

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**ALANA CUNHA CLARO SANTOS**

**EFEITO DO CHÁ VERDE NO PROCESSO DE  
REPARO ALVEOLAR DE RATOS TRATADOS COM  
BIFOSFONATO**

BAURU  
2014

**ALANA CUNHA CLARO SANTOS**

**EFEITO DO CHÁ VERDE NO PROCESSO DE  
REPARO ALVEOLAR DE RATOS TRATADOS COM  
BIFOSFONATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de Graduação em Odontologia, sob orientação da Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva.

BAURU  
2014

Santos, Alana Cunha Claro.

S2373e

Efeito do chá verde no processo de reparo alveolar de ratos tratados com bifosfonato / Alana Cunha Claro Santos -- 2014.  
34f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva.

Coorientadora: Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Bisfosfonatos. 2. Chá verde. 3. Ratos. 4. Reparo alveolar. 5. Reparo ósseo. I. Saraiva, Patrícia Pinto. II. Matsumoto, Mariza Akemi. III. Título.

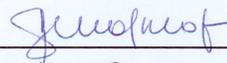
### **ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Alana Cunha Claro Santos.

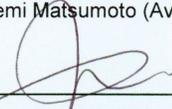
Ao dia três de novembro de dois mil e quatorze, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de ALANA CUNHA CLARO SANTOS, intitulado: **“Efeito do chá verde no processo de reparo alveolar de ratos tratados com bisfosfonato.”** Compuseram a banca examinadora os professores Dra. Patrícia Pinto Saraiva (orientadora), Dra. Mariza Akemi Matsumoto e Dr. Roberto Yoshio Kawakami. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, APROVADA, com a nota 10,0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pela Orientadora e pelos demais membros da banca.



\_\_\_\_\_  
Dra. Patrícia Pinto Saraiva (Orientadora)



\_\_\_\_\_  
Dra. Mariza Akemi Matsumoto (Avaliador 1)



\_\_\_\_\_  
Dr. Roberto Yoshio Kawakami (Avaliador 2)

**ALANA CUNHA CLARO SANTOS**

**EFEITO DO CHÁ VERDE NO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR  
DE RATOS TRATADOS COM BIFOSFONATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Graduação em Odontologia, sob orientação da Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva.

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva  
Universidade do Sagrado Coração

---

Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA-Unesp

---

Prof. Dr. Roberto Yoshio Kawakami  
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 03 de Novembro de 2014.

Dedico este trabalho à Deus por possibilitar a realização de meus planos. Foi o senhor, mais do que ninguém, que me permitiu sonhar e realizar este momento. E, com certeza, será o Senhor que guiará minhas mãos, meus olhos e minhas decisões a cada paciente. Obrigado por ter estado e continuar ao meu lado. A Ti, Senhor, dedico essa etapa de minha vida, confiando que continuarás a conduzir meus passos. Dedico também este trabalho aos meus pais por todo apoio, confiança e por não medirem esforços para que este sonho pudesse ser realizado.

## AGRADECIMENTOS

Á **Deus** que me presenteou com o bem mais precioso, a vida, e com ela a capacidade para pensar, amar e lutar pela conquista de meus ideais. Sem a sua misericordiosa graça e intervenção nada disto teria sido possível.

A minha orientadora **Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva** pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão e paciência na orientação. À **Profa. Mariza Akemi Matsumoto** pelo empenho, suporte, correções e incentivo; pelo carinho com que sempre me dirigiu em cada conversa e email; por toda atenção, paciência e confiança; e por todo conhecimento transmitido. Ao **Prof. Dr. Roberto Yoshio Kawakami** que com dedicação e sabedoria soube dirigir-me os passos e os pensamentos para o alcance de meus objetivos.

Ao **Coordenador Prof. Dr. Fernando Accorsi Orosco** e demais **professores do curso de Odontologia da USC**, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta monografia.

Á **Dra. Claudia de Almeida Prado e Piccino Sgavioli** por ter conduzido a minha formação profissional e pelo incentivo e colaboração dedicados durante todos estes anos de curso.

Em especial ao **Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan** e ao **Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva** pelo caráter e profissionalismo. Vocês compartilharam suas experiências de vida e me deram apoio nas horas mais difíceis dessa caminhada. Das mais variadas formas, dedicaram-se a me transmitir uma das maiores virtudes que se pode ter: o conhecimento. Suas atitudes, ensinamentos, exemplos e incentivos colaboraram para que eu fosse além dos meus limites e medos. Obrigada por me ensinar a questionar, a duvidar, a pensar, a sonhar e a me apaixonar pela Endodontia.

Aos colegas de profissão **Christiano Napoleone Churi Gurgel** e **Fabiana Menezes Alvarez** por todo apoio, disponibilidade e pela oportunidade de me transmitir a vivência clínica do cotidiano de um cirurgião dentista.

Aos meus pais **Valdir José dos Santos** e **Adriana Cristina Cunha Claro Santos** e toda minha família que, com muito carinho, amor e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. A vocês, Pai e Mãe, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade; que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhassem sem medo e cheios de esperanças; que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudessem realizar os meus e pela longa espera e compreensão durante as longas viagens de finais de semana o meu infinito agradecimento. EU AMO MUITO VOCÊS.

À minha amiga **Angélica Cristina Fonseca** pela amizade, atenção, empenho, disponibilidade, paciência, segurança e confiança passadas e pela ajuda nas incansáveis dúvidas. Obrigada de coração.

Aos meus amigos **Aline Domingues Camiloti, Flavia Maria Limoni, Gilberto Oréfice Marinho, Luana Ribeiro Ferreira, Maria Eduarda de Castro Massola, Mylena Morassi Bueno e Tatiane Silva de Oliveira** por serem minha segunda família aqui em Bauru durante esses quatro últimos anos, obrigada por encher de alegria todos os meus dias, por me ajudarem nos estudos e por me estenderem as mãos nos momentos difíceis. Sentirei muita falta de todos vocês e espero nos reencontrarmos muitas vezes durante a vida. Vocês são jóias preciosas que jamais encontrarei em outro lugar, estarão sempre guardados em meu coração.

Ao meu namorado **Rafael Chueri Gurgel** pela paciência e apoio, por suportar meus defeitos, tolerar meus humores e principalmente por me entender. Agradeço por sempre se fazer presente dando seu carinho, atenção e amor, essenciais para a conclusão deste trabalho.

A todos os **Pacientes da Clínica de Odontologia da USC** por ter confiado em minhas mãos e nos meus conhecimentos durante cada atendimento.

À todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível, especialmente **demais amigos e funcionários das clínicas de odontologia da USC**.

Muito obrigada.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

À Universidade Sagrado Coração USC, representada pela digníssima Reitora Prof.<sup>a</sup> Dra. Irmã Susana de Jesus Fadel.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAP/USC); pelo apoio financeiro concedido em forma de bolsa.

Muito Obrigada.

"Ontem éramos decíduos, hoje somos permanentes,  
nada consegui impactar o sucesso desta erupção."

