenas no tratamento da alveolite seca, mas também de outras infecções ósseas e no campo da engenharia tecidual para regeneração de defeitos ósseos.

Também neste estudo, com o propósito de verificar se houve alguma influência da oxitetraciclina na população de osteoclastos no alvéolo, foi realizada a imunomarcagem da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). A presença de TRAP no citoplasma dos osteoclastos permitiu sua identificação e diferenciação de outras células multinucleadas, como os macrófagos (Ghalayani et al., 2014). Com isto foi possível observar que os osteoclastos estavam presentes em todos os grupos do nosso estudo, especialmente no 7º dia (Tabela 5.3), confirmando que a reabsorção das paredes alveolares e dos septos interradiculares é um processo necessário após a exodontia (Hupp, 2014b) e também está presente na alveolite seca. Vieira et al. (2015) também observaram a presença de osteoclastos em todos os períodos experimentais (0-21 dias) nos alvéolos sadios, com um pico do fator osteoclastogênico RANKL em sete dias e um pico na contagem de osteoclastos aos 14 dias.

Isto pode indicar que na alveolite seca o pico de osteoclastos fica adiantado em relação ao alvéolo sadio, provavelmente devido à alteração da resposta imunológica frente ao agressor. O adiantamento do pico de osteoclastos também pode ser observado em alvéolos sadios após exodontia quando se utilizam anti-inflamatórios que podem alterar a resposta imunológica, como demonstrado no estudo de Ghalayani et al. (2014) que observaram a presença de osteoclastos, principalmente nos primeiros sete dias de reparo, como efeito do diclofenaco e do celecoxib no alvéolo sadio após exodontia, através da marcação TRAP. Da mesma forma, Luvizuto et al. (2011) estudaram a expressão de TRAP durante o processo de cicatrização alveolar (7, 14, 21, 28 e 42 dias pós-operatório) em ratas ovariectomizadas tratadas com raloxifeno e acharam uma maior expressão de TRAP no dia 7, e uma diminuição desta expressão ao longo do tempo.

Além de confirmar o perfil da população de osteoclastos ao longo do processo de reparo alveolar, os nossos resultados sugerem que o efeito anti-osteoclastogênico atribuído às tetraciclina (Andersson et al., 2012; Golub et al., 2016) pode ter se manifestado, uma vez que o grupo tratado com PCL/OTC apresentou as menores quantidades de células TRAP-positivas em todos os tempos avaliados (Tabela 5.3). Esta diminuição do número de osteoclastos por perímetro ósseo, também foi observado após o uso de oxitetraciclina em tíbias de ratos no estudo de Zhou et al. (2010).

Além dos benefícios verificados diretamente neste estudo, o uso da nanofibra poderia proteger o fármaco da degradação causada pela luz e pelo calor, aumentando seu tempo de ação e de conservação (Goonoo et al., 2014). Contudo, ressaltamos a necessidade de realizar testes físico-químicos complementares para comprovar este efeito. E apesar de já ter sido testada *in vivo*, para entender melhor o funcionamento e segurança da fibra, também é importante a condução de testes para quantificação de citocinas inflamatórias geradas pelos produtos de degradação da PCL e da OTC, avaliação do padrão de resistência microbiológica após o período de contato com a fibra, imunoensaios para a quantificação de proteínas relacionadas à osteogênese e estudos de citotoxicidade.

Ainda, embora não tenha sido objetivo deste estudo avaliar o parâmetro de nocicepção nos animais, acredita-se que a proteção mecânica e antimicrobiana do alvéolo podem ter indiretamente promovido um quadro álgico menos intenso. Como perspectiva futura, seria de grande interesse a incorporação de um componente analgésico na composição da fibra para que agisse rapidamente no tecido alvo. Além disso, modificações no processo de confecção das nanofibras, o uso de uma combinação de polímeros e o emprego de técnicas como a eletrofiação coaxial (estrutura casca-núcleo), podem ajudar a desenvolver nanofibras com um tempo de reabsorção mais rápido (Huang; Brazel, 2001), reduzindo o risco de atraso no processo de reparo alveolar, porém, tornando o processo de fabricação mais complexo e mais caro. E finalmente, a produção de nanofibras alinhadas unidirecionalmente pode permitir uma melhor regeneração óssea em comparação às fibras com disposição randômica, devido à sua similaridade topográfica com os feixes de fibras de colágeno bem alinhadas presentes no tecido ósseo nativo (Gao et al., 2016).

Como discutido nos parágrafos anteriores, a ação antimicrobiana que é mantida por um tempo prolongado, a obtenção de um tamponamento mecânico do alvéolo dentário e a possibilidade de um reparo alveolar adequado representam as maiores vantagens do material.

7 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

É possível produzir filmes nanométricos de orientação randômica em camadas e morfologia multiforme, a partir da eletrofição de uma solução polimérica de policaprolactona com cloridrato de oxitetraciclina (PCL/OTC).

A nanofibra PCL/OTC favorece a maior liberação de OTC nas primeiras horas, coincidindo com o período de maior inibição de colônias de biofilme bacteriano, seguido por um período de manutenção em que a porcentagem de colônias permanece baixa.

O tratamento de alveolite seca em alvéolos de molares de rato utilizando a fibra PCL/OTC apresentou mais completa regeneração tecidual do alvéolo até o 21º dia que a fibra de PCL, e esta, que o Alvogyl®, apresentando maior porcentagem de osso neoformado e menor quantidade de osteoclastos em relação aos outros grupos.

O perfil de liberação prolongando da oxitetraciclina e as propriedades biológicas relevantes apresentadas pela nanofibra eletrofiada de PCL/OTC, nestas condições experimentais, encorajam a hipótese de que o material poderá ser explorado como uma alternativa nova e eficaz para o tratamento de alveolite seca.

REFERÊNCIAS¹

- Agwuh KN, MacGowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycyclines. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Aug;58(2):256-65. doi: 10.1093/jac/dkl224.
- Ahir B, Parekh V, Katyayan MK, Katyayan PA. Smear layer removal efficacy of different irrigating solutions: a comparative scanning electron microscope evaluation. *Indian J Dent Res.* 2014 Sep-Oct;25(5):617-22. doi: 10.4103/0970-9290.147107.
- Akinbami BO, Godspower T. Dry socket: incidence, clinical features, and predisposing factors. *Int J Dent.* 2014;2014:796102. doi: 10.1155/2014/796102.
- Akota I, Alvsaker B, Bjornland T. The effect of locally applied gauze drain impregnated with chlortetracycline ointment in mandibular third-molar surgery. *Acta Odontol Scand.* 1998 Feb;56(1):25-9.
- Al-Moraissi EA, Ellis E, 3rd. Biodegradable and Titanium Osteosynthesis Provide Similar Stability for Orthognathic Surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015 Sep;73(9):1795-808. doi: 10.1016/j.joms.2015.01.035.
- Aleman Navas RM, Martinez Mendoza MG. Case report: late complication of a dry socket treatment. *Int J Dent.* 2010;2010:479306. doi: 10.1155/2010/479306.
- Alexander RE. Dental extraction wound management: a case against medicating postextraction sockets. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000 May;58(5):538-51. doi: [https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(00\)90017-X](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(00)90017-X).
- Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, Diangelis AJ, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol.* 2012 Apr;28(2):88-96. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01125.x.
- Andre CV, Khonsari RH, Ernenwein D, Goudot P, Ruhin B. Osteomyelitis of the jaws: A retrospective series of 40 patients. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2017 Oct;118(5):261-264. doi: 10.1016/j.jormas.2017.04.007.
- Araujo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol* 2000. 2015 Jun;68(1):122-34. doi: 10.1111/prd.12082.

---

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Auerswald W, Doleschel W. Lactones as inhibitors of the fibrinolytic system. *Science*. 1967 Jun 2;156(3779):1244-5.

Augustine R, Dominic EA, Reju I, Kaimal B, Kalarikkal N, Thomas S. Investigation of angiogenesis and its mechanism using zinc oxide nanoparticle-loaded electrospun tissue engineering scaffolds. *RSC Adv*. 2014;4:51528–36. doi: 10.1039/c4ra07361d.

Augustine R, Kalarikkal N, Thomas S. Electrospun PCL membranes incorporated with biosynthesized silver nanoparticles as antibacterial wound dressings. *Appl Nanosci*. 2016;6(3):337-44. doi: 10.1007/s13204-015-0439-1.

Baker PJ, Evans RT, Slots J, Genco RJ. Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from the human oral cavity. *J Dent Res*. 1985 Oct;64(10):1233-44. doi: 10.1177/00220345850640101201.

Baur DA, Altay MA, Flores-Hidalgo A, Ort Y, Queresby FA. Chronic osteomyelitis of the mandible: diagnosis and management--an institution's experience over 7 years. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Apr;73(4):655-65. doi: 10.1016/j.joms.2014.10.017.

Belfiglio EJ, Wonderlich ST, Fox LJ. Myospherulosis of the alveolus secondary to the use of Terra-Cortril and Gelfoam. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1986 Jan;61(1):12-4.

Bertram U, Steiner D, Poppitz B, Dippold D, Kohn K, Beier JP, et al. Vascular tissue engineering: effects of integrating collagen into a PCL based nanofiber material. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9616939. doi: 10.1155/2017/9616939.

Bettany JT, Peet NM, Wolowacz RG, Skerry TM, Grabowski PS. Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. *Bone*. 2000 Jul;27(1):75-80. doi: 10.1016/S8756-3282(00)00297-0.

Birn H. Bacteria and fibrinolytic activity in "dry socket". *Acta Odontol Scand*. 1970 Dec;28(6):773-83.

Birn H. Etiology and pathogenesis of fibrinolytic alveolitis ("dry socket"). *Int J Oral Surg*. 1973;2(5):211-63.

Birn H. Fibrinolytic activity of alveolar bone in "dry socket". *Acta Odontol Scand*. 1972a Mar;30(1):23-32.

Birn H. Fibrinolytic activity of normal alveolar bone. *Acta Odontol Scand.* 1971 Jun;29(2):141-53.

Birn H. Kinines and pain in "dry socket". *Int J Oral Surg.* 1972b;1(1):34-42.

Birn H, Myhre-Jensen O. Cellular fibrinolytic activity of human alveolar bone. *Int J Oral Surg.* 1972;1(3):121-5.

Bjorvatn K, Skaug N, Selvig KA. Tetracycline-impregnated enamel and dentin: duration of antimicrobial capacity. *Scand J Dent Res.* 1985 Jun;93(3):192-7.

Blum IR. Contemporary views on dry socket (alveolar osteitis): a clinical appraisal of standardization, aetiopathogenesis and management: a critical review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Jun;31(3):309-17. doi: 10.1054/ijom.2002.0263.

Bölgen N, Menceloğlu YZ, Acatay K, Vargel I, Pişkin E. In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(epsilon-caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2005;16(12):1537-55.

Bortoluzzi MC, Manfro R, De Dea BE, Dutra TC. Incidence of dry socket, alveolar infection, and postoperative pain following the extraction of erupted teeth. *J Contemp Dent Pract.* 2010;11(1):E033-40.

Bosco JM, de Oliveira SR, Bosco AF, Schweitzer CM, Jardim Junior EG. Influence of local tetracycline on the microbiota of alveolar osteitis in rats. *Braz Dent J.* 2008;19(2):119-23.

Bowe DC, Rogers S, Stassen LF. The management of dry socket/alveolar osteitis. *J Ir Dent Assoc.* 2011 Dec-2012 Jan;57(6):305-10.

Brozoski MA, Hanna AAT, Deboni MCZ, Marques MM, Homem MdGN. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52(2):265-70.

Burgoyne CC, Giglio JA, Reese SE, Sima AP, Laskin DM. The efficacy of a topical anesthetic gel in the relief of pain associated with localized alveolar osteitis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010 Jan;68(1):144-8. doi: 10.1016/j.joms.2009.06.033.

- Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2003 Sep;30(9):809-18.
- Cardoso CL, Ferreira Junior O, Carvalho PS, Dionisio TJ, Cestari TM, Garlet GP. Experimental dry socket: microscopic and molecular evaluation of two treatment modalities. *Acta Cir Bras*. 2011 Oct;26(5):365-72.
- Cardoso CL, Rodrigues MT, Ferreira Junior O, Garlet GP, de Carvalho PS. Clinical concepts of dry socket. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Aug;68(8):1922-32. doi: 10.1016/j.joms.2009.09.085.
- Celebioglu A, Sen HS, Durgun E, Uyar T. Molecular entrapment of volatile organic compounds (VOCs) by electrospun cyclodextrin nanofibers. *Chemosphere*. 2016 Feb;144:736-44. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.09.029.
- Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. *J Oral Sci*. 2007 Jun;49(2):161-6.
- Chakravarthi S. Platelet rich fibrin in the management of established dry socket. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2017 Jun;43(3):160-5. doi: 10.5125/jkaoms.2017.43.3.160.
- Chang CY, Yamada S. Evaluation of the regenerative effect of a 25% doxycycline-loaded biodegradable membrane for guided tissue regeneration. *J Periodontol*. 2000 Jul;71(7):1086-93. doi: 10.1902/jop.2000.71.7.1086.
- Chen K, Huang Y, Song Q, Wu C, Chen X, Zeng L. Drug-resistance dynamics of *Staphylococcus aureus* between 2008 and 2014 at a tertiary teaching hospital, Jiangxi Province, China. *BMC Infect Dis*. 2017 Jan 25;17(1):97. doi: 10.1186/s12879-016-2172-0.
- Cheng W, Yue Y, Fan W, Hu Y, Wang X, Pan X, et al. Effects of tetracyclines on bones: an ambiguous question needs to be clarified. *Pharmazie*. 2012 May;67(5):457-9.
- Choi JS, Kim HS, Yoo HS. Electrospinning strategies of drug-incorporated nanofibrous mats for wound recovery. *Drug Deliv Transl Res*. 2015 Apr;5(2):137-45. doi: 10.1007/s13346-013-0148-9.

Chronopoulos A, Zarra T, Ehrenfeld M, Otto S. Osteoradionecrosis of the jaws: definition, epidemiology, staging and clinical and radiological findings. A concise review. *Int Dent J*. 2018 Feb;68(1):22-30. doi: 10.1111/idj.12318.

Chukwudi CU. rRNA Binding sites and the molecular mechanism of action of the tetracyclines. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Aug;60(8):4433-41. doi: 10.1128/aac.00594-16.

Corredor-Gomez JP, Rueda-Ramirez AM, Gamboa-Marquez MA, Torres-Rodriguez C, Cortes-Rodriguez CJ. An intramembranous ossification model for the in silico analysis of bone tissue formation in tooth extraction sites. *J Theor Biol*. 2016 Jul 21;401:64-77. doi: 10.1016/j.jtbi.2016.04.023.

Cruz Olivo EA, Santos D, de Lima ME, Dos Santos VL, Sinisterra RD, Cortes ME. Antibacterial effect of synthetic peptide LyeTxI and LyeTxI/beta-Cyclodextrin association compound against planktonic and multispecies biofilms of periodontal pathogens. *J Periodontol*. 2017 Jun;88(6):e88-e96. doi: 10.1902/jop.2016.160438.