(Cristiane Tomaz Rocha)

## RESUMO

A osteonecrose dos maxilares induzida por bifosfonatos (BFs) nitrogenados é considerada uma complicação importante quando da necessidade de intervenções cirúrgicas na cavidade bucal, cuja prevenção e tratamento ainda não são bem estabelecidos. Deste modo, o presente estudo propôs analisar o efeito do extrato de chá verde a 1% no reparo de alvéolos dentários em animais tratados com BF. Sessenta ratos albinos Wistar machos adultos foram distribuídos em quatro grupos, de acordo com o tratamento: Grupo C – Controle, animais tratados com soro fisiológico 0,9% via endovenosa (EV), Grupo CV – tratados com chá verde a 1% na água de beber, Grupo ZL - tratados com ácido zoledrônico via EV, Grupo ZL+CV - tratados com ácido zoledrônico via EV e administração de chá verde a 1% na água de beber. A droga foi administrada na dose de 0,035 mg/Kg via EV a cada duas semanas. Após quatro semanas do início da administração do BF, foram realizadas as extrações dos dentes molares superiores do lado direito dos animais de todos os grupos, quando se iniciou a administração de chá verde a 1% aos animais dos grupos CV e ZL+CV. Após os períodos de 7, 14 e 28 dias das extrações dentárias os animais foram eutanasiados e os espécimes removidos para serem submetidos à análise microscópica morfológica. Os alvéolos do Grupo C repararam de acordo com morfologia e cronologia normais. Os alvéolos dos grupos experimentais apresentaram padrão morfológico de reparo similar, com persistência de exposição da superfície óssea no decorrer dos períodos, associado à adesão de biofilme bacteriano tipo *Actinomyces* spp. O Grupo CV apresentou moderada atividade osteoclástica e discreta osteogênese, enquanto que nos Grupos ZL e ZL+CV o reparo alveolar não havia ocorrido até os 28 dias, com evidente instalação do quadro de osteonecrose dos maxilares. Deste modo, concluiu-se que a ingestão do chá verde não melhorou o reparo dos alvéolos em comparação ao grupo controle. Do mesmo modo, também não contribuiu de maneira importante para o reparo na associação do ácido zoledrônico observando-se as mesmas características histológicas quando comparado aos animais que receberam o ácido zoledrônico isoladamente.

**Palavras-chave:** Bisfosfonatos. Chá verde. Ratos. Reparo alveolar. Reparo ósseo.

## ABSTRACT

Nitrogen containing bisphosphonate (BPs) induced osteonecrosis of the jaws is considered a relevant complication in the necessity of oral surgery procedure and which prevention and treatment are still not completely known. Considering this information, this study aimed to analyze the effect of 1% green tea in the repair of dental sockets repair of animals treated with BP. Sixty adult male Wistar rats were distributed into four groups, according to the treatment: Group C – Control, animals treated with 0.9% saline solution endovenously (EV), Group CV – treated with 1% green tea in drinking water, Group ZL – treated with zoledronic acid EV, Group ZL + CV – treated with zoledronic acid EV and 1% green tea in drinking water. The drug was administered in the dosis of 0.035 mg/Kg EV every two weeks. After four weeks from the beginning of BP administration, the upper right molars of all animals were removed, and 1% green tea started to be offered to the animals of CV and ZL+CV groups. After 7, 14, and 28 days of the dental extractions, the animals were euthanized and the specimens removed to be prepared for microscopical analysis. Sockets from Group C healed according to normal morphology and chronology. Sockets from experimental groups presented a similar pattern of repair, with persistence of bone surface exposure during the periods, associated to the *Actinomyces ssp.* bacterial biofilm adhesion. Group CV presented moderate osteoclastic activity and slight osteogenesis, while Groups ZL and ZL+CV socket healing was not finished until day 28, with evident installation of osteonecrosis. From these results, it was concluded that the ingestion of the green tea did not improve sockets repair in comparison to control animals. In the same way, it did not contribute in an important way for the repair in the presence of BP, being observed the same histological characteristics when comparing with the animals treated with zoledronic acid alone.

**Keywords:** Bisphosphonate. Green tea. Rats. Alveolar repair. Bone repair.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	16
3.1	ANÁLISE MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA .....	16
3.1.1	Grupo controle .....	16
3.1.2	Grupo chá verde.....	16
3.1.3	Grupo ácido zoledrônico.....	17
3.1.4	Grupo chá verde + ácido zoledrônico .....	18
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	26
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
	<b>ANEXO A - OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA DA FOB USP</b> .....	31

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Os bifosfonatos (BFs) são drogas sintéticas análogas ao pirofosfato orgânico, diferindo em sua composição química pela presença de um átomo de carbono ligado a dois grupos fosfatos (P-C-P) no lugar do oxigênio do pirofosfato (P-O-P), o que os tornam altamente resistentes à hidrólise sob condições ácidas e à ação das pirofosfatases. (DIMITRAKOPOULOUS et al., 2006). São drogas indicadas para o tratamento das desordens do metabolismo do cálcio como osteoporose, metástases ósseas, mieloma múltiplo, e Doença de Paget por sua alta afinidade pela hidroxiapatita (HA). (ROSEN et al, 2001; SAAD et al, 2002). São rapidamente depositados no tecido ósseo – cerca de 24 a 48 horas – e lentamente metabolizados (FISHER et al., 2000), possivelmente somente durante o processo de reabsorção. (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011). A baixa concentração sérica da droga e a rápida afinidade e incorporação na matriz óssea explicam sua baixa toxicidade. (LAWSON, 2010).

Os BFs classificam-se em dois grupos, os nitrogenados e os não-nitrogenados, de acordo com a introdução de um átomo de nitrogênio em sua estrutura molecular na cadeia lateral R<sub>2</sub>, o que potencializa sua ação antirreabsortiva. (SHINODA et al., 1983). No entanto, a habilidade dos BFs de se ligarem a HA também depende da cadeia lateral R<sub>1</sub>, quando a mesma carrega um grupo hidroxil nesta posição (VAN BEEK et al., 1994), como o alendronato, risedronato e ibandronato. Alguns fatores influenciam a capacidade de absorção da droga pelo organismo, como a via de administração e apresentação, e o uso concomitante com a alimentação e ingestão de cálcio. No entanto, os BFs mais potentes são administrados de forma endovenosa (EV), como o zoledronato e o pamidronato, sendo indicados para o tratamento de metástases ósseas, mielomas múltiplos e hipercalecemia severas. (MARX et al., 2005). De acordo com Tarassof e Csermak (2003), por volta de 2,5 milhões de indivíduos faziam uso destas formas de BF.

Os BFs não nitrogenados são metabolizados para formar análogos da adenosina trifosfato (ATP) tóxicos que se acumulam no interior dos osteoclastos e o levam a apoptose. Já os nitrogenados inibem a via mevalonato dos osteoclastos que regula a biossíntese de proteínas isoprenoides para modificação lipídica de GTPases, como a farnesildifosfato e a geranilgeranildifosfato, causando alterações em seu citoesqueleto e, conseqüentemente, impedindo a formação da borda corrugada, essencial para o processo de reabsorção, e do tráfego vesicular. (GUTTA; LOUIS, 2007). A inibição prolongada da reabsorção óssea altera a viabilidade do tecido ósseo, o qual depende do processo de remodelação fisiológico,

acarretando na morte dos osteócitos no interior da matriz óssea. (MARX, 2003). Não ocorrendo a substituição dos osteócitos, o sistema capilar também não se mantém, podendo levar a uma condição de necrose óssea avascular. (MCLEOD, 2007; SARIN, 2008; RUGGIERO, WOO, 2008). No entanto, estudo recente mostrou que nos ossos não manipulados cirurgicamente em animais tratados com alendronato não há registro de morte dos osteócitos. (ABTAHI et al, 2012).