Daly B, Sharif MO, Newton T, Jones K, Worthington HV. Local interventions for the management of alveolar osteitis (dry socket). *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;12:Cd006968. doi: 10.1002/14651858.CD006968.pub2.

Dashti A, Ready D, Salih V, Knowles JC, Barralet JE, Wilson M, et al. In vitro antibacterial efficacy of tetracycline hydrochloride adsorbed onto Bio-Oss bone graft. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 May;93(2):394-400. doi: 10.1002/jbm.b.31594.

Day P, Duggal M. Interventions for treating traumatised permanent front teeth: avulsed (knocked out) and replanted. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Jan 20(1):Cd006542. doi: 10.1002/14651858.CD006542.pub2.

De Antoni CC. Estudo microscópico comparativo entre as osteonecroses e as osteomielites dos maxilares [Dissertação] [Internet]. Bauru: Universidade do Sagrado Coração, Faculdade de Odontologia; 2016 [citado 2017 nov 1]. Disponível em: <http://tede2.usc.br:8080/jspui/handle/tede/316>.

de Melo Junior EJ, Raposo MJ, Lisboa Neto JA, Diniz MF, Marcelino Junior CA, Sant'Ana AE. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis. *Phytomedicine*. 2002 Mar;9(2):109-16. doi: 10.1078/0944-7113-00087.

de Valence S, Tille JC, Mugnai D, Mrowczynski W, Gurny R, Moller M, et al. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta

replacement model. *Biomaterials*. 2012 Jan;33(1):38-47. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.024.

del Valle L, Diaz A, Royo M, Rodriguez R, Puiggali J. Biodegradable polyesters reinforced with triclosan loaded polylactide micro/nanofibers: Properties, release and biocompatibility. *eXPRESS Polymer Letters*. 2012;6(4):266–82. doi: 10.3144/expresspolymlett.2012.30.

Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002 Dec;31(6):641-5. doi: 10.1054/ijom.2002.0292.

Dougnon TV, Deguenon E, Fah L, Legba B, Hounmanou YMG, Agbankpe J, et al. Traditional treatment of human and animal salmonellosis in Southern Benin: Knowledge of farmers and traditherapists. *Vet World*. 2017 Jun;10(6):580-92. doi: 10.14202/vetworld.2017.580-592.

Duewelhenke N, Krut O, Eysel P. Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jan;51(1):54-63. doi: 10.1128/aac.00729-05.

Dzikowski M, Castanie N, Guedon A, Verrier B, Primard C, Sohier J. Antibiotic incorporation in jet-sprayed nanofibrillar biodegradable scaffolds for wound healing. *Int J Pharm*. 2017 Nov 5;532(2):802-12. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.117.

Elangomannan S, Louis K, Dharmaraj BM, Kandasamy VS, Soundarapandian K, Gopi D. Carbon nanofiber/polycaprolactone/mineralized hydroxyapatite nanofibrous scaffolds for potential orthopedic applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017 Feb 22;9(7):6342-55. doi: 10.1021/acsami.6b13058.

Eshghpour M, Ahrari F, Najjarkar NT, Khajavi MA. Comparison of the effect of low level laser therapy with alvogyl on the management of alveolar osteitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015 May;20(3):e386-92. doi: 10.4317/medoral.20375.

Eshghpour M, Nejat AH. Dry socket following surgical removal of impacted third molar in an Iranian population: incidence and risk factors. *Niger J Clin Pract*. 2013 Oct-Dec;16(4):496-500. doi: 10.4103/1119-3077.116897.

Faizel S, Thomas S, Yuvaraj V, Prabhu S, Tripathi G. Comparison between Neocone, Alvogyl and zinc oxide eugenol packing for the treatment of dry socket: a double blind randomised control Trial. *J Maxillofac Oral Surg*. 2015;14(2):312-20. doi: 10.1007/s12663-014-0667-z.

Farina R, Trombelli L. Wound healing of extraction sockets. In: Larjava H, editor. Oral wound healing: cell biology and clinical management. Hoboken: Blackwell-Wiley; 2012. p. 195-223.

Fazakerley M, Field EA. Dry socket: a painful post-extraction complication (a review). Dent Update. 1991 Jan-Feb;18(1):31-4.

Felice B, Prabhakaran MP, Rodriguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2014 Aug;41:178-95. doi: 10.1016/j.msec.2014.04.049.

Flynn T. Complex odontogenic infections. In: Hupp JR, Ellis III E, Tucker MR. Contemporary oral and maxillofacial surgery. 6 ed. ed. St. Louis (MO): Elsevier Mosby; 2014. p. 319-38.

Frank KL, Vergidis P, Brinkman CL, Greenwood Quaintance KE, Barnes AM, Mandrekar JN, et al. Evaluation of the *Enterococcus faecalis* biofilm-associated virulence factors AhrC and Eep in rat foreign body osteomyelitis and in vitro biofilm-associated antimicrobial resistance. PLoS One. 2015;10(6):e0130187. doi: 10.1371/journal.pone.0130187.

Fridrich KL, Olson RA. Alveolar osteitis following surgical removal of mandibular third molars. Anesth Prog. 1990 Jan-Feb;37(1):32-41.

Gaetti-Jardim E Jr, Landucci LF, de Oliveira KL, Costa I, Ranieri RV, Okamoto AC, et al. Microbiota associated with infections of the jaws. Int J Dent. 2012;2012:369751. doi: 10.1155/2012/369751.

Gaetti-Jardim E Jr, Fardin AC, Gaetti-Jardim EC, de Castro AL, Schweitzer CM, Avila-Campos MJ. Microbiota associated with chronic osteomyelitis of the jaws. Braz J Microbiol. 2010 Oct;41(4):1056-64. doi: 10.1590/s1517-838220100004000025.

Gao X, Song J, Zhang Y, Xu X, Zhang S, Ji P, et al. Bioinspired design of polycaprolactone composite nanofibers as artificial bone extracellular matrix for bone regeneration application. ACS Appl Mater Interfaces. 2016;8(41):27594-610. doi: 10.1021/acsami.6b10417.

Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Galvez J. Minocycline: far beyond an antibiotic. Br J Pharmacol. 2013 May;169(2):337-52. doi: 10.1111/bph.12139.

Ghalayani P, Minaiyan M, Razavi SM, Hajisadeghi S, Naghsh N, Abuie MS. Effects of diclofenac and celecoxib on osteoclastogenesis during alveolar bone healing, in vivo. *Dent Res J (Isfahan)*. 2014 May;11(3):357-63.

Golub LM, Elburki MS, Walker C, Ryan M, Sorsa T, Tenenbaum H, et al. Non-antibacterial tetracycline formulations: host-modulators in the treatment of periodontitis and relevant systemic diseases. *Int Dent J*. 2016 Jun;66(3):127-35. doi: 10.1111/idj.12221.

Golub LM, McNamara TF, Ryan ME, Kohut B, Blieden T, Payonk G, et al. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001 Feb;28(2):146-56.

Gomes WD, Silva CA, Melo ME, Silva VF, Almeida MM, Pedrini D, et al. Delayed tooth replantation in rats: effect of systemic antibiotic therapy with amoxicillin and tetracycline. *Dent Traumatol*. 2015 Dec;31(6):448-56. doi: 10.1111/edt.12207.

Goncalves SH, de Vasconcelos RA, Cavalcanti B, Camargo CH. Persistent infection by *Staphylococcus epidermidis* in endodontic flare-up: a case report. *Gen Dent*. 2016 Mar-Apr;64(2):e18-21.

Goonoo N, Bhaw-Luximon A, Jhurry D. Drug loading and release from electrospun biodegradable nanofibers. *J Biomed Nanotechnol*. 2014 Sep;10(9):2173-99.

Gregori C, Gayotto M, Campos A, Netto J. Acidentes e complicações das exodontias. In: Gregori C, Campos AC. *Cirurgia buco-dento-alveolar*. 2 ed. ed. São Paulo: Sarvier; 2004. p. 159-67.

Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007;46(30):5670-703. doi: 10.1002/anie.200604646.

Gu Y, Walker C, Ryan ME, Payne JB, Golub LM. Non-antibacterial tetracycline formulations: clinical applications in dentistry and medicine. *J Oral Microbiol*. 2012;4. doi: 10.3402/jom.v4i0.19227.

Guclu O, Muratli A, Arik D, Tekin K, Erdogan H, Derekoy FS. Sclerotic effect of oxytetracycline on the submandibular gland: An experimental model. *Ear Nose Throat J*. 2016 Dec;95(12):492-6.

Hallmer F, Bjørnland T, Andersson G, Becktor JP, Kristoffersen AK, Enersen M. Bacterial diversity in medication-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017 Apr;123(4):436-444. doi: 10.1016/j.oooo.2016.11.011.

Han FY, Thurecht KJ, Whittaker AK, Smith MT. Bioerodable PLGA-based microparticles for producing sustained-release drug formulations and strategies for improving drug loading. *Front Pharmacol*. 2016;7:185. doi: 10.3389/fphar.2016.00185.

Hanley M, Cooper J. Osteoradionecrosis. StatPearls. Treasure Island: StatPearls Publishing LLC; 2017.

Hedstrom L, Sjogren P. Effect estimates and methodological quality of randomized controlled trials about prevention of alveolar osteitis following tooth extraction: a systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Jan;103(1):8-15. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.01.007.

Hernández AR, Contreras OC, Acevedo JC, Moreno LGN. Poly(ϵ -caprolactone) degradation under acidic and alkaline conditions. *American Journal of Polymer Science*. 2013;3(4):70-5. doi: 10.5923/j.ajps.20130304.02.

Herrero-Fresno A, Zachariasen C, Norholm N, Holm A, Christiansen LE, Olsen JE. Effect of different oral oxytetracycline treatment regimes on selection of antimicrobial resistant coliforms in nursery pigs. *Vet Microbiol*. 2017 Sep;208:1-7. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.07.005.

Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jan 01;68(1):187-200. doi: 10.1002/jbm.a.10050.

Hooley JR, Golden DP. The effect of polylactic acid granules on the incidence of alveolar osteitis after mandibular third molar surgery. A prospective randomized study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Sep;80(3):279-83.

Houston JP, McCollum J, Pietz D, Schneck D. Alveolar osteitis: a review of its etiology, prevention, and treatment modalities. *Gen Dent*. 2002 Sep-Oct;50(5):457-63; quiz 64-5.

Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. 2016 Oct;91:30-8. doi: 10.1016/j.bone.2016.06.013.

Huang X, Brazel CS. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J Control Release*. 2001 Jun 15;73(2-3):121-36.

Huang Z, Zhang Y, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol*. 2003;63(15):2223-53. doi: 10.1016/S0266-3538(03)00178-7.

Hupp JR. Prevention and management of extraction complications. In: Hupp JR, Ellis III E, Tucker MR. *Contemporary oral and maxillofacial surgery*. 6^a ed. St. Louis: Elsevier Mosby; 2014a. p. 174-87.

Hupp JR. Wound repair. In: Hupp JR, Ellis III E, Tucker MR. *Contemporary oral and maxillofacial surgery*. 6^a ed. St. Louis: Elsevier Mosby; 2014b. p. 43-53.

Hupp JR, Ellis III E, Tucker MR. Infections. In: Hupp JR, Ellis III E, Tucker MR. *Contemporary oral and maxillofacial surgery*. 6^a ed. St. Louis: Elsevier Mosby; 2014. p. 295-393.

Jang CH, Cho YB, Jang YS, Kim MS, Kim GH. Antibacterial effect of electrospun polycaprolactone/polyethylene oxide/vancomycin nanofiber mat for prevention of periprosthetic infection and biofilm formation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015 Aug;79(8):1299-305. doi: 10.1016/j.ijporl.2015.05.037.

Jang JW, Bae YJ, Kim YG, Jin YJ, Park KS, Cho YS, Moon HB, Kim TB. A case of anaphylaxis to oral minocycline. *J Korean Med Sci*. 2010 Aug;25(8):1231-3. doi: 10.3346/jkms.2010.25.8.1231.

Julius LL, Hungerford RW, Nelson WJ, McKercher TC, Zellhoefer RW. Prevention of dry socket with local application of Terra-Cortril in gelfoam. *J Oral Maxillofac Surg*. 1982 May;40(5):285-6.

Kabashima H, Mizobe K, Sakai T, Nakamuta H, Kurita K, Terada Y. The usefulness of three-dimensional imaging for prognostication in cases of intentional tooth replantation. *J Oral Sci*. 2012;54(4):355-8.

Karayel H, Kaya B, Caydere M, Terzioglu A, Aslan G. Prevention of unfavourable effects of cigarette smoke on flap viability using botulinum toxin in random pattern flaps: An experimental study. *Plast Surg (Oakv)*. 2015 Fall;23(3):177-82.

Karuppuswamy P, Reddy Venugopal J, Navaneethan B, Laiva AL, Ramakrishna S. Polycaprolactone nanofibers for the controlled release of tetracycline hydrochloride. *Mater Lett*. 2015 Feb;141:180-6. doi: 10.1016/j.matlet.2014.11.044.

Kasinathan N, Amirthalingam M, Reddy ND, Jagani HV, Volety SM, Rao JV. In-situ implant containing PCL-curcumin nanoparticles developed using design of experiments. *Drug Deliv.* 2016;23(3):1017-25. doi: 10.3109/10717544.2014.927021.

Kaufman AY, Solomonov M, Galieva D, Abbott PV. Allergic reaction to the tetracycline component of Ledermix paste: a case report. *Int Endod J.* 2014 Nov;47(11):1090-7. doi: 10.1111/iej.12252.

Kaya GS, Yapici G, Savas Z, Gungormus M. Comparison of alvogyl, SaliCept patch, and low-level laser therapy in the management of alveolar osteitis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011 Jun;69(6):1571-7. doi: 10.1016/j.joms.2010.11.005.

Kennedy R, Alibhai M, Shakib K. Tetracycline: a cure all? *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Apr;52(4):382-3. doi: 10.1016/j.bjoms.2014.01.020.

Kerneis S, Plainvert C, Barnier JP, Tazi A, Dmytruk N, Gislain B, et al. Clinical and microbiological features associated with group B Streptococcus bone and joint infections, France 2004-2014. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Sep;36(9):1679-84. doi: 10.1007/s10096-017-2983-y.

Khandaker M, Riahinezhad S, Williams WR, Wolf R. microgroove and collagen-poly(ϵ -caprolactone) nanofiber mesh coating improves the mechanical stability and osseointegration of titanium implants. *Nanomaterials (Basel).* 2017 Jun 13;7(6). pii: E145. doi: 10.3390/nano7060145.

Kirkwood K, Martin T, Andreadis ST, Kim YJ. Chemically modified tetracyclines selectively inhibit IL-6 expression in osteoblasts by decreasing mRNA stability. *Biochem Pharmacol.* 2003 Nov 01;66(9):1809-19.

Kirstein B, Chambers TJ, Fuller K. Secretion of tartrate-resistant acid phosphatase by osteoclasts correlates with resorptive behavior. *J Cell Biochem.* 2006 Aug 01;98(5):1085-94. doi: 10.1002/jcb.20835.