Marx (2003) comunicou a identificação de 36 pacientes pela Divisão de Cirurgia Bucomaxilofacial da Universidade de Miami, com exposição óssea sintomatológica em maxilas e mandíbulas, todos em tratamento com zoledronato ou pamidronato via EV, os quais não respondiam à terapêutica medicamentosa. Desde então, inúmeros outros casos similares foram sendo relatados, sendo esta condição denominada osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos (OMIB). Estima-se que a possibilidade de se desenvolver a OMIB utilizando-se BFs por via oral varia de 0,01 a 0,04% (MAVROKOKKI et al., 2007), enquanto que por via EV esta porcentagem sobe para 0,8 a 12%. (BAMIAS et al., 2005; DIMOPOULOS et al., 2005). Pacientes com história de doença bucal inflamatória, abscesso periodontal, presença de infecção aguda ou crônica, tem maior risco de desenvolverem osteonecrose quando submetidos à terapêutica com BFs. (KUMAR, 2008; MIGLIORATI, 2006).

De acordo com Woo et al. (2006), 60% de todos os casos de osteonecrose descritos na literatura ocorreram depois de uma cirurgia dento-alveolar (extração dentária) e os 40% restantes foram associados à infecção, ao trauma de próteses removíveis ou a outro trauma físico. Além disso, a própria condição sistêmica que leva ao uso destes medicamentos contribui para a facilitação desta condição. No entanto, em modelos animais, a administração parenteral do ácido zoledrônico é capaz de desenvolver a osteonecrose após a realização de cirurgias bucais, sem que fatores sistêmicos ou locais sejam associados. (BIASOTTO et al., 2010; MAAHS et al., 2010). HOKUGO et al. (2010) induziram a OMIB experimental em ratos saudáveis por meio de injeções EV de 35 µg/Kg a cada duas semanas considerando a posologia indicada para humanos. Após três semanas do início das injeções, as extrações dentárias foram realizadas mantendo-se a administração da droga até o final do experimento de oito semanas.

Não existem provas científicas que apoiem a descontinuação da terapia dos BFs como forma de promover a cicatrização dos tecidos ósseos necrosados na cavidade bucal. A descontinuação da terapia pode ser discutida com o clínico responsável, devendo-se considerar os riscos e benefícios da sua descontinuação. A meia-vida dos BFs é longa, e dessa

forma, a interrupção da terapia por alguns meses pode ter efeito mínimo, uma vez que já se incorporou nos ossos. (MIGLIORATI et al., 2006). O tratamento dos pacientes que desenvolvem a OMIB é difícil e as opções terapêuticas são escassas. (ENGROFF et al., 2007; FREIBERG et al., 2007). RUGGIERO et al. (2009) apresentaram o posicionamento da Sociedade Americana dos Cirurgiões Bucomaxilofaciais com relação à prevenção e tratamento das OMIBs de acordo com o estágio da doença, incluindo o uso de antibióticos tópicos e sistêmicos e debridamento cirúrgico.

Sabe-se que as terapias alternativas representam um importante e crescente papel na prevenção e tratamento de doenças de etiologias variadas. (TOMATA et al., 2012). A ação anti-oxidante derivada de componentes polifenólicos (catequinas) de plantas como o chá verde (*Camellia sinensis*) tem se mostrado efetiva em inúmeras condições, incluindo as desordens do tecido ósseo. (SHEN et al., 2011; SHEN et al., 2011). Dentre eles, incluem epigalocatequina galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), epicatequina (EC) e epigalocatequina (EGC), sendo a EGCG a catequina mais abundante. (YANG et al., 2000). No entanto, por sua ação protetora do tecido ósseo especialmente em processos reabsortivos, a administração do chá verde em pacientes sob tratamento com BFs poderia potencializar seus efeitos, aumentando o risco das OMIBs. Estudos demonstram a direta influência das catequinas na diferenciação e ativação osteoclástica por várias vias, incluindo as vias MMPs. (YUN et al., 2004; OKA et al., 2012) e RANKL (SATO; TAKAYANAGI, 2006), e na melhora da diferenciação e atividade osteoblástica via fator de transcrição Runx-2 (*Runt-related transcription factor-2*). (CHEN et al., 1994). Por outro lado, a ação da EGCG na osteoporose parece ocorrer pela inibição do processo inflamatório que se instala, mediado por eicosanoides como as ciclo-oxigenase 2 (COX-2), lipoxigenases e óxido nítrico sintase. (TIPOE et al., 2007).

A partir do exposto, propõe-se avaliar os efeitos da ingestão do extrato de chá verde a 1% na água de beber no reparo de alvéolos dentários após a exodontia de molares de ratos tratados com ácido zoledrônico, a fim de se analisar sua ação no processo de reparação do tecido ósseo e mucosa por meio de morfologia microscópica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP (protocolo 037/3012). Foram utilizados ratos albinos Wistar machos, com cinco meses de idade e peso aproximado de 400 gramas provenientes do Biotério da Universidade Sagrado Coração (USC). Os animais foram colocados em gaiolas de polipropileno, com cinco animais em cada gaiola, forradas com maravalha branca de pinho autoclavada trocada três vezes por semana. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram no biotério da Universidade do Sagrado Coração – USC - Bauru, sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão, recebendo água e ração sem restrição.

Os animais foram distribuídos em 4 grupos de 15, com 3 diferentes tempos de sacrifício: a – 7 dias, b- 14 dias e c – 28 dias, como se segue: Grupo C a, b, c – controle negativo: animais submetidos à extração dentária e administração de soro fisiológico; Grupo CV a, b, c - animais submetidos à extração dentária e tratados com chá verde a 1% (Chá verde Folhas selecionadas, Mate Leão, Fazenda Rio Grande, PR, Brasil) na água de beber; Grupo ZL a, b, c – animais submetidos à extração dentária e tratados com ácido zoledrônico (Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça); Grupo ZL+CV a, b, c – animais submetidos à extração dentária e tratados com ácido zoledrônico e chá verde a 1% (Chá verde Folhas selecionadas, Mate Leão, Fazenda Rio Grande, PR, Brasil) na água de beber.

Os animais dos Grupos ZL e ZL+CV foram tratados com o ácido zoledrônico administrado via (EV) na veia lateral da cauda, na dose de 0,035 mg/Kg a cada duas semanas, de acordo com Hokugo et al. (2010), continuando até o último período experimental. Cada animal do Grupo CV e ZL+CV recebeu 20 ml de chá verde a 1% na água de beber preparado diariamente por infusão das folhas do chá na proporção de 1 g para 100 ml em água filtrada a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos (MORAES et al., 2011), iniciando no dia das extrações dentárias. Após seis semanas do início da administração do BF, foram realizadas as extrações dos molares superiores do lado direito dos animais de todos os grupos. Os ratos dos Grupos C e CV receberam soro fisiológico 0,9% via EV.