Kishan AP, Cosgriff-Hernandez EM. Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *J Biomed Mater Res A.* 2017 Oct;105(10):2892-905. doi: 10.1002/jbm.a.36124.

Kolokythas A, Olech E, Miloro M. Alveolar osteitis: a comprehensive review of concepts and controversies. *Int J Dent.* 2010;2010:249073. doi: 10.1155/2010/249073.

Krakowiak PA. Alveolar osteitis and osteomyelitis of the jaws. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2011 Aug;23(3):401-13. doi: 10.1016/j.coms.2011.04.005.

Kudiyirickal MG, Hollinshead F. Clinical profile of orofacial infections: an experience from two primary care dental practices. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012 Jul;17(4):e533-7. doi: 10.4317/medoral.17664.

Lalani Z, Wong M, Brey EM, Mikos AG, Duke PJ, Miller MJ, et al. Spatial and temporal localization of FGF-2 and VEGF in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Oct;63(10):1500-8. doi: 10.1016/j.joms.2005.03.032.

Lan J, Lahoti A, Lew DB. A severe case of minocycline-induced DRESS resulting in liver transplantation and autoimmune sequelae. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016 Apr;116(4):367-8. doi: 10.1016/j.anai.2015.12.010.

Lawrence WT, Murphy RC, Robson MC, Hegggers JP. The detrimental effect of cigarette smoking on flap survival: an experimental study in the rat. *Br J Plast Surg.* 1984 Apr;37(2):216-9.

Lebrun-Vignes B, Kreft-Jais C, Castot A, Chosidow O; French Network of Regional Centers of Pharmacovigilance. Comparative analysis of adverse drug reactions to tetracyclines: results of a French national survey and review of the literature. *Br J Dermatol.* 2012 Jun;166(6):1333-41. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.10845.x.

Lee J, Choi WI, Tae G, Kim YH, Kang SS, Kim SE, et al. Enhanced regeneration of the ligament-bone interface using a poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold with local delivery of cells/BMP-2 using a heparin-based hydrogel. *Acta Biomater.* 2011 Jan;7(1):244-57. doi: 10.1016/j.actbio.2010.08.017.

Leketas M, Vedlugaite E, Kubilius R. Management of maxillofacial fractures within three years of empirical findings. *Stomatologija.* 2016;18(2):39-50.

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2002 Jun;84-A(6):1032-44.

Limirio PH, Rocha FS, Batista JD, Guimaraes-Henriques JC, de Melo GB, Dechichi P. The effect of local delivery doxycycline and alendronate on bone repair. *AAPS PharmSciTech.* 2016 Aug;17(4):872-7. doi: 10.1208/s12249-015-0411-0.

Liu M, Duan XP, Li YM, Yang DP, Long YZ. Electrospun nanofibers for wound healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 Jul 01;76:1413-23. doi: 10.1016/j.msec.2017.03.034.

Lukosiunas A, Kubilius R, Sabalys G, Keizeris T, Sakavicius D. An analysis of etiological factors for traumatic mandibular osteomyelitis. *Medicina (Kaunas)*. 2011;47(7):380-5.

Luong-Van E, Grondahl L, Chua KN, Leong KW, Nurcombe V, Cool SM. Controlled release of heparin from poly(epsilon-caprolactone) electrospun fibers. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(9):2042-50. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.028.

Luvizuto ER, Dias SS, Okamoto T, Dornelles RC, Okamoto R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol*. 2011 Oct;56(10):984-90. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.03.015.

Lynch DP, Newland JR, McClendon JL. Myospherulosis of the oral hard and soft tissues. *J Oral Maxillofac Surg*. 1984 Jun;42(6):349-55.

Lyons AJ, Brennan PA. Pentoxifylline - a review of its use in osteoradionecrosis. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2017 Apr;55(3):230-4. doi: 10.1016/j.bjoms.2016.12.006.

Lypka M, Hammoudeh J. Dentoalveolar infections. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2011 Aug;23(3):415-24. doi: 10.1016/j.coms.2011.04.010.

MacGregor AJ, Hart P. Bacteria of the extraction wound. *J Oral Surg*. 1970 Dec;28(12):885-7.

Mainous EG. Foreign body reaction after zinc oxide-eugenol packing in localized osteitis. *J Oral Surg*. 1974 Mar;32(3):207-8.

Malikmammadov E, Tanir TE, Kiziltay A, Hasirci V, Hasirci N. PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2017 Nov 2:1-31. doi: 10.1080/09205063.2017.1394711.

Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011 Jun;42(6):551-5. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.031.

Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg*. 1983 May;41(5):283-8.

Meechan JG, Macgregor ID, Rogers SN, Hobson RS, Bate JP, Dennison M. The effect of smoking on immediate post-extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1988 Oct;26(5):402-9.

Melo ME, Silva CA, de Souza Gomes WD, da Silva VF, Brandini DA, Poi WR, et al. Immediate tooth replantation in rats: effect of systemic antibiotic therapy with amoxicillin and tetracycline. *Clin Oral Investig*. 2016 Apr;20(3):523-32. doi: 10.1007/s00784-015-1534-0.

Merzel J, Salmon CR. Growth and the modeling/remodeling of the alveolar bone of the rat incisor. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008 Jul;291(7):827-34. doi: 10.1002/ar.20703.

Millett DT, Chapple IL, Hirschmann PN, Corrigan AM. Septic osteoradionecrosis of the mandible associated with pathological fracture: report of two cases. *Clin Radiol*. 1990 Jun;41(6):408-10.

Monteiro AP, Rocha CM, Oliveira MF, Gontijo SM, Agudelo RR, Sinisterra RD, et al. Nanofibers containing tetracycline/beta-cyclodextrin: Physico-chemical characterization and antimicrobial evaluation. *Carbohydr Polym*. 2017 Jan 20;156:417-26. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.09.059.

Moore JW, Brekke JH. Foreign body giant cell reaction related to placement of tetracycline-treated polylactic acid: report of 18 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 1990 Aug;48(8):808-12.

Morejón García M, Salup Díaz R, Cué Brugueras M. Actualización en tetraciclinas. *Rev Cubana Farm*. [Internet] 2003. [Citado 5 Feb 2018];37(3):não paginado. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152003000300008.

Morelli L, Cappelluti MA, Ricotti L, Lenardi C, Gerges I. An Injectable System for Local and Sustained Release of Antimicrobial Agents in the Periodontal Pocket. *Macromol Biosci*. 2017 Aug;17(8). doi: 10.1002/mabi.201700103.

Murph JT, Jr., Jaques SH, Knoell AN, Archibald GD, Yang S. A retrospective study on the use of a dental dressing to reduce dry socket incidence in smokers. *Gen Dent*. 2015 May-Jun;63(3):17-21.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database CID=10401. [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2004a [citado 7 Ago 2017]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10401>.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database CID=54680782. [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2004b [citado 7 Ago 2017]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54680782>.

Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Donhofer A, Wilson DN. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem*. 2014 May;395(5):559-75. doi: 10.1515/hsz-2013-0292.

Nicoli LG, Pigossi SC, Marcantonio C, Leal Zandim-Barcelos D, Marcantonio E, Jr. Surgical treatment of implants affected by periimplantitis after 15 years of loading: a case report. *Implant Dent*. 2016 Apr;25(2):288-92. doi: 10.1097/id.0000000000000398.

Nitzan DW. On the genesis of "dry socket". *J Oral Maxillofac Surg*. 1983 Nov;41(11):706-10.

Noroozi AR, Philbert RF. Modern concepts in understanding and management of the "dry socket" syndrome: comprehensive review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Jan;107(1):30-5. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.05.043.

Ogita A, Takada K, Kawana S. Case of anaphylaxis due to tetracycline hydrochloride. *J Dermatol*. 2011 Jun;38(6):597-9. doi: 10.1111/j.1346-8138.2010.01021.x.

Ogle OE. Odontogenic Infections. *Dent Clin North Am*. 2017 Apr;61(2):235-52. doi: 10.1016/j.cden.2016.11.004.

Olson RA, Roberts DL, Osbon DB. A comparative study of polylactic acid, Gelfoam, and Surgicel in healing extraction sites. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1982 May;53(5):441-9.

Olszewska M. [Oxytetracycline--mechanism of action and application in skin diseases]. *Wiad Lek*. 2006;59(11-12):829-33. Polonês.

Pal US, Singh BP, Verma V. Comparative evaluation of zinc oxide eugenol versus gelatin sponge soaked in plasma rich in growth factor in the treatment of dry socket: An initial study. *Contemp Clin Dent*. 2013 Jan;4(1):37-41. doi: 10.4103/0976-237x.111592.

Patel V, Harwood A, McGurk M. Osteomyelitis presenting in two patients: a challenging disease to manage. *Br Dent J*. 2010 Oct 23;209(8):393-6. doi: 10.1038/sj.bdj.2010.927.

Pautke C, Vogt S, Kreutzer K, Haczek C, Wexel G, Kolk A, et al. Characterization of eight different tetracyclines: advances in fluorescence bone labeling. *J Anat.* 2010 Jul;217(1):76-82. doi: 10.1111/j.1469-7580.2010.01237.x.

Pazzini CA, Pereira LJ, da Silva TA, Montalvany-Antonucci CC, Macari S, Marques LS, et al. Probiotic consumption decreases the number of osteoclasts during orthodontic movement in mice. *Arch Oral Biol.* 2017 Jul;79:30-4. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.02.017.

Perayil J, Menon KS, Biswas R, Fenol A, Vylloppillil R. Comparison of the efficacy of subgingival irrigation with 2% povidone-iodine and tetracycline HCl in subjects with chronic moderate periodontitis: A clinico microbiological study. *Dent Res J (Isfahan).* 2016 Mar-Apr;13(2):98-109.

Petkovic H, Lukezic T, Suskovic J. Biosynthesis of Oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*: Past, Present and Future Directions in the Development of Tetracycline Antibiotics. *Food Technol Biotechnol.* 2017 Mar;55(1):3-13. doi: 10.17113/ftb.55.01.17.4617.

Pfizer. Material safety data sheet 207 [homepage on the Internet]. New York: Pfizer Inc; 1999 [citado 20 Out 2017]. Disponível em: http://www.pfizer.com/files/products/material_safety_data/207.pdf.

Pfizer. TERRA-CORTRIL® [homepage on the Internet]. Guarulhos: Laboratórios Pfizer Ltda.; 2013 [citado 20 Out 2017]. Disponível em: http://www.pfizer.com.br/sites/g/files/g10033441/f/product_attachments/TerraCortril.pdf.

Polysciences Inc. Material Safety Data Sheet 19561 [homepage on the Internet]. Warrington: Polysciences Inc; 2013 [citado 17 Nov 2017]. Disponível em: <http://www.polysciences.com/skin/frontend/default/polysciences/pdf/19561.pdf>.

Prakasam M, Locs J, Salma-Ancane K, Loca D, Largeteau A, Berzina-Cimdina L. Biodegradable Materials and Metallic Implants-A Review. *J Funct Biomater.* 2017 Sep 26;8(4). doi: 10.3390/jfb8040044.

Qaisi M, Montague L. Bone margin analysis for osteonecrosis and osteomyelitis of the jaws. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2017 Aug;29(3):301-13. doi: 10.1016/j.coms.2017.03.007.

Rajendra Santosh AB, Ogle OE, Williams D, Woodbine EF. Epidemiology of Oral and Maxillofacial Infections. *Dent Clin North Am.* 2017 Apr;61(2):217-33. doi: 10.1016/j.cden.2016.11.003.

Ramirez-Agudelo R, Scheuermann K, Gala-Garcia A, Monteiro APF, Pinzon-Garcia AD, Cortes ME, et al. Hybrid nanofibers based on poly-caprolactone/gelatin/hydroxyapatite nanoparticles-loaded Doxycycline: Effective anti-tumoral and antibacterial activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018 Feb;83:25-34. doi: 10.1016/j.msec.2017.08.012.

Ramoglu M, Demirkol M, Aras MH, Ege B. Peripheral facial nerve paralysis triggered by alveolar osteitis. *J Craniofac Surg*. 2015 Jun;26(4):e292-3. doi: 10.1097/scs.0000000000001596.

Ramos UD, Suaid FA, Wikesjo UM, Susin C, Taba M, Jr., Novaes AB, Jr. Comparison between two antimicrobial protocols with or without guided bone regeneration in the treatment of peri-implantitis. A histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2017 Nov;28(11):1388-95. doi: 10.1111/clr.12998.

Rasubala L, Yoshikawa H, Islam AA, Nagata K, Iijima T, Ohishi M. Comparison of the healing process in plated and non-plated fractures of the mandible in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Aug;42(4):315-22. doi: 10.1016/j.bjoms.2004.02.020.

Robard L, Louis MY, Blanchard D, Babin E, Delanian S. Medical treatment of osteoradionecrosis of the mandible by PENTOCLO: preliminary results. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2014 Dec;131(6):333-338. doi: 10.1016/j.anorl.2013.11.006.

Rodrigues MT, Cardoso CL, Carvalho PS, Cestari TM, Feres M, Garlet GP, et al. Experimental alveolitis in rats: microbiological, acute phase response and histometric characterization of delayed alveolar healing. *J Appl Oral Sci*. 2011 May-Jun;19(3):260-8.

Rodrigues WC, Fabris AL, Hassumi JS, Goncalves A, Sonoda CK, Okamoto R. Kinetics of gene expression of alkaline phosphatase during healing of alveolar bone in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Jun;54(5):531-5. doi: 10.1016/j.bjoms.2016.02.018.

Rozanis J, Schofield ID, Warren BA. Is dry socket preventable? *Dent J*. 1977 May;43(5):233-6.

Ruan C, Hu N, Ma Y, Li Y, Liu J, Zhang X, et al. The interfacial pH of acidic degradable polymeric biomaterials and its effects on osteoblast behavior. *Sci Rep*. 2017 Jul 28;7(1):6794. doi: 10.1038/s41598-017-06354-1.

Rudzki E, Rebandel P. Sensitivity to oxytetracycline. *Contact Dermatitis*. 1997 Sep;37(3):136.

Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. 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.

Runyan CM, Gabrick KS. Biology of bone formation, fracture healing, and distraction osteogenesis. *J Craniofac Surg*. 2017 Jul;28(5):1380-9. doi: 10.1097/scs.0000000000003625.

Rutledge GC, Fridrikh SV. Formation of fibers by electrospinning. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 Dec 10;59(14):1384-91. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.020.

Rutledge JL, Marcoot RM. Terra-Cortril/Gelfoam for reduction of the incidence of localized osteitis following mandibular third molar removal. *J Oral Med*. 1984 Jan-Mar;39(1):51-3.

Sadaf N, Anoop B, Dakshina B, Shweta B. Evaluation of efficacy of tetracycline fibers in conjunction with scaling and root planing in patients with chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2012;16(3):392-7. doi: 10.4103/0972-124x.100918.

Saikali Z, Singh G. Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis. *Anticancer Drugs*. 2003 Nov;14(10):773-8. doi: 10.1097/01.cad.0000099002.92896.cf.