Ao início do delineamento experimental, todos os animais foram submetidos à cirurgia para a extração dentária seguindo-se rígidos princípios de assepsia. Assim, procedeu-se a anestesia geral por meio de injeção intramuscular do anestésico Quetamina a 1% (Francotar, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil) associado ao sedativo Cloridrato de Xilazina a 2% (Virbaxyl 2%, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil), na dosagem recomendada pelo fabricante, de acordo

com o peso corpóreo de cada animal. Após a anestesia, o animal foi acomodado em suporte apropriado em decúbito dorsal para o acesso à cavidade bucal. Foi realizada antissepsia extra e intra-bucal com polivinilpirrolidona a 1% tópico e acomodação de campo estéril fenestrado para a visualização da face. As extrações dos molares superiores foram realizadas inicialmente com auxílio de sindesmótomo para desinserção das fibras gengivais e, posteriormente, com a luxação dos dentes com o uso de instrumental com ponta adaptada para a apreensão do dente na região de furca. Na sequência, os alvéolos foram irrigados com soro fisiológico 0,9%, e aguardou-se o seu preenchimento por coágulo sanguíneo proveniente do sangramento local. Não foi realizada sutura da mucosa. Os animais foram medicados com dipirona 50% via intra-muscular, na dose recomendada pelo fabricante (30mg/Kg) no pós-operatório imediato, enquanto anestesiados.

Após 7, 14 e 28 dias do início das extrações dentárias todos os animais foram sacrificados com sobredosagem anestésica para a remoção dos espécimes (Figura 1). As hemi-maxilas contendo os alvéolos a serem analisados foram removidas com auxílio de lâminas de bisturi e tesouras, fixadas em formalina (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e colocadas em solução de EDTA à 4% para desmineralização dos espécimes, até que os mesmos apresentassem consistência suficiente para a microtomia. Os cortes semi-seriados foram feitos longitudinalmente ao longo eixo do alvéolo dentário, em suas porções mais centrais e corados com Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Goldner.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA**

##### **3.1.1 Grupo controle**

Aos 7 dias observou-se área de exodontia exposta, sem recobrimento por mucosa com alvéolos preenchidos por tecido de granulação rico em vasos sanguíneos e moderadamente infiltrados por leucócitos mononucleares em seu terço apical. Nos terços médio e cervical, predomínio de infiltrado neutrofílico. Após 14 dias, notou-se presença de tecido de granulação predominantemente no terço médio dos alvéolos, com moderado infiltrado inflamatório mononuclear, persistindo o infiltrado neutrofílico nos terços superiores. Notou-se tecido ósseo primário em maturação nas regiões apicais, com presença de numerosos osteoblastos e osteoclastos. No período de 28 dias, observou-se tecido ósseo viável em remodelação, rico em osteócitos e com focos centrais de tecido de granulação. Neste período, a mucosa estava estabelecida, com lâmina própria constituída por tecido conjuntivo fibroso (Figura 2 a, b, c).

##### **3.1.2 Grupo chá verde**

No período de 7 dias observou-se alvéolos expostos apresentando tecido ósseo superficial de aspecto não-viável ausente de osteócitos, com adesão de intenso biofilme associado a focos de intenso infiltrado inflamatório neutrofílico. Nas regiões médias dos alvéolos pode-se notar presença de tecido de granulação permeado por moderado infiltrado inflamatório mononuclear e vasos congestos. Nota-se discreta atividade osteogênica no terço apical, com presença de matriz óssea primária. Após 14 dias, os alvéolos mostravam exposição de tecido ósseo não-viável superficial com adesão de biofilme, por vezes invadindo as lacunas de osteócitos. Notou-se intensa atividade osteoclástica nos fragmentos ósseos não-viáveis. Aos 28 dias a maioria dos espécimes tinha recobrimento parcial do alvéolo. Pode-se observar neoformação óssea no terço apical dos alvéolos pela intensa concentração osteoblástica, bem como de maturação/remodelação marcada pelas linhas basofílicas de reversão, apesar de neste período se observar apenas eventuais osteoclastos (Figura 3 a, b, c).

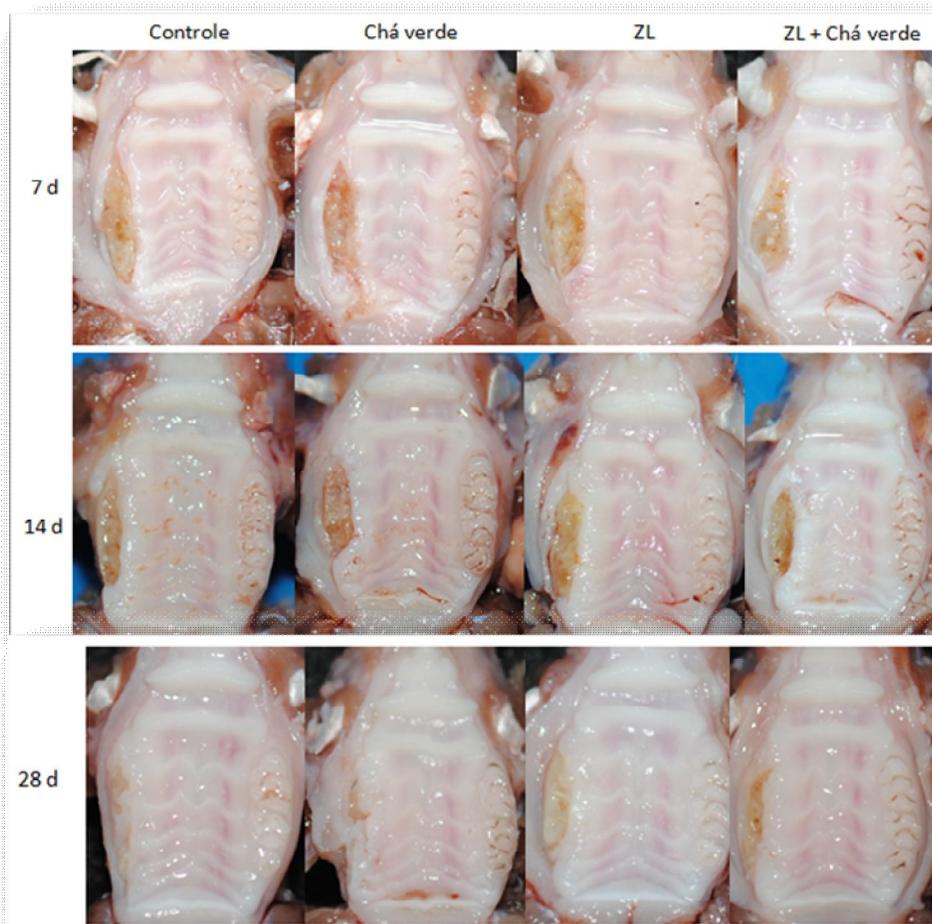


Figura 1 – Aspecto macroscópico das maxilas removidas após os períodos de 7, 14 e 28 dias dos respectivos grupos.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.1.3 Grupo ácido zoledrônico

Aos 7 dias, observou-se alvéolos com superfície óssea exposta recoberta por espesso biofilme bacteriano. O tecido ósseo mostrou-se não viável, em sua maioria, em cujas lacunas não se observavam osteócitos. Nos terços apicais era possível visualizar discreto foco de tecido de granulação com alguns vasos congestionados. Nos terços superiores predominava intenso infiltrado inflamatório neutrofílico. Neste período, não se observou atividade osteoclástica ou osteoblástica. No período de 14 dias persistia o aspecto de tecido ósseo não viável recoberto por biofilme, agora também invadindo os espaços medulares. Intenso infiltrado predominantemente mononuclear preenchia os alvéolos, onde eventualmente se observava presença de osteoclastos nos terços apicais. A persistência de tecido ósseo não-viável exposto

recoberto por espesso biofilme foi observada aos 28 dias, invadindo os canais de Havers e espaços medulares, com mínima atividade osteoclástica. Os alvéolos apresentavam-se preenchidos por intenso infiltrado neutrofílico. De modo interessante, observou-se neste período formação de uma ponte epitelial sob o fragmento ósseo contaminado, vindo da mucosa adjacente (Figura 4 a, b, c).

### **3.1.4 Grupo chá verde + ácido zoledrônico**

No período de 7 dias observou-se exposição de tecido ósseo não-viável, ausente de osteócitos, recoberto por espesso biofilme associado a intenso infiltrado neutrofílico. A presença do biofilme também pode ser vista na superfície interna dos alvéolos, os quais estavam predominantemente preenchidos por infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, além de vasos sanguíneos congestos. Eventual atividade osteoclástica pode ser visualizada. O mesmo quadro se repetiu aos 14 dias, com áreas focais de tecido de granulação nos terços apicais neste período. Persistia discreta atividade osteoclástica, sem atividade osteoblástica. Aos 28 dias o quadro de exposição óssea se manteve, com presença de sequestros ósseos, infiltração por biofilme bacteriano e alvéolos preenchidos por intenso infiltrado inflamatório neutrofílico. A atividade osteoclástica estava praticamente nula no interior dos alvéolos (Figura 5 a, b, c).

Em comum, observou-se a presença de biofilme colonizado por bactérias tipo *Actinomyces* spp., especialmente nos grupos experimentais CV, ZL e ZL+CV (Figura 6).

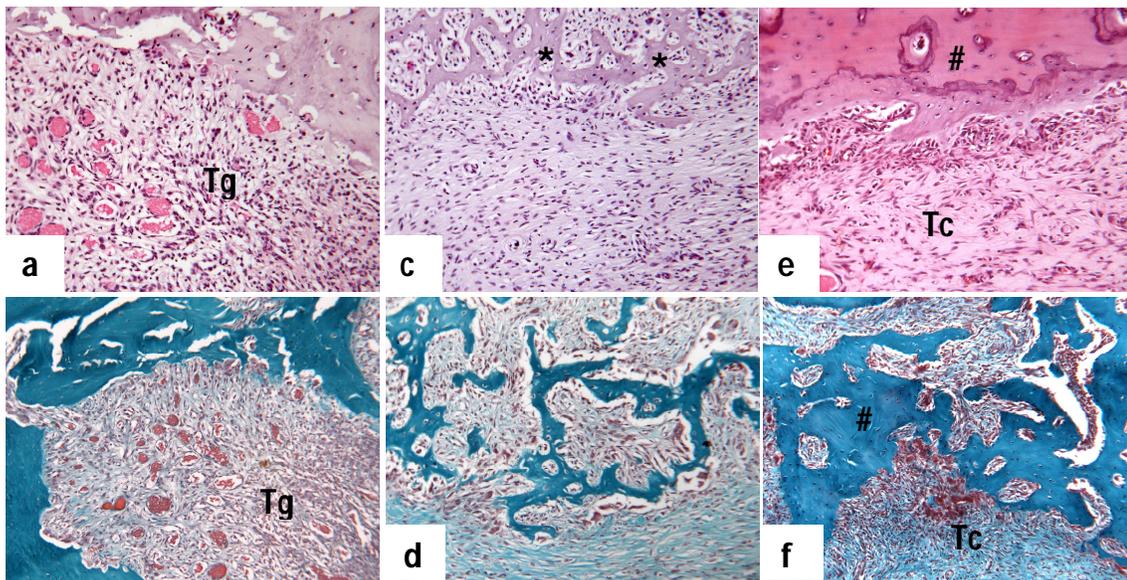
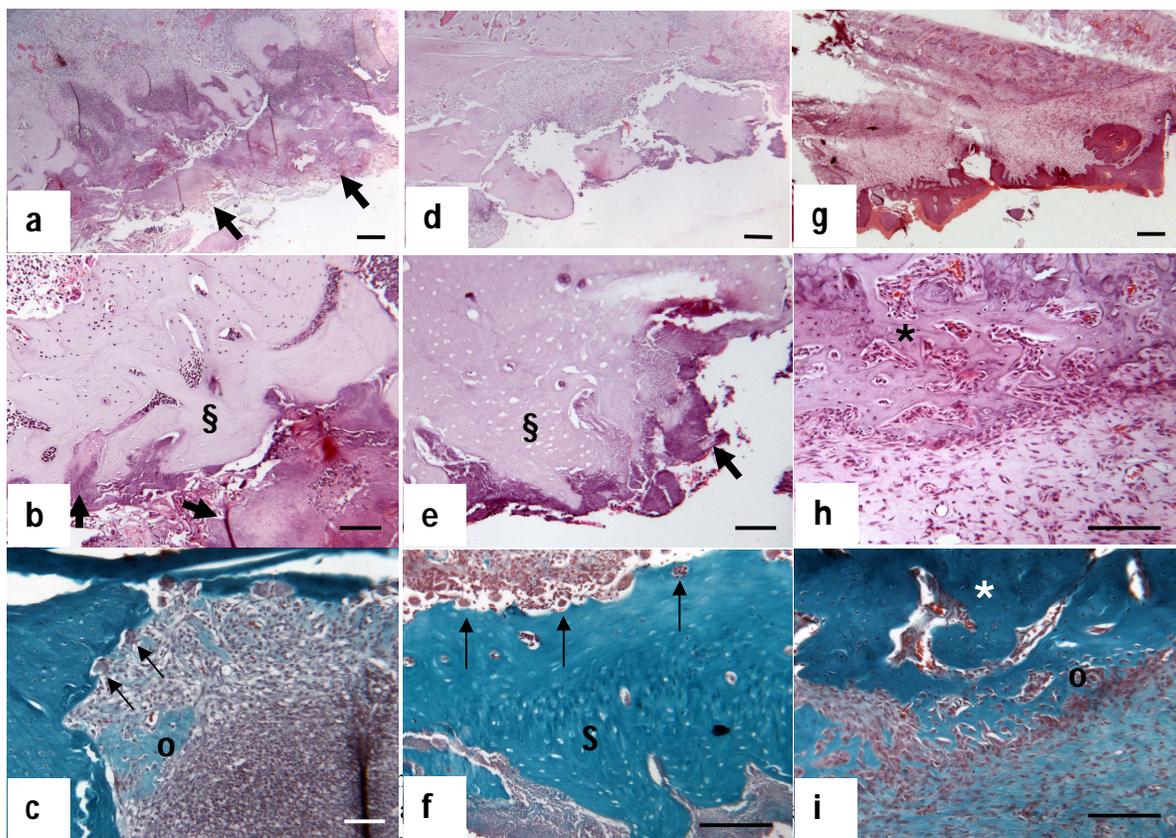


Figura 2 – Grupo Controle

Fonte: Elaborada pela autora

Nota: a, b) 7 dias - tecido de granulação (Tg) infiltrado por leucócitos mononucleares no terço apical; c, d) 14 dias - neoformação óssea apical (\*); e, f) 28 dias - tecido ósseo em remodelação (#) e tecido conjuntivo subepitelial (Tc) (a, c, e – H.E.; b, d, f – Tricrômico de Goldner) (Barra = 200µm)



(O), d, e, f) tecido ósseo superficial não viável (S) e sequestros ósseos (S) sendo reabsorvidos (setas finas); g, h, i) tecido ósseo neoformado (\*) na região apical e atividade osteogênica (O) (a-h – H.E.; c, f, i – Tricrômico de Goldner) (Barra = 200µm)

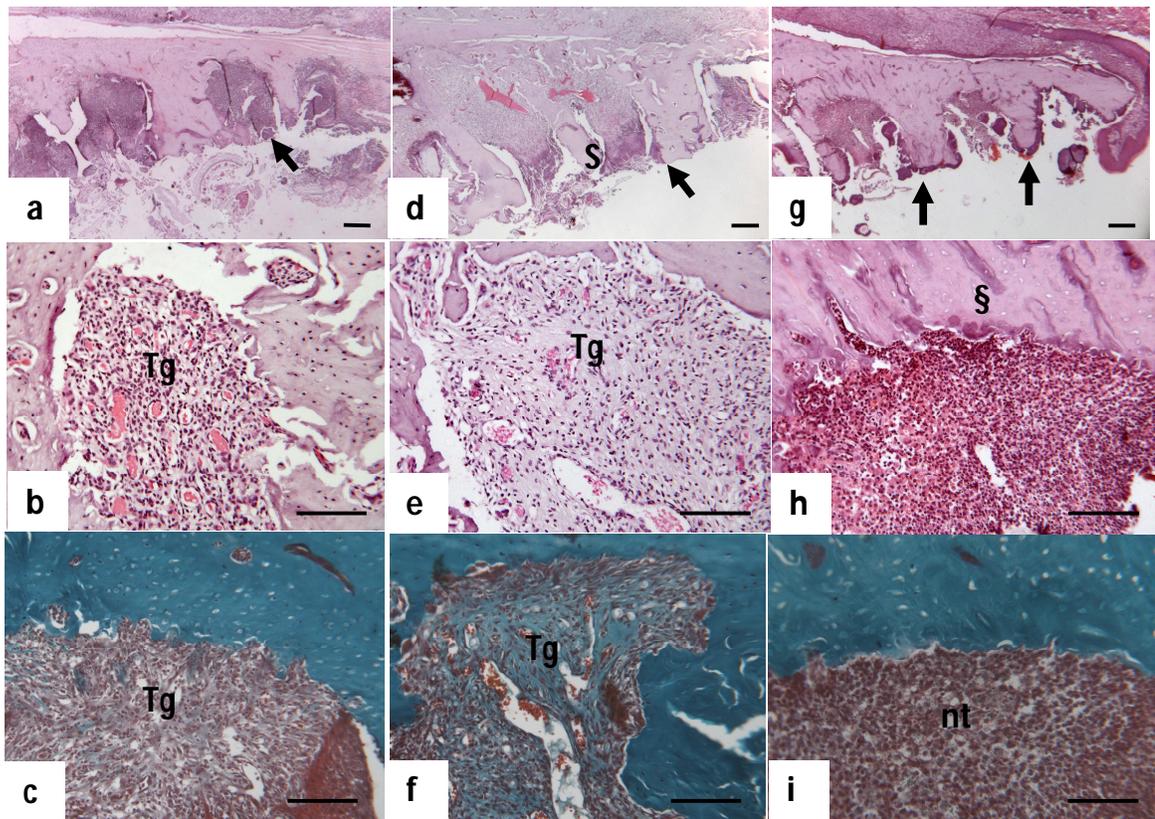


Figura 4 – Grupo ZL

Fonte: Elaborada pela autora

Nota: – a, b, c) 7 dias – biofilme microbiano aderido à superfície óssea exposta (seta grossa) e tecido de granulação (Tg) infiltrado por mononucleares na região de terço apical dos alvéolos; d, e, f) 14 dias – persistência do biofilme (seta grossa) e tecido de granulação, bem como formação de sequestros ósseos (S); g, h, i) 28 dias - intenso infiltrado neutrofilico (nt) no interior dos alvéolos e tecido ósseo não viável (§) constituindo as paredes (a, b, d, e, g, h = H.E.; c, f, i = Tricrômico de Goldner ) (Barra = 200µm)

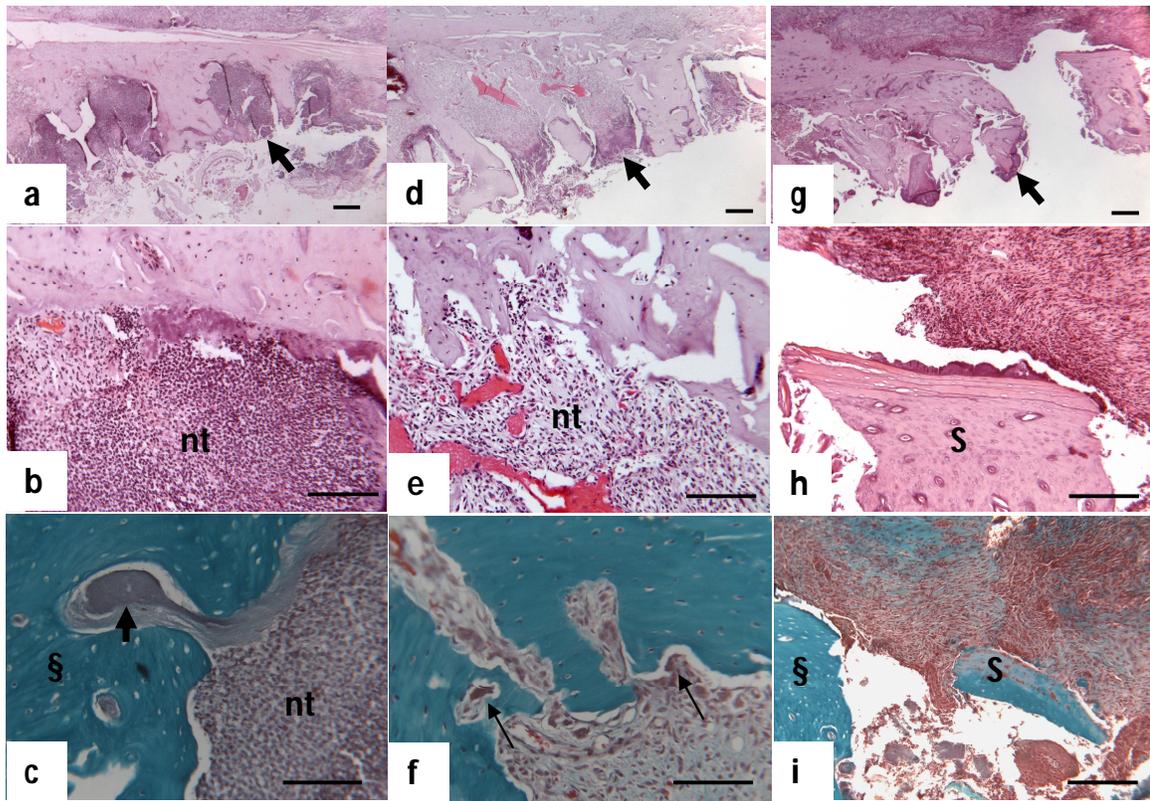


Figura 5 – Grupo ZL+CV

Fonte: Elaborada pela autora

Nota: – a, b, c) 7 dias – exposição da superfície do alvéolo com aderência de biofilme (seta grossa) na superfície e interior do alvéolo, tornando o tecido ósseo não-viável (§). Presença de infiltrado predominantemente neutrofílico (nt). d, e, f) 14 dias – persistência do infiltrado neutrofílico (nt) e discreta atividade osteoclástica no fundo alveolar (setas finas). g, h, i) 28 dias – desorganização tecidual e presença de sequestros ósseos (S) (a, b, d, e, g, h = H.E.; c, f, i = Tricrômico de Goldner) (Barra = 200 $\mu$ m).

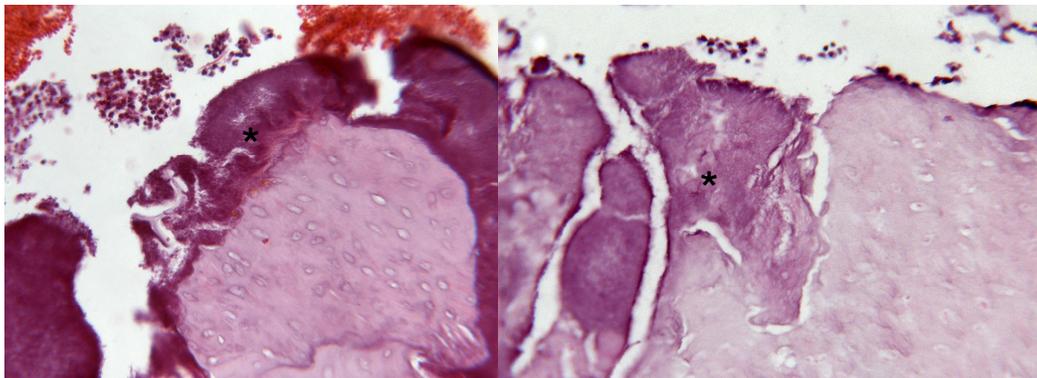


Figura 6 – organização do biofilme caracterizando colonização por *Actinomyces* spp. (\*)  
Fonte: Elaborada pela autora.

## 4 DISCUSSÃO

As propriedades benéficas do chá verde pelo seu poder anti-oxidante tem atraído consumidores em todo o mundo. Sua indicação nas situações de osteoporose chama a atenção por sua comprovada influência sobre as células ósseas. (YUN et al., 2004; OKA et al., 2012), além de seus possíveis mecanismos de osteoproteção por meio de sua ação anti-oxidante, anti-inflamatória, osteoimunológica, na melhora da osteoblastogênese e supressão da osteoclastogênese. (SHEN et al., 2009). Considerando-se estas características propôs-se a avaliação da influência da ingestão do chá verde associada ao uso de bifosfonato nitrogenado endovenoso, uma vez que este também tem como ação principal a supressão do *turnover* ósseo para a melhora e manutenção da massa óssea. Entretanto, esta ação não foi observada durante o processo de reparo ósseo alveolar do presente estudo.

Macrosocopicamente, os alvéolos apresentaram aspectos bastante semelhantes nos períodos de 7 e 14 dias, mostrando uma piora no Grupo ZL aos 28 dias, com exposição mais evidente dos alvéolos ainda neste período. No entanto, os resultados microscópicos não revelaram diferenças importantes entre os grupos experimentais quando comparados ao Grupo Controle. Esperava-se que isoladamente a ação do chá acelerasse o processo de reparo, diminuindo o processo inflamatório e favorecendo a neoformação e maturação óssea. Porém, o que se pôde observar foi um padrão de reparo tecidual atrasado em comparação ao Grupo Controle e bastante similar ao Grupo ZL, com persistência do infiltrado inflamatório neutrofílico ainda aos 14 dias e áreas de exposição óssea aos 28 dias, o mesmo acontecendo quando da associação dos dois produtos.

A ação anti-clastogênica do BF confirmou ser mais eficiente que a do chá verde, uma vez que, com exceção do dia 7, nos demais períodos não foi possível a visualização de osteoclastos no interior dos alvéolos nos espécimes analisados do Grupo ZL. Já nos espécimes do Grupo CV, tal atividade foi observada nos períodos de 7 e 14 dias nas regiões mais profundas do alvéolo. Possivelmente, a influência, mesmo que discreta nestas condições, do chá verde sobre a atividade osteoclástica esteja envolvida no atraso do reparo dos alvéolos, mantendo sua exposição e facilitando a penetração do biofilme bacteriano presente inicialmente na superfície. A preparação do chá verde, considerando a concentração e temperatura, baseou-se em análise realizada no Laboratório de Farmacologia da Universidade Sagrado Coração – USC, sob orientação do prof. Fernando Tozze Alves Neves, a fim de se manter a maior quantidade possível de substâncias anti-oxidantes. Apesar deste cuidado, sua ação não foi suficiente para melhorar o processo de reparo e minimizar os efeitos do BF.

Vários trabalhos confirmam a ação anti-inflamatória eficaz do chá verde, porém em outras condições, como em uveítes induzidas por lipopolissacarídeos. (QIN et al., 2014) e inflamação intestinal. (NICOD et al., 2014). No entanto, faltam estudos sobre os efeitos do chá verde em processos inflamatórios em tecido ósseo.

Uma condição comum a todos os grupos, incluindo o Controle no período de 7 dias, foi a formação de espesso biofilme na superfície dos alvéolos, colonizado por bactérias da espécie *Actinomyces* spp., de acordo com suas características morfológicas. A dificuldade em se definir a patogênese da OMIB leva à sua busca em indícios que se manifestam na doença instalada. Recentemente, De Ceulaer et al. (2014) lançaram a hipótese de a doença ser considerada uma infecção de *Actinomyces* induzida por bifosfonato, devido às semelhanças com a osteomielite causada por esta espécie de bactérias a resposta favorável ao mesmo tratamento, a predileção pelos maxilares, entre outros fatores que tornam as doenças semelhantes, além dos resultados obtidos por meio de revisão de literatura onde a presença destas colônias é predominante. No presente estudo, durante a análise das lâminas, o padrão morfológico do biofilme presente na superfície e nos espaços medulares do tecido ósseo apresentava-se compatível a espécie *Actinomyces*. Do mesmo modo, Koerdt et al. (2014), investigaram o papel destas bactérias na OMIB encontrando colonização por *Actinomyces* spp. em 78,3% dos 23 pacientes avaliados, associado a presença de infiltrado inflamatório neutrofílico e sequestros ósseos, semelhante ao quadro microscópico observado em nossos espécimes tratados com o ZL. No entanto, vale ressaltar que a presença e manutenção deste tipo de biofilme também estava presente no Grupo CV. Apesar desta condição, os alvéolos deste grupo mostraram discreta atividade osteogênica em seu terço apical desde o período inicial, podendo ser visto ainda aos 28 dias. Apesar de os animais do Grupo C terem apresentado o biofilme aos 7 dias, nos demais ele não se mostrava presente. Cabe ressaltar, porém, que esta questão ainda é controversa, pairando a dúvida se os *Actinomyces* iniciam a OMIB ou se a OMIB permite uma colonização e infecção secundárias pelos *Actinomyces*. (DE CEULAER et al., 2014).

## **5 CONCLUSÃO**

A ingestão do chá verde não melhorou o reparo dos alvéolos em comparação ao grupo controle. Do mesmo modo, também não contribuiu de maneira importante para o reparo na associação do ácido zoledrônico observando-se as mesmas características histológicas quando comparado aos animais que receberam o ácido zoledrônico isoladamente.

## REFERÊNCIAS

- ABTAHI, J. et al. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. **Journal of oral pathology e medicine**, Oxford, v. 41, n. 6, p. 494-499, jul. 2012.
- BIASOTTO M. et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. **Journal of oral pathology e medicine**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 390-396, may. 2010.
- CREMERS, S.; PAPAPOULOS, S. Pharmacology of bisphosphonates. **Bone**, New York, v. 49, n. 1, p. 42-49, jul. 2011.
- DE CEULAER, J., TACCONELLI, E.; VANDECASTEELE, S. J. Actinomyces osteomyelitis in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): the missing link? **European journal of clinical microbiology e infectious diseases**, Vieweg, v. 33, n. 11, p. 1873-1880, nov. 2014.
- DE MORAES BB. Et al. Protective effects of green tea against hepatic injury induced by high-cholesterol diet in rats: histopathological analysis, oxidative DNA damage and COX-2 expression. **Hepatology International**. 2011 Jun 21. Doi 10.1007/s12072-011-9275-x
- DIMITRAKOPOULOS I, MAGOPOULOS C, KARAKASIS D. Bisphosphonate-induced avascular osteonecrosis of the jaws: a clinical report of 11 cases. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2006 Jul;35(7):588-93.
- DIMOPOULOS M, KASTRITIS E, MOULOPOULOS LA., et al. The incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma who receive bisphosphonates depends on the type of bisphosphonate. **American Society of Hematology Annual Meeting Abstracts**. Blood. 2005; 106:637.
- ENGROFF SL, KIM DD. Treating bisphosphonate osteonecrosis of the jaws: is there a role for resection and vascularized reconstruction? **J Oral Maxillofac Surg**. 2007 Nov;65(11):2374-85.
- FISHER JE, RODAN GA, RESZKA AA. In vivo effects of bisphosphonates on the osteoclast mevalonate pathway. **Endocrinology**. 2000 Dec;141(12):4793-6.
- Freiberger JJ, et al. Hyperbaric oxygen treatment and bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a case series. **J Oral Maxillofac Surg**. 2007 Jul;65(7):1321-7.
- GUTTA R, LOUIS PJ. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: science and rationale. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2007 Aug;104(2):186-93.
- HOKUGO A, et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. **J Bone Miner Res**. 2010 Jun;25(6):1337-49.
- KOERDT S, et al. Histomorphologic characteristics of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **J Oral Pathol Med**. 2014;43:448-53.

- KUMAR SKS, MERU MC, SEDGHIZADEH PP. Osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy: a case series. **J Contemp Dent Pract.** 2008; 9: 63-9.
- LAWSON MA, et al. Differences between bisphosphonates in binding affinities for hydroxyapatite. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** 2010 Jan;92(1):149-55.
- MAAHS MP, et al. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. **Head Neck.** 2011 Feb;33(2):199-207.
- MCLEOD MH, DAVIES BJB, BRENNAN PA. Bisphosphonate osteonecrosis of the jaws: an increasing problem for the dental practitioner. **British Dental Journal.** 2007(203): 641-4, 2007.
- MARX RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg.** 2003 Sep;61(9):1115-7.
- MARX RE, SAWATARI Y, FORTIN M, BROUMAND V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **J Oral Maxillofac Surg.** 2005 Nov;63(11):1567-75.
- MAVROKOKKI T, CHENG A, STEIN B, GOSS A. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. **J Oral Maxillofac Surg.** 2007 Mar;65(3):415-23.
- MIGLIORATI CA, et al. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: **An American Academy of Oral Medicine position paper.** **J Am Dent Assoc.** 2005 Dec;136(12):1658-68.
- NICOD N, et al. Green tea, cocoa, and red wine polyphenols moderately modulate intestinal inflammation and do not increase high-density lipoprotein (HDL) production. **J Agric Food Chem.** 2014 Mar 12;62(10):2228-32.
- OKA Y, et al. Tea polyphenols inhibit rat osteoclast formation and differentiation. **J Pharmacol Sci.** 2012;118(1):55-64.
- OTTEWELL PD, et al. Sustained inhibition of tumor growth and prolonged survival following sequential administration of doxorubicin and zoledronic acid in a breast cancer model. **Int J Cancer.** 2010 Jan 15;126(2):522-32.
- PEDROSA WF JR, et al. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. **Clin Oral Implants Res.** 2009 Nov;20(11):1254-64.
- QIN YJ, et al. Green tea extract treatment alleviates ocular inflammation in a rat model of endotoxin-induced uveitis. **PLoS One.** 2014 Aug 5;9(8):e103995.
- RUGGIERO SL, et al; Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. **American Association of Oral**

**and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update.** *Aust Endod J.* 2009 Dec;35(3):119-30.

RUGGIERO SL, WOO SB. Biophosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Dent Clin North Am.** 2008 Jan;52(1):111-28.

SARIN J, DEROSI SS, AKINTOYE SO. Updates on bisphosphonates and potential pathobiology of bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis. **Oral Dis.** 2008 Apr;14(3):277-85.

SATO K, TAKAYANAGI H. OSTEOCLASTS, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. **Curr Opin Rheumatol** 2006;18(4):419–26. [PubMed: 16763464]Review.

SHEN CL, YEH JK, CAO J, WANG JS. Green tea and bone metabolism. **Nutr Res** 2009;29(7):437-56.

<sup>b</sup>SHEN CL, et al. Protective actions of green tea polyphenols and alfacalcidol on bone microstructure in female rats with chronic inflammation. **J Nutr Biochem.** 2011 Jul;22(7):673-80

<sup>c</sup>SHEN CL, YEH JK, CAO JJ, CHYU MC, WANG JS. Green tea and bone health: Evidence from laboratory studies. **Pharmacol Res.** 2011 Aug;64(2):155-61.

SHINODA H, et al. Structure-activity relationships of various bisphosphonates. **Calcif Tissue Int.** 1983;35(1):87-99.

TARASSOFF P, CSERMAK K. Avascular necrosis of the jaws: risk factors in metastatic cancer patients. **J Oral Maxillofac Surg.** 2003 Oct;61(10):1238-9.

TIPOE GL, LEUNG TM, HUNG MW, FUNG ML. Green tea polyphenols as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets** 2007;7 (2):135–44.

TOMATA Y, et al. Green tea consumption and the risk of incident functional disability in elderly Japanese: the Ohsaki Cohort 2006 Study. **Am J Clin Nutr.** 2012 Mar;95(3):732-9.

VAN BEEK E, et al. Structural requirements for bisphosphonate actions in vitro. **J Bone Miner Res.** 1994 Dec;9(12):1875-82.

WOO SB, HELLSTEIN JW, KALMAR JR. Systematic review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. **Ann. Intern. Med.** 2006;144: 753-61.

YANG CS, LANDAU JM. Effects of tea consumption on nutrition and health. **J Nutr** 2000;130:2409–12.

YANG M, WANG C, CHEN H. Green, oolong and black tea extracts modulate lipid metabolism in hyperlipidemia rats fed high-sucrose diet. **J Nutr Biochem.** 2001 Jan;12(1):14-20.

YUN JH, ET AL. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. **J Periodontal Res** 2004;39(5):300-7.

**ANEXO A - OFICIO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA  
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA DA FOB USP**



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Odontologia de Bauru**  
Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais



*CEPA-Proc. Nº 037/2012*

Bauru, 18 de fevereiro de 2013.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Efeito do chá verde no processo de reparo alveolar de ratos tratados com bifosfonato**, de autoria de Edison Yoshio Mada foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão realizada **nesta data**.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Luiz Antônio de Assis Taveira  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Mariza Akemi Matsumoto  
Docente do Departamento de Ciências da Saúde - USC

---

Av. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73  
e-mail: infan@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8998  
<http://www.fob.usp.br>