Sanchis JM, Saez U, Penarrocha M, Gay C. Tetracycline compound placement to prevent dry socket: a postoperative study of 200 impacted mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 May;62(5):587-91.

Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003 Aug;23(4):313-23.

Segura-Egea JJ, Martin-Gonzalez J, Jimenez-Sanchez MDC, Crespo-Gallardo I, Saucedo-Marquez JJ, Velasco-Ortega E. Worldwide pattern of antibiotic prescription in endodontic infections. *Int Dent J*. 2017 Apr 17. doi: 10.1111/idj.12287.

Shah MQ, Zardad MS, Khan A, Ahmed S, Awan AS, Mohammad T. Surgical site infection in orthopaedic implants and its common bacteria with their sensitivities to antibiotics, in open reduction internal fixation. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2017a Jan-Mar;29(1):50-3.

Shah SA, Ishinaga H, Takeuchi K. Oxytetracycline inhibits mucus secretion and inflammation in human airway epithelial cells. *Chemotherapy*. 2017b;62(5):301-6. doi: 10.1159/000475983.

Shahi RG, Albuquerque MTP, Munchow EA, Blanchard SB, Gregory RL, Bottino MC. Novel bioactive tetracycline-containing electrospun polymer fibers as a potential antibacterial dental implant coating. *Odontology*. 2017 Jul;105(3):354-63. doi: 10.1007/s10266-016-0268-z.

Shalaby S, Salz U. Application of polymers in the therapy for gingivitis, periodontitis, and treatment of dry socket. In: *Polymers for Dental and Orthopedic Applications*. Boca Raton: CRC Press; 2006. p. 145-68.

Shao X, Goh JC, Hutmacher DW, Lee EH, Zigang G. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Tissue Eng*. 2006 Jun;12(6):1539-51.

Sharif S, Ai J, Azami M, Verdi J, Atlasi MA, Shirian S, et al. Collagen-coated nano-electrospun PCL seeded with human endometrial stem cells for skin tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017 Aug 9. doi: 10.1002/jbm.b.33966.

Sigron GR, Pourmand PP, Mache B, Stadlinger B, Locher MC. The most common complications after wisdom-tooth removal: part 1: a retrospective study of 1,199 cases in the mandible. *Swiss Dent J*. 2014;124(10):1042-6, 52-6.

Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008 May;29(13):1989-2006. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.

Singh A, Rath G, Goyal AK. Nanofibers: An effective tool for controlled and sustained drug delivery. *Curr Drug Deliv*. 2018 Feb 14;15(2):155-166. doi: 10.2174/1567201814666171002115230.

Siqueira-Junior JF, Dantas CJS. *Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2000.

Sorensen DC, Preisch JW. The effect of tetracycline on the incidence of postextraction alveolar osteitis. *J Oral Maxillofac Surg*. 1987 Dec;45(12):1029-33.

Soundia A, Hadaya D, Esfandi N, de Molon RS, Bezouglaia O, Dry SM, et al. Osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice after extraction of teeth with periradicular disease. *Bone*. 2016 Sep;90:133-41. doi: 10.1016/j.bone.2016.06.011.

Stanzione M, Petillo O, Calarco A, Valarezo E, Napoli M, Longo P, et al. Enhanced in vitro antitumor activity of a titanocene complex encapsulated into polycaprolactone (PCL) electrospun fibers. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2013 Jun 24;11(1):e61-70. doi: 10.5301/jabfm.5000155.

Stebbins ND, Ouimet MA, Uhrich KE. Antibiotic-containing polymers for localized, sustained drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 Nov 30;78:77-87. doi: 10.1016/j.addr.2014.04.006.

Steinberg D, Friedman M. Sustained-release drug delivery of antimicrobials in controlling of supragingival oral biofilms. *Expert Opin Drug Deliv*. 2017 Apr;14(4):571-81. doi: 10.1080/17425247.2016.1213239.

Stone DU, Chodosh J. Oral tetracyclines for ocular rosacea: an evidence-based review of the literature. *Cornea*. 2004 Jan;23(1):106-9.

Swanson AE. A double-blind study on the effectiveness of tetracycline in reducing the incidence of fibrinolytic alveolitis. *J Oral Maxillofac Surg*. 1989 Feb;47(2):165-7.

Sweet JB, Butler DP. The relationship of smoking to localized osteitis. *J Oral Surg*. 1979 Oct;37(10):732-5.

Taberner-Vallverdu M, Nazir M, Sanchez-Garces MA, Gay-Escoda C. Efficacy of different methods used for dry socket management: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015 Sep 1;20(5):e633-9. doi: 10.4317/medoral.20589.

Takemoto M, Gauer L, Zago C, de Andrade M, Tagliari D. Prevenção e tratamento de alveolites. *Rev Tecnol*. [Internet]. 2015 [citado 5 Feb 2018];3(2):51-9. Disponível em: <https://uceff.edu.br/revista/index.php/revista/article/view/73>.

Tarakji B, Saleh LA, Umair A, Azzeghaiby SN, Hanouneh S. Systemic review of dry socket: aetiology, treatment, and prevention. *J Clin Diagn Res*. 2015 Apr;9(4):Ze10-3. doi: 10.7860/jcdr/2015/12422.5840.

Tardast A, Sjoman R, Loes S, Abtahi J. Bisphosphonate associated osteomyelitis of the jaw in patients with bony exposure: prevention, a new way of thinking. *J Appl Oral Sci*. 2015 May-Jun;23(3):310-4. doi: 10.1590/1678-775720140506.

Tasoulas J, Daskalopoulos A, Droukas C, Nonni A, Nikitakis NG. An unusual microscopic pattern of foreign body reaction as a complication of dry socket management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017 Aug 31. doi: 10.1016/j.oooo.2017.08.010.

Tavares W. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2014.

Tham AY, Gandhimathi C, Praveena J, Venugopal JR, Ramakrishna S, Kumar SD. Minocycline loaded hybrid composites nanoparticles for mesenchymal stem cells differentiation into osteogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016 Jul 28;17(8). doi: 10.3390/ijms17081222.

Tiwari A, Prabakaran M. An amphiphilic nanocarrier based on guar gum-graft-poly(epsilon-caprolactone) for potential drug-delivery applications. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2010;21(6-7):937-49. doi: 10.1163/156856209x452278.

Tonglairoum P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Kaomongkolgit R, Opanasopit P. Fabrication and evaluation of nanostructured herbal oil/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin/polyvinylpyrrolidone mats for denture stomatitis prevention and treatment. *AAPS PharmSciTech*. 2016 Dec;17(6):1441-9. doi: 10.1208/s12249-016-0478-2.

Trombelli L, Farina R, Marzola A, Bozzi L, Liljenberg B, Lindhe J. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *J Clin Periodontol*. 2008 Jul;35(7):630-9. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01246.x.

Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*. 2007 Mar;38 Suppl 1:S11-25. doi: 10.1016/j.injury.2007.02.006.

Uskokovic V. Nanostructured platforms for the sustained and local delivery of antibiotics in the treatment of osteomyelitis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2015;32(1):1-59.

Valizadeh A, Mussa Farkhani S. Electrospinning and electrospun nanofibres. *IET Nanobiotechnol*. 2014 Jun;8(2):83-92. doi: 10.1049/iet-nbt.2012.0040.

Varshosaz J, Tavakoli N, Saidian S. Development and physical characterization of a periodontal bioadhesive gel of metronidazole. *Drug Deliv*. 2002 Apr-Jun;9(2):127-33. doi: 10.1080/10426500290095601.

Vezeau PJ. Dental extraction wound management: medicating postextraction sockets. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000 May;58(5):531-7.

Vicente D, Pérez-Trallero E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010 Feb;28(2):122-30. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>.

Vieira AE, Repeke CE, Ferreira Junior Sde B, Colavite PM, Biguetti CC, Oliveira RC, et al. Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. *PLoS One*. 2015;10(5):e0128021. doi: 10.1371/journal.pone.0128021.

Viera PVA. Complexação de guaiacol com β -ciclodextrina para tratamento de alveolite seca: avaliação in vitro e in vivo [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016 [citado 7 Jul 2017]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23147/tde-24052016-114506/>.

Vlcek D, Razavi A, Kuttenger JJ. Wound management and the use of mouth rinse in mandibular third molar surgery. *Swiss Dent J*. 2015;125(10):1085-93.

Voss PJ, Matsumoto A, Alvarado E, Schmelzeisen R, Duttenger F, Poxleitner P. Treatment of stage II medication-related osteonecrosis of the jaw with necrosectomy and autologous bone marrow mesenchymal stem cells. *Odontology*. 2017 Oct;105(4):484-93. doi: 10.1007/s10266-017-0295-4.

Wallace ML, Neville BW. Myospherulosis. Report of a case. *J Periodontol*. 1990 Jan;61(1):55-7. doi: 10.1902/jop.1990.61.1.55.

Wang H, Liu J, Tao S, Chai G, Wang J, Hu FQ, et al. Tetracycline-grafted PLGA nanoparticles as bone-targeting drug delivery system. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:5671-85. doi: 10.2147/ijn.s88798.

Wang HL, Weber D, McCauley LK. Effect of long-term oral bisphosphonates on implant wound healing: literature review and a case report. *J Periodontol*. 2007 Mar;78(3):584-94. doi: 10.1902/jop.2007.060239.

Wang TH, Liu CJ, Chao TF, Chen TJ, Hu YW. Risk factors for and the role of dental extractions in osteoradionecrosis of the jaws: A national-based cohort study. *Head Neck*. 2017 Mar 28;39(7):1313-21. doi: 10.1002/hed.24761.

Wegenast S. Observe the healing process. *Br Dent J*. 2013 Mar;214(5):217. doi: 10.1038/sj.bdj.2013.226.

Xu JL, Sun L, Liu C, Sun ZH, Min X, Xia R. Effect of oral contraceptive use on the incidence of dry socket in females following impacted mandibular third molar extraction: a meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Sep;44(9):1160-5. doi: 10.1016/j.ijom.2015.05.017.

Xue J, Xie J, Liu W, Xia Y. Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications. *Acc Chem Res*. 2017 Aug 15;50(8):1976-87. doi: 10.1021/acs.accounts.7b00218.

Yahalom R, Ghantous Y, Peretz A, Abu-Elnaaj I. The possible role of dental implants in the etiology and prognosis of osteomyelitis: a retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016 Sep-Oct;31(5):1100-9. doi: 10.11607/jomi.4527.

Yao Q, Cosme JG, Xu T, Miszuk JM, Picciani PH, Fong H, et al. Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. *Biomaterials*. 2017 Jan;115:115-27. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.11.018.

Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2003 May;24(12):2077-82.

Yue IC, Poff J, Cortes ME, Sinisterra RD, Faris CB, Hildgen P, et al. A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(17):3743-50. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.113.

Yugoshi LI, Sala MA, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Braz Dent J*. 2002;13(2):92-6. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402002000200003>.

Zahedi P, Rezaeian I, Seyed-Hassan J, Mahdavian P, Abdolghaffari AH, Abdollahi M. Preparation and performance evaluation of tetracycline hydrochloride loaded wound dressing mats based on electrospun nanofibrous poly(lactic acid)/poly(ϵ -caprolactone) blends. *J Appl Polym Sci*. 2011;124(5):4174-83. doi: 10.1002/app.35372.

Zeng J, Chen X, Liang Q, Xu X, Jing X. Enzymatic degradation of poly(L-lactide) and poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers. *Macromol Biosci*. 2004 Oct;4:1118–25. doi: 10.1002/mabi.200400092.

Zhou J, Hu B, Liu Y, Yang Z, Song J. The efficacy of intra-alveolar 0.2% chlorhexidine gel on alveolar osteitis: a meta-analysis. *Oral Dis.* 2017 Jul;23(5):598-608. doi: 10.1111/odi.12553.

Zhou X, Zhang P, Zhang C, An B, Zhu Z. Tetracyclines inhibit rat osteoclast formation and activity in vitro and affect bone turnover in young rats in vivo. *Calcif Tissue Int.* 2010 Feb;86(2):163-71. doi: 10.1007/s00223-009-9328-5.

Zong X, Kim K, Fang D, Ran S, Hsiao BS, Chu B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer.* 2002 Jul;43(16):4403-12. doi: [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00275-6](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00275-6).

Zuniga JR, Leist JC. Topical tetracycline-induced neuritis: a case report. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995 Feb;53(2):196-9. doi: 10.1016/0278-2391(95)90402-6.

ANEXO A – Parecer da Comissão de ética no Uso de Animais (FOUSP)

Fundada em 1900
"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Nanofibras poliméricas carregadas com guaiacol: β -ciclodextrina para o tratamento de alveolite seca", registrada com o nº 003/2016, sob a responsabilidade de Maria Aparecida Borsatti, Patrícia Verónica Aulestia Viera, Alinne Damásia Martins Gomes, Marililce Fagundes dos Santos, Maria Esperanza Cortes Segura, 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 11/04/2016.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	11/04/2016 a 10/04/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato Heterogênico, Albinus Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	250g / 3 meses
Sexo	Masculino
Origem	Biotério do ICB

São Paulo, 14 de abril de 2016.

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

ANEXO B – Emenda do Parecer da Comissão de ética no Uso de Animais (FOUSP)

Fundada em 1900
"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

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

São Paulo, 10 de agosto de 2017.

CEUA/FOUSP/Of.27

Senhora Pesquisadora,

Em resposta à solicitação de alteração de Protocolo já aprovado pela CEUA/FOUSP sob o número 003/2016, no que diz respeito ao tamanho da amostra, de 60 para 84 animais e no título de: "*Nanofibras poliméricas carregadas com guaiacol:β-ciclodextrina para tratamento de alveolite seca*", para: "**Nanofibras poliméricas para tratamento de alveolite seca**", informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da USP em reunião ordinária realizada em 07 de agosto de 2017, aprovou sua solicitação.

Atenciosamente,

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

Ilma. Senhora
Profa. Dra. **Maria Aparecida Borsatti**
ODE

ANEXO C – Parecer da Comissão de ética no Uso de Animais (ICB/USP)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Nanofibras poliméricas carregadas com guaiacol:β-ciclodextrina para tratamento de alveolite seca**", registrado sob o protocolo nº **77/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **09/08/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Maria Aparecida Borsatti**

- Departamento: *FOUSP - Estomatologia*

- Membros da Equipe: *Marinilce Fagundes dos Santos (Credenciado PG), Patricia Verónica Aulestia Viera (Pós-graduando), Cyro Ferraz de Sampaio Barros Neto (Iniciação científica), Lucas Maia Nogueira (Iniciação científica)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "**Polimeric nanofibers containing guaiacol:β-cyclodextrin for the treatment of dry socket**", protocol nº **77/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **8/9/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Maria Aparecida Borsatti**

- Team members: *Marinilce Fagundes dos Santos (Graduate Supervisor), Patricia Verónica Aulestia Viera (Graduate Student), Cyro Ferraz de Sampaio Barros Neto (Undergraduate Student), Lucas Maia Nogueira (Undergraduate Student)*.

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Albinus Wistar</i>	<i>Macho/Male</i>	250 g	60

São Paulo, 10 de agosto de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP