

Jonathan Ribeiro da Silva

**Prevenção da Osteonecrose dos Maxilares
Induzida por Medicamentos com a utilização de
enxerto Xenógeno e β - trifosfato de cálcio (β -
TCP)**

Araçatuba

2018

Jonathan Ribeiro da Silva

**Prevenção da Osteonecrose dos Maxilares
Induzida por Medicamentos com a utilização de
enxerto Xenógeno e β - trifosfato de cálcio (β -
TCP)**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial).

Orientador: Prof. Adjunto Dr. Eduardo Hochuli Vieira

Araçatuba

2018

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

S586p Silva, Jonathan Ribeiro da.
Prevenção da osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos com a utilização de enxerto xenógeno e β -trifosfato de cálcio (β -TCP) / Jonathan Ribeiro da Silva. - Araçatuba, 2018
64 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Eduardo Hochuli Vieira

1. Difosfonatos 2. Osteonecrose 3. Transplante ósseo I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser fundamental em minha vida, meu guia, sempre presente na hora da angústia, dificuldades e alegrias.

À minha esposa, Janaina Carvalho Martins, por estar comigo desde os primeiros passos da carreira, me dando toda a força necessária para chegar até o final.

Ao meu pai, Rogério Tenório da Silva, meu melhor amigo e primeiro orientador. Que sempre me motivou a procurar melhorar e a aprender cada vez mais.

À minha mãe, Rosangela Ribeiro da Silva, pela paciência, apoio, e suporte durante toda a minha vida.

Aos meus sobrinhos, Davi Martins da Silva e Pedro Henrique Martins da Silva, minhas maiores alegrias.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Adj. Dr. Eduardo Hochuli Vieira, pela oportunidade de ser seu orientado. Agradeço a paciência, motivação, apoio e instrução. É uma honra ser seu aluno.

Aos meus maiores professores, orientadores, amigos, e espelhos na especialidade, Prof. Dr. Nicolas Homsí e Prof. Dr. Hernando Valentim da Rocha Júnior. Agradeço pela minha formação profissional e pessoal. Nenhum sucesso seria possível se não fosse por vocês.

Ao Prof. Ass. Dr. Francisley Avila Souza, agradeço pelo convívio descontraído e por poder aprender mais com você durante todos os meus plantões. Todas as vezes voltei para o Rio de Janeiro com mais conhecimento sobre cirurgia, política e docência.

Ao Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani, um grande amigo e um profissional que usarei como exemplo durante toda minha carreira docente.

À Profa. Adj. Roberta Okamoto, pela paciência e pela fundamental ajuda para a conclusão deste trabalho. Sou muito grato por todo apoio na fase principal do meu doutorado.

Ao Prof. Adj. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, um exemplo de cirurgião e pessoa. Sou muito grato pelo o que aprendi com você.

Aos meus amigos e colegas de residência, Guto Fidalgo e Manuella Zanela, pelos anos de amizade, carinho, apoio, e aprendizado em conjunto na especialidade.

À melhor equipe de cirurgiões e amigos que alguém poderia ter, Dr. Rodrigo dos Santos Pereira, Ricardo Mattos, Roberto Gomes dos Santos,

aprendo cada vez mais ao lado de vocês.

Ao Prof. Sylvio Luiz Costa de Moraes, por ser um dos meus exemplos na especialidade, e modelo de professor e caráter. Agradeço pela oportunidade de aprender com você a cada dia.

Ao amigo Ciro Duailibe de Deus, por participar comigo de todas as minhas semanas em Araçatuba, seja para ajudar no trabalho ou para um almoço no Bola.

Aos amigos João Bonardi, Breno Fernandes, e Maria Cristina Borbas, pela amizade e apoio fundamental para a conclusão deste projeto.

Ao Prof. Dr. André Luis da Silva Fabris, pela amizade, humildade e simplicidade.

Aos amigos da pós-graduação: Valthierre Nunes, Ricardo Jacob, Erick Neiva, Pedro Gomes, Juliana Zorzi, Leonardo Freitas, Gustavo Momesso, , Somani Queiroz, Tarik Polo, Willian, André Hergesel de Oliva, Fábio Roberto de Souza Batista, Gabriel Mulinari, William Phillip, Lara Cervantes, Luara Colombo, Raquel Parra, Cássio Figueiredo, Guilherme Ramirez, Lais Egas e Thiago Machado. Vocês contribuíram diretamente na minha formação e melhora profissional.

À todos os funcionários e professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, Santa Casa de Misericórdia de Birigui, UNIMED – Araçatuba, NEC e DEFI.

Aos pacientes por confiarem suas vidas aos nossos cuidados.

Agradeço à vida dos animais utilizados durante os experimentos, o que tornou possível a elaboração deste trabalho e permitiu o meu aprendizado.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela oportunidade de ser discente de uma instituição tão reconhecida e por onde já passaram grandes nomes da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo- Facial.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso, pela forma como dirige nossa Pós Graduação.

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação, Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos e Lilian Sayuri Mada, agradeço pela paciência, pelos avisos e e-mails. Vocês são peças fundamentais desta engrenagem. Muito obrigado!

Agradeço imensamente à AO FONDANTION, que ficou à inteira disposição e tornando possível o desenvolvimento desta pesquisa.

EPÍGRAFE

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo a certeza do seu destino.”

(Leonardo da Vinci)

Silva, J.R. Prevenção da Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Medicamentos com a utilização de enxerto Xenógeno e β - trifosfato de cálcio (β -TCP).. [Tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2018.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a prevenção da OMIM em ratos em risco de desenvolvimento de osteonecrose na região em que foi realizada a exodontia utilizando apenas coágulo, enxerto de osso xenógeno, e enxerto de β - trifosfato de cálcio (β -TCP).

Métodos: Foram utilizados 20 Ratos Wistar machos com 3 meses de idade, pesando 350 – 450g, submetidos a indução da Osteonecrose por uso de ácido zoledrônico (0,04mg/kg) durante 05 semanas. Na 7ª semana foi realizado a cirurgia de exodontia dos molares superiores direito e preenchimento do alvéolo com coágulo (controle), enxerto xenógeno (Grupo 2), e β - trifosfato de cálcio (β -TCP) (Grupo 3). A eutanásia foi realizada na 15ª semana. Foram realizadas análises morfométrica, estereológica, e imunohistoquímica, onde aplicou-se os testes estatísticos ANOVA e Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%.

Resultados: Durante a análise macroscópica não houve manifestação clínica da OMIM nos grupos experimentais. A análise quantitativa demonstrou que o

Grupo 3 (BTCP) apresentou menor formação de lacunas ósseas e maior formação de tecido ósseo sadio quando comparado com os grupos 1 e 2 ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos durante análise de formação de tecido epitelial. Na análise imunohistoquímica, o grupo experimental apresentou maior atividade de remodelação óssea.

Conclusão: Os resultados deste trabalho demonstraram que os grupos experimentais apresentaram maior atividade de remodelação óssea, e ausência de manifestação clínica da OMIM. O grupo BTCP ainda demonstrou menor quantidade de lacunas e maior quantidade de osso formado durante análise histológica. No entanto, mais estudos necessitam ser realizados até o desenvolvimento de um protocolo de prevenção desta complicação

Palavras-chave: Difosfonatos. Osteonecrose, Transplante ósseo I. T.

ABSTRACT

Prevention of Medication-related Osteonecrosis of the jaw Using Xenogenic and BTCP Graft.

Objective: To evaluate the bone formation in rats with osteonecrosis in the region where the extraction was performed using only clot, xenogen bone graft, and calcium β -triphosphate (β -TCP) graft.

METHODS: Twenty male Wistar rats weighing 350-450 g were submitted to osteonecrosis induction for the use of zoledronic acid (0.2 mg / kg) for 5 weeks.

In the 7th week, the maxillary right molar extraction and filling of the alveolus with clot (control), xenogene graft (Group 2) and calcium β -triphosphate (β -TCP) were performed (Group 3). Euthanasia was performed in the 15th week. Morphometric and stereological analyzes were performed. The ANOVA and Tukey statistical tests were used, considering a level of significance of 5%.

Results: During the macroscopic analysis there was no clinical manifestation of the OMIM in the experimental groups. Quantitative analysis showed that Group 3 (BTCP) presented less bone formation and greater formation of healthy bone tissue when compared to groups 1 and 2 ($p < 0.05$). There was no statistical difference between groups during analysis of epithelial tissue formation. In the immunohistochemical analysis no difference was found in the bone remodeling process between the groups.

Conclusion: The results of this work were favorable for the use of BTCP for guided bone regeneration and prevention of the clinical manifestation of OMIM in rats. However, more studies need to be performed until the development of a protocol to prevent this complication

Key words: Bisphosphonate. Osteonecrosis. Bone graft

Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição de animais por Grupos utilizados	27
Tabela 2: Distribuição da análise quantitativa do grupo 1 com a porcentagem de lacuna, tecido ósseo, e tecidos moles.....	39
Tabela 3: Distribuição da análise quantitativa do grupo 2 com a porcentagem de lacuna, tecido ósseo, e tecidos moles.....	39
Tabela 4: Distribuição da análise quantitativa do grupo 3 com a porcentagem de lacuna, tecido ósseo, e tecidos moles.....	40
Tabela 5: Escores de Imuno-histoquímica	47

Lista de Figuras

Figura 1. Injeção intra venosa de ácido zoledrônico	28
Figura 2. Extração do 1º molar superior	29
Figura 3. Primeiro molar superior extraído	30
Figura 4. Preenchimento do alvéolo com biomaterial	30
Figura 5. Corte Histológico com as áreas de interesse	33
Figura 6. Corte Histológico com delimitação da área de interesse ..	33
Figura 7. Grade de Merz na área de interesse	34
Figura 8. Animal do grupo BTCP na 15ª semana demonstrando boa cicatrização de tecidos moles, sem a presença de exposição de osso necrótico	38
Figura 9. Corte histológico de animal do G1, mostrando análise histológica quantitativa	40
Figura 10. Corte histológico de animal do G2, mostrando análise histológica quantitativa	41
Figura 11. Corte histológico de animal do G3, mostrando análise histológica quantitativa	42
Figura 12. Imunomarcção para TRAP em aumento de 10x	45
Figura 13. Imunomarcção para RANKL em aumento de 10x.....	46
Figura 14. Imunomarcção para OC em aumento de 10x	47

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Avaliação comparativa da formação de lacunas..43

Gráfico 2: Avaliação comparativa da formação de tecido ósseo..44

Lista de Abreviaturas

OMIM. Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Medicamentos	19
CTX. Telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo I	19
BTCP. β - trifosfato de cálcio	20
AAOMS. Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial.....	26
IM. Intramuscular	30
IV. Intravenosa	31
SC. Subcutânea	31
RANKL. Rank ligante	44
TRAP. Fosfatase ácida resistente ao tartarato	44
OC. Osteocalcina	44

Sumário

Introdução	20
Objetivo	23
Metodologia	25
Resultados	37
Discussão	48
Conclusão	52
Referências Bibliográficas	55

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A expectativa de vida mundial subiu para 71,8 anos em 2015, e com a maior longevidade da população também aumenta a incidência de doenças da terceira idade, dentre elas a osteoporose e doenças oncológicas. (1)

Na expectativa de controlar as manifestações clínicas destas doenças, nos últimos anos tornou-se corrente o uso de medicamentos antirreabsortivos, que inibem a atividade osteoclástica e têm se mostrado eficazes na redução da dor e na prevenção de metástases ósseas. Novas drogas anti-angiogênicas para o tratamento de lesões malignas também têm sido utilizadas para esse propósito. (2-4) Apesar dos seus benefícios, uma importante complicação denominada de Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Medicamentos (OMIM) vem sendo observada nos pacientes usuários destes medicamentos, que se caracteriza clinicamente por exposições e sequestros ósseos na região bucomaxilofacial (2, 5). Um dos primeiros relatos foi publicado por Marx, em 2003, relatando 36 casos de lesões osteonecróticas dos maxilares associadas ao uso de pamidronato e do zoledronato, alertando sobre o risco de uma crescente epidemia desta patologia. (6) Desde então inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de entender os fatores de risco e minimizar a ocorrência da OMIM. (3, 5, 7) A avaliação do tempo de tratamento com este fármaco, a via de administração oral ou venosa, e o estudo de marcadores biológicos como o CTX e o TRACP – 5b representam aspectos importantes na avaliação pré-operatória do paciente usuário de medicamentos indutores de osteonecrose, como tentativa de prever o risco de ocorrência desta complicação. (2, 3, 5, 8) Quando a OMIM atinge estágios mais avançados, o seu tratamento se torna cada vez mais difícil, com aumento da morbidade para

os pacientes, que podem ser submetidos desde sequestrectomias intrabucais até grandes ressecções envolvendo a mandíbula, maxila, e osso zigomático (4, 9-11)

Após aproximadamente 15 anos dos primeiros relatos da OMIM, e de uma série de novas pesquisas e protocolos para minimizar sua ocorrência, o uso indiscriminado dos medicamentos causadores para pacientes em tratamento de osteoporose, somado ao inadequado conhecimento dos cirurgiões dentistas no manejo desses pacientes faz com que ainda exista um crescente na ocorrência de OMIM. (2, 4, 12, 13)

OBJETIVO

OBJETIVO

Objetivo Principal

Avaliar a prevenção da OMIM na região em que foi realizada a exodontia com: coágulo, enxerto de β - trifosfato de cálcio, e enxerto xenógeno, em ratos com OMIM.

Objetivos Específicos

A. Induzir Osteonecrose em ratos;

B. Avaliar o papel do enxerto de β - trifosfato de cálcio no processo de regeneração / formação óssea;

C. Avaliar o papel do enxerto xenógeno no processo de regeneração / formação óssea;

D. Comparar os dois tipos de tratamentos.

METODOLOGIA

METODOLOGIA

O presente trabalho foi iniciado após a aprovação pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Odontologia de Araçatuba com parecer final de número 00940-2017.

Animais

Ratos wistar machos com 2 meses de idade foram mantidos em biotério próprio da UNESP sob temperatura de $20^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro-escuro (6:00-18:00h) controlados. Eles receberam ração e água ad libitum. Aos 3 meses de idade, com aproximadamente 350-450g, os animais foram randomicamente divididos em três grupos (TABELA 1). Foi induzida previamente a Osteonecrose em todos os grupos utilizando o bifosfonato (Ácido Zoledrônico) intravenoso (IV) através da veia caudal, uma vez por semana durante 5 semanas de maneira ininterrupta, onde decorridas 7 semanas do início da indução, foram realizadas as exodontias do 1º molar superior direito de todos os animais. No grupo 1 o alvéolo foi mantido com coágulo, no grupo 2 foi utilizado enxerto xenógeno (Lumina Bone®, Criteria, São Paulo, Brasil). No grupo 3 o alvéolo foi preenchido com β - trifosfato de cálcio (ChronOS, Synthes, Suíça).

GRUPO	BIOMATERIAL	NÚMERO DE ANIMAIS
1	X (Coágulo	6
2	Xenógeno	6
3	BTCP	6

Tabela 1. Distribuição de animais por Grupos e Biomateriais utilizados

Os grupos ficaram determinados como: Grupo controle (G1, n = 6): Exodontia do primeiro molar superior direito e preenchimento do alvéolo com coágulo de ratos em risco de OMIM; Grupo dois (G2, n = 6): Exodontia do primeiro molar superior direito e preenchimento do alvéolo com enxerto xenógeno, de ratos em risco de OMIM; Grupo três (G3, n= 6): Exodontia do primeiro molar superior direito e preenchimento do alvéolo com BTCP, de ratos em risco de OMIM;

Indução da OMIM

O Ácido Zoledrônico (BLAZTERE ®) foi aplicado por via intravenosa (Fig. 6) uma vez por semana por 5 semanas à partir dos 3 meses de idade. As doses administradas foram de 0,04 mg de ácido zoledrônico em solução salina (0,2 mg/ml). Visto que não existe um protocolo considerado unanimidade para indução de OMIM pelo uso de bifosfonatos em modelo animal, e considerando as diferenças de metabolismo entre as duas espécies, foi determinada a dose citada anteriormente; dose esta, adaptada do estudo realizado por Hokugo et al em 2010, confirmado por Biassoto et al. 2010, e já utilizado como modelo para estudos de prevenção da OMIM em ratos por Sarkarat et al. 2014,(14-16).



Fig.1. Animal do grupo G3 recebendo injeção intra venosa de ácido zoledrônico diluído em solução salina na veia caudal.

Extração Dentária

Os primeiros molares superiores direitos foram extraídos de todos os grupos, na 7^a semana após o início do protocolo de indução. O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia geral com injeção intraperitoneal (IP) de Ketamina 90 mg/kg + Xilazina 10 mg/kg, onde os animais foram colocados na posição de decúbito dorsal em mesa de operação personalizada. Um Descolador de Molt nº 9 foi usado para separar a inserção gengival e luxar o dente (Fig.2), após a exodontia, foi realizada um descolamento de tecidos moles da região que corresponde ao alvéolo onde encontrava-se o elemento extraído, com intuito de auxiliar na manutenção do coágulo ou biomaterial no interior do alvéolo (Fig.3 e 4), em seguida, foi realizada a sutura, utilizando fio de seda 4-0. Para realização de analgesia pós-operatória foi administrado Dipirona 400 mg/kg por injeções subcutâneas a cada 12h por 48 horas, e cefalexina 15mg/kg de 12/12h por 03 dias.



Fig 2. A- Animal sob anestesia geral na posição de decúbito dorsal em mesa operatória personalizada, sendo realizada a exodontia do primeiro molar superior direito utilizando um descolador de molt nº 9.



Figura 3 . Primeiro Molar superior direito extraído do animal do Grupo 3.

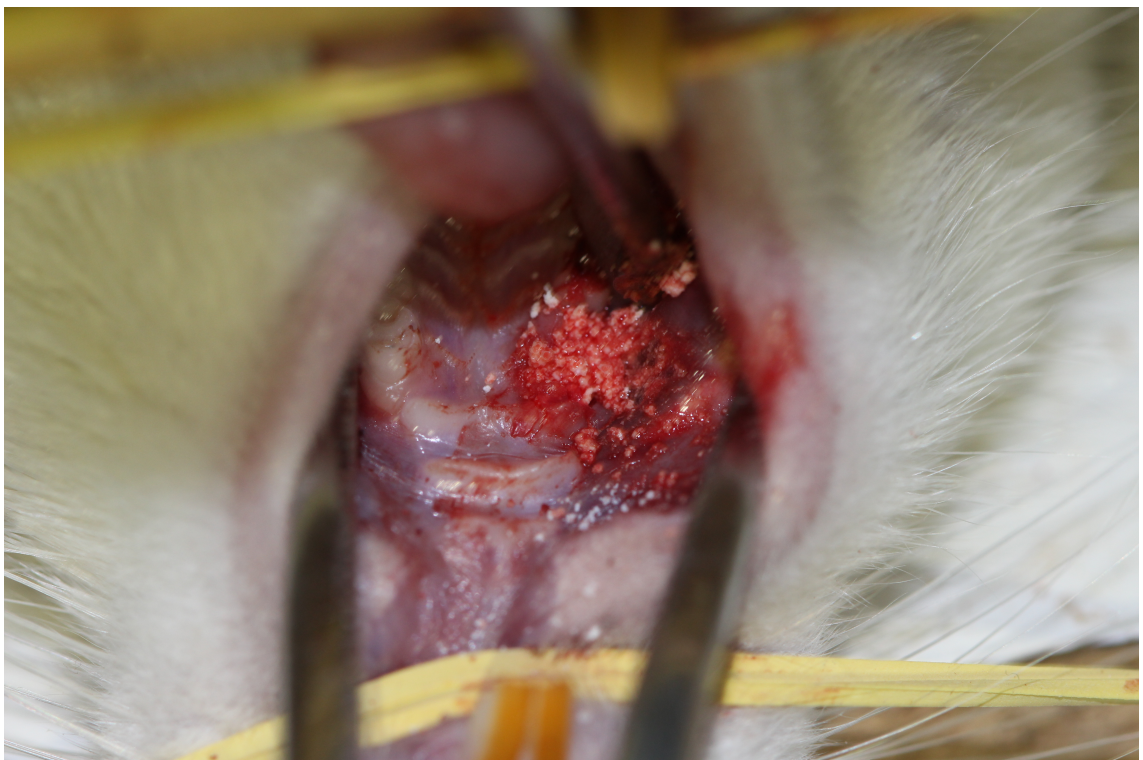


Figura 4: Animal sob anestesia geral na posição de decúbito dorsal em mesa operatória personalizada, evidenciando o alvéolo preenchido por BTCP, já sem o primeiro molar superior direito, que foi removido;

Eutanásia

Na 15ª semana do início do tratamento, todos os animais foram submetidos a eutanásia com sobredose IP de ketamina (180 mg/kg) e xilasina (20 mg/kg). Foi realizado uma ressecção em bloco da região alveolar para análise histológica e futura análise imuno-histoquímica.

Análise Histológica e Histomorfométrica

Foram utilizados para fazer uma análise quantitativa todos os animais de cada tempo e grupo experimental, sendo as maxilas removidas e reduzidas para realização da análise histológica dos cortes em parafina.

As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP - Brasil) por 48 horas, posteriormente lavadas em água corrente por 24 horas então foi iniciado o processo de descalcificação em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e hidróxido de sódio a 10%.

Após a descalcificação adequada, prosseguiu-se com a desidratação das peças através da sequência de álcoois sendo finalizada com o processo de diafanização com xilol.

Então as peças foram submetidas ao processo de embebição em parafina 1, 2, 3 e por fim foram imersas em parafina de inclusão em formas de papel. Em seguida, a parafina em excesso foi removida e as peças foram instaladas no sentido vertical (pósterio-anterior) nos tacos para realização de cortes sagitais de 5 µm de espessura com o auxílio de micrótomo (RM2235, Leica Biosystems Nussloch GmbH 2017) da área de interesse para confecção das

lâminas.

Duas lâmina de cada amostra foi separada para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) e outras três para as reações de imunohistoquímica.

As imagens das lâminas coradas com HE foram obtidas através do microscópio óptico (Leica DM4000 B LED, Heerbrugg, Switzerland) com o auxílio de lentes objetivas Carl Zeiss (2.5X0.07, 5X0.12, 10X e 40X0.65) acoplado a uma câmera de captação de imagem e conectado a um computador (Configuração: Intel Core i5® com sistema operacional Windows 7®) e Software para processamento e análise de imagens (AxioVision 4.9.1®0, Carl Zeiss by Imaging Associates Ltd, Jena, Deutschland).

Foram determinadas como áreas a serem avaliadas na análise quantitativa: área de tecido ósseo íntegro, tecidos moles (tecido epitelial, conjuntivo, vasos sanguíneos) e lacunas ósseas (Fig.5), adaptando os critérios analisados por Sarkarat et al. 2014. (16)

A análise foi realizada na região de interesse, que corresponde à área entre a raiz mesio palatina do segundo molar superior direito em direção à anterior (onde foi extraído o primeiro molar) - sentido ântero posterior (Fig. 6); determinamos esta região, como sendo a região de interesse devido ao fato de ser o local anatômico onde encontrava-se o primeiro molar superior direito, que foi extraído, causando assim um trauma no local, que favoreceria o desenvolvimento de osteonecrose neste sítio.

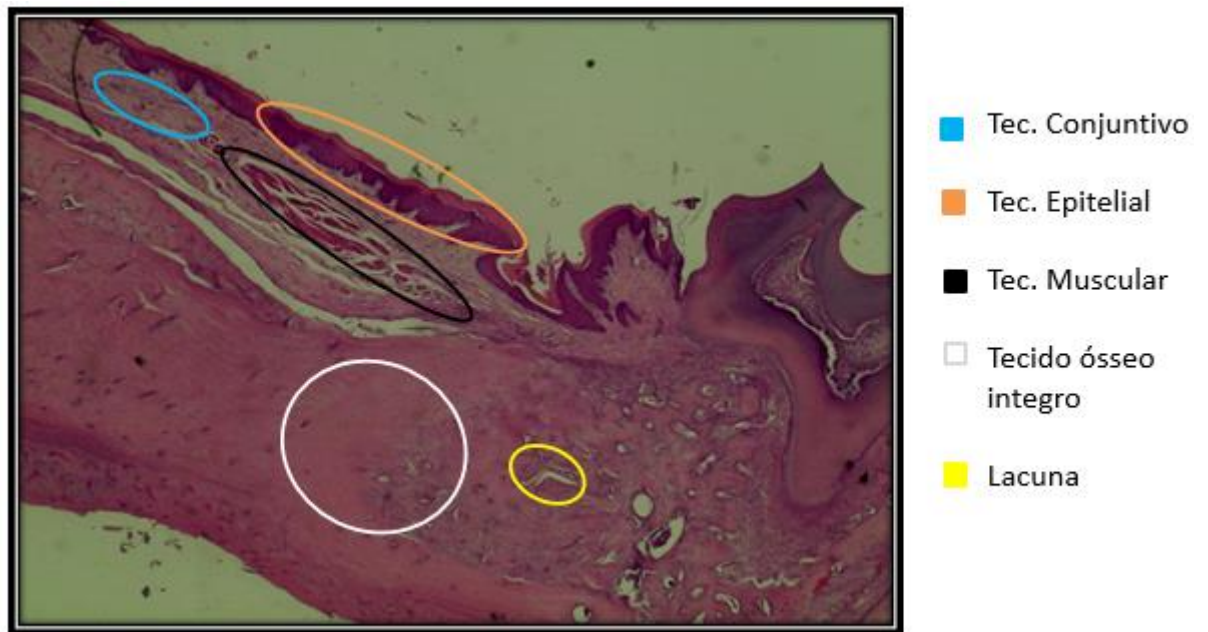


Figura 5. Corte histológico evidenciando as áreas de interesse de análise.

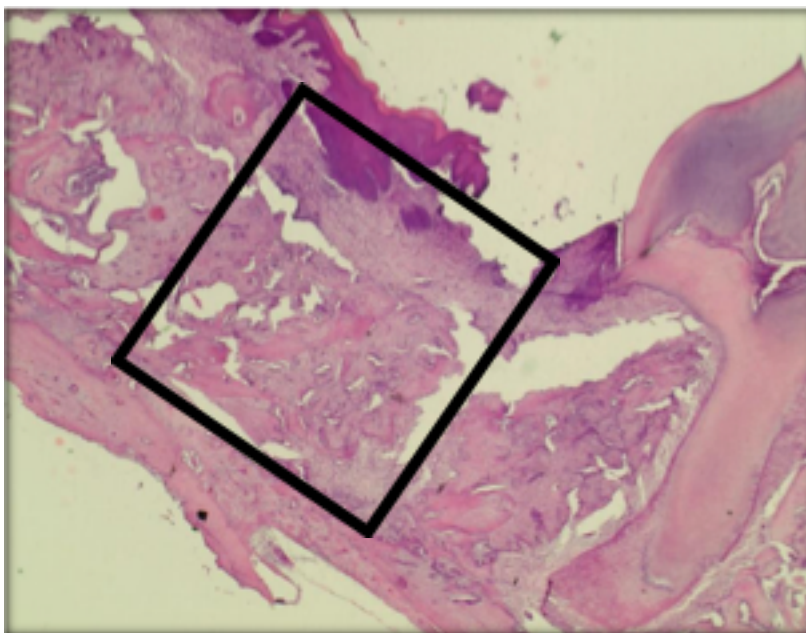


Fig.6: Corte histológico em aumento de 5x0.12, evidenciando no interior do quadrado, a região de interesse para análise quantitativa, região esta, correspondente ao local onde encontrava se o primeiro molar superior direito antes da exodontia.

Análise Quantitativa

Foram mensuradas as porcentagens de tecido ósseo, e tecido mole (tecido epitelial, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos) e áreas de lacunas ósseas por meio da grade de Merz. Utilizando quatro grades retangulares com 100 pontos/grade sobre as imagens, a quantificação foi realizada. O cálculo da porcentagem de cada item analisado foi alcançado quantificando a presença de cada tipo de tecido em cada ponto da grade., obtendo dessa forma uma média da porcentagem tecidual relativa de cada item de todas as amostras. (Figura 7)

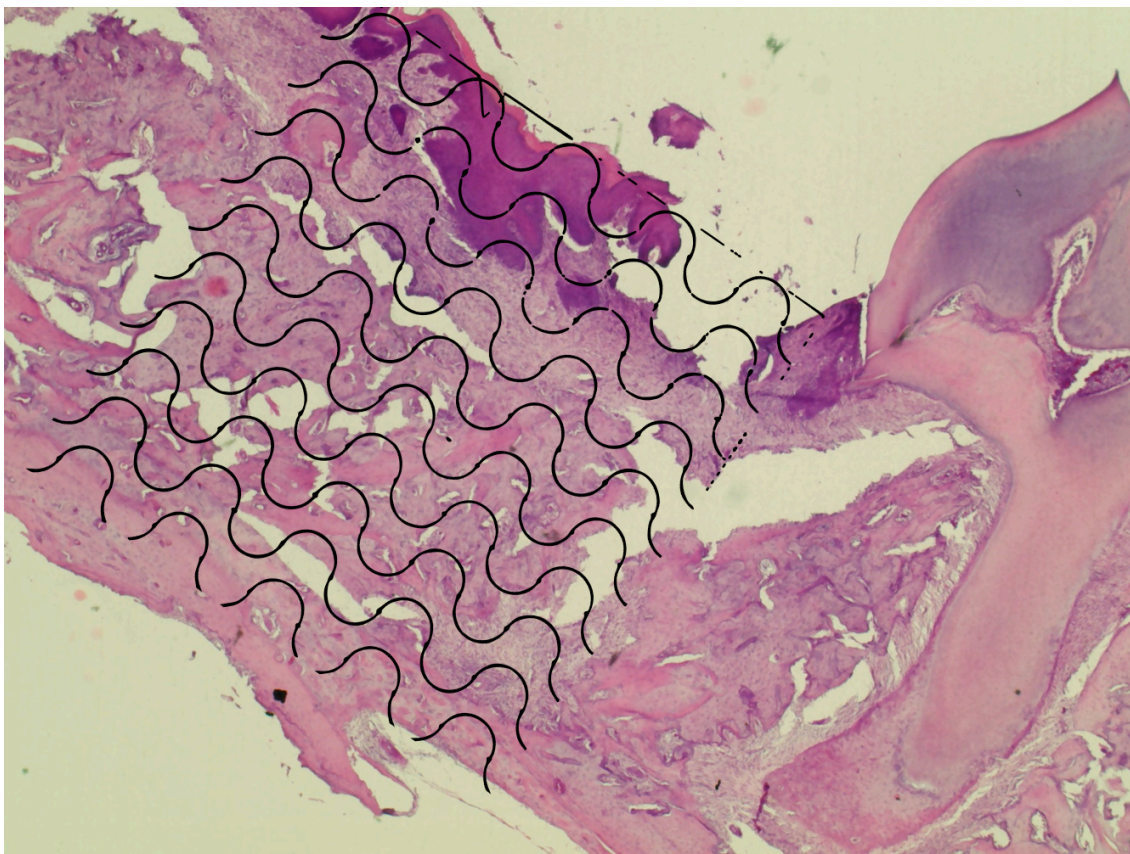


Figura 7. Grade Merz posicionada para análise dos pontos de interesse em animal do Grupo Controle.

Análise Imuno-histoquímica

A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários utilizados foram contra Osteocalcina (OC) (SC18319), RANK ligante (RANKL) (SC13046), e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (SC30832) (Santa Cruz Biotechnology), com o objetivo de se analisar as respostas celulares quanto ao processo de mineralização óssea (OC), remodelação óssea (RANKL), e atividade osteoclástica (TRAP) .

Foram realizados experimentos de imunoistoquímica utilizando como método de detecção a imunoperoxidase. Foi utilizado o anticorpo secundário biotínido anti-cabra produzido em burros (Jackson Immunoresearch Laboratories) e o amplificador do sinal da marcação foi a Avidina Biotina (Kit Elite, Vector Laboratories), tendo a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno.

Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas semi-quantitativamente pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo relacionado aos biomateriais.

A análise foi realizada através do microscópio óptico (Leica DM4000 B LED, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que representam: marcação leve (1), marcação moderada (2) e marcação intensa (3), quesabidamente estarão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo, e serão consideradas positivas as marcações com diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos

anticorpos.(17)

Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism® 7.04 (La Jolla, CA, USA). Foi realizado a análise descritiva e tabulação dos dados com as médias obtidas de cada grupo, seguido de uma análise de variância (ANOVA), e teste de comparação de médias de Tukey para averiguar a diferença entre os 3 grupos. O nível de significância adotado para todos os testes foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Resultados

Análise Macroscópica

Durante análise macroscópica foi avaliado a presença de área de osso exposto não cicatrizado no local da extração no momento da eutanásia (15^a semana), caracterizando assim a manifestação clínica da OMIM. O grupo 1 apresentou área da extração sem cicatrização em todos os animais, enquanto o grupo 2 e 3 apresentou cicatrização de tecidos moles normais, sem exposição de tecido ósseo, em todos os animais do grupo. (Figura 8)

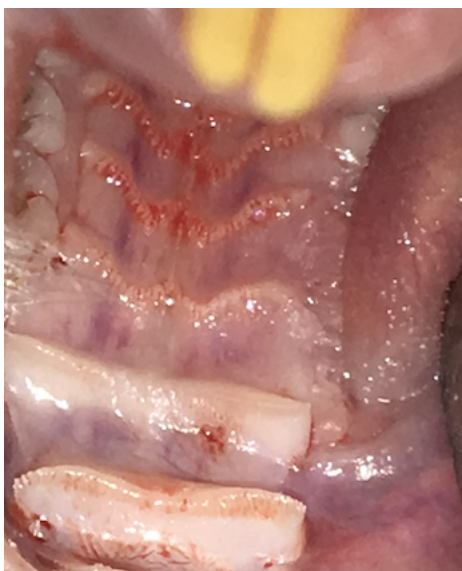


Figura 8. Animal do grupo BTCP na 15^a semana demonstrando boa cicatrização de tecidos moles, sem a presença de exposição de osso necrótico.

Análise Quantitativa

Após a contagem manual utilizando a grade de Merz foi obtido a porcentagem de Tecidos Moles, Tecido ósseo, e Lacunas ósseas de cada grupo, e realizado uma análise comparativa entre eles (Figura 8-10). O grupo 1

(Coágulo) apresentou uma porcentagem média de 58% de tecido ósseo, 32% de lacunas, e 10% de tecidos moles, como demonstrado na tabela 4.

Variável	Media	Mediana	Desv. padrão	Coef. De variação	Mínimo	Máximo
Lacunas	32	30	5,20	16,43	26	39
Tecido ósseo	58	59	4,23	7,36	51	62
Tecidos moles	10	10	1,67	16,73	8	12

Tabela 2: Distribuição da análise quantitativa do grupo 1 com a porcentagem de lacuna, tecido ósseo, e tecidos moles.

O grupo 2 (Enxerto Xenógeno) apresentou uma porcentagem média de 59% de tecido ósseo, 27% de lacunas, e 13% de tecidos moles, como demonstrado na tabela 5.

Variável	Media	Mediana	Desv. padrão	Coef. De variação	Mínimo	Máximo
Lacunas	27	26	5,68	20,78	21	35
Tecido ósseo	59	61	5,71	9,65	51	66
Tecidos moles	13	12	4,72	37,25	7	21

Tabela 3: Distribuição da análise quantitativa do grupo 2 com a porcentagem de lacuna, tecido ósseo, e tecidos moles.

O grupo 3 (BTCP) apresentou uma porcentagem média de 66% de tecido ósseo, 18% de lacunas, e 55% de tecidos moles, como demonstrado na tabela 6.

Variável	Media	Mediana	Desv. padrão	Coef. De variação	Mínimo	Máximo
Lacunas	18	18	4,26	23,46	14	25
Tecido ósseo	66	66	4,32	6,51	60	72
Tecido epitelial	15	15	3,73	25,71	9	19

Tabela 4: Distribuição da análise quantitativa do grupo 3 com a porcentagem de lacuna, tecido ósseo, e tecidos moles.

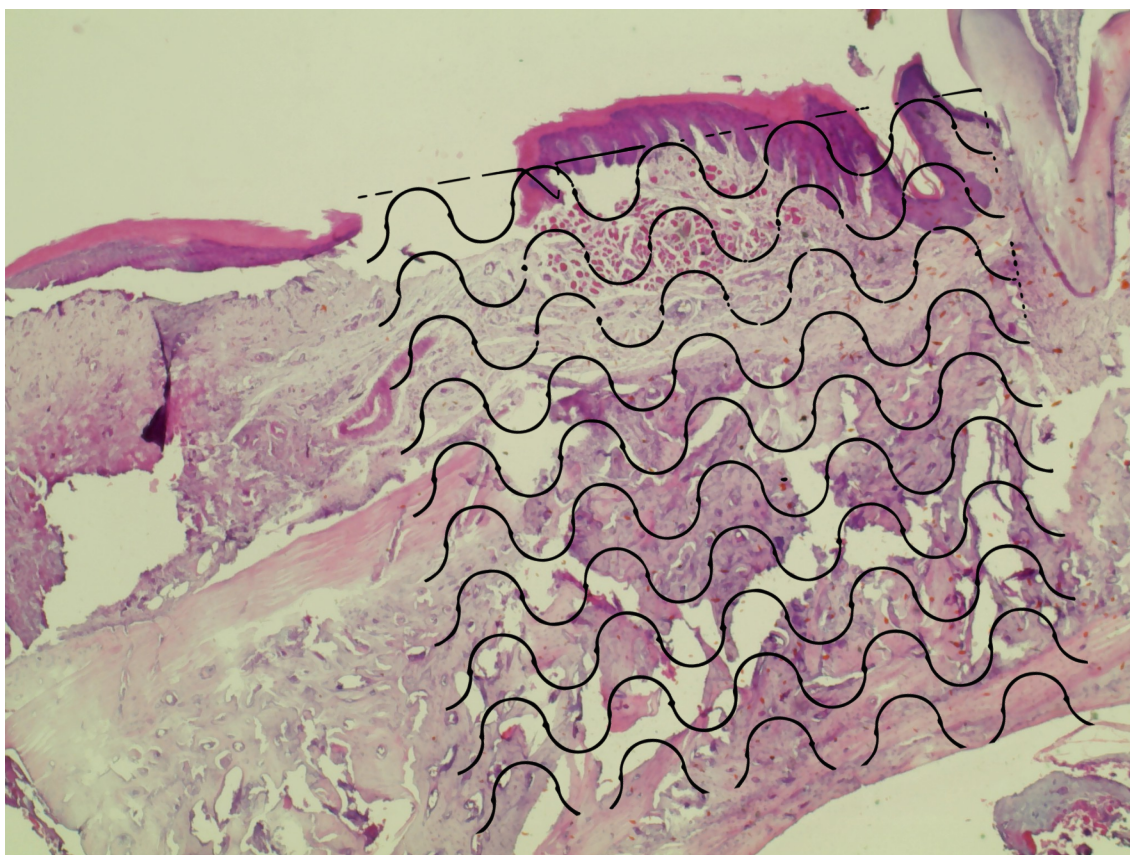


Figura 9: Grade Merz posicionada para análise dos pontos de interesse em animal do Grupo 1 (controle), englobando a região de interesse com pontos tocando tecido epitelial,

conjuntivo, tecido ósseo íntegro, muscular (quando presente) e lacunas.

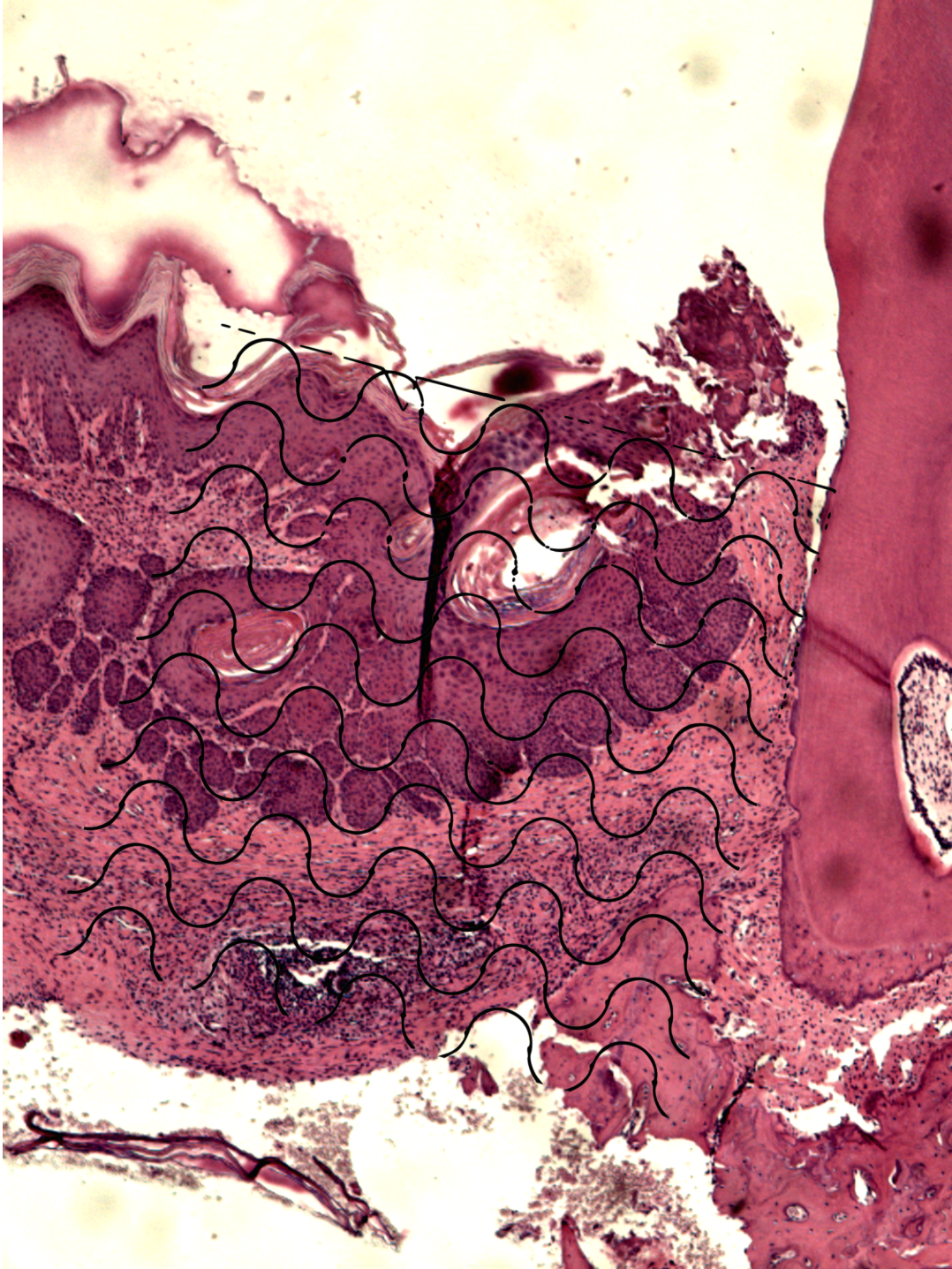


Figura 10: Grade Merz posicionada para análise dos pontos de interesse em animal do Grupo 2 (Enxerto Xenógeno), englobando a região de interesse com pontos tocando tecido epitelial, conjuntivo, tecido ósseo íntegro, muscular (quando presente) e lacunas.

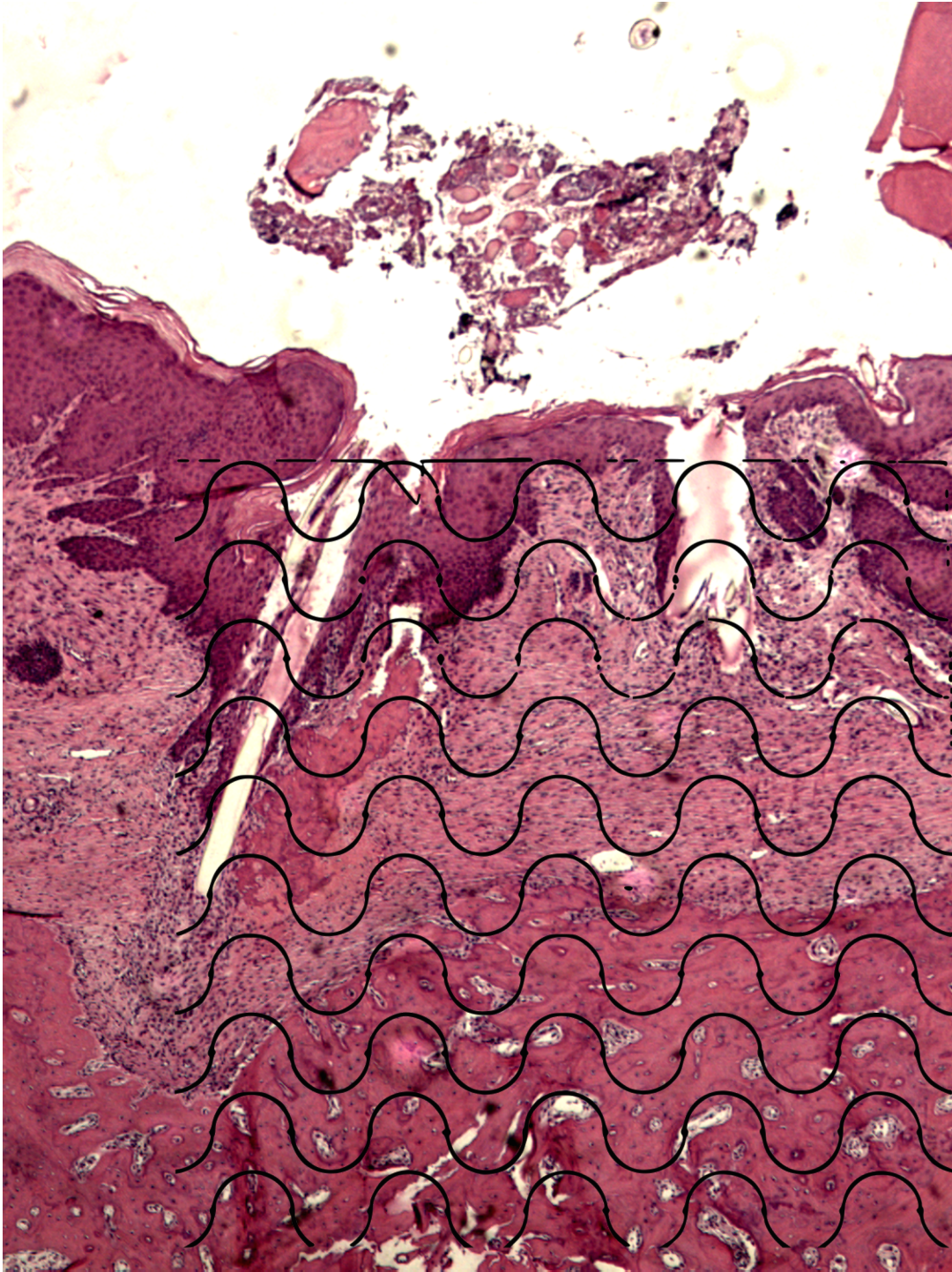


Figura 11: Grade Merz posicionada para análise dos pontos de interesse em animal do

Grupo 3 (BTCP), englobando a região de interesse com pontos tocando tecido epitelial, conjuntivo, tecido ósseo íntegro, muscular (quando presente) e lacunas.

Para análise comparativa das áreas de lacunas, tecidos ósseos, e tecidos moles entre os grupos, foi realizado o teste ANOVA e o teste de Tukey. O gráfico 1 demonstra os resultados da variável lacuna, onde há uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos 3 (BTCP) e 1 (Controle), e os grupos 3 (BTCP) e 2 (Enxerto Xenógeno), já entre os grupos 2 e 1 o teste indica que não há diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,3293$).

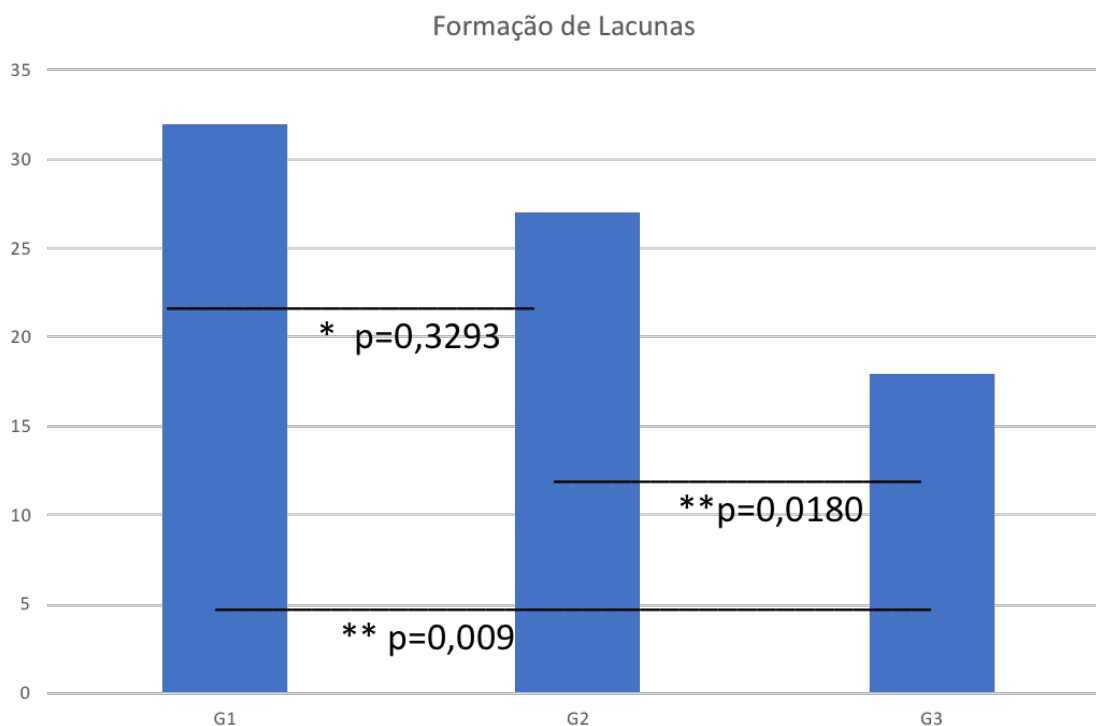


Gráfico 1: Avaliação comparativa da formação de lacunas. (*) sem diferença estatística significativa entre os grupos. (**) diferença estatística significativa entre os grupos.

Para análise comparativa da formação de tecido ósseo sadio, o gráfico 2 demonstra que há diferença estatisticamente significante entre os grupos 3

(BTCP) e 1 (Controle), e 3 (BTCP) e 2 (Enxerto Xenógeno), sendo consideradas iguais as médias dos grupos 1 e 2. Não foi encontrada diferença estatística significativa na avaliação de tecido epitelial ($p=0,1280$)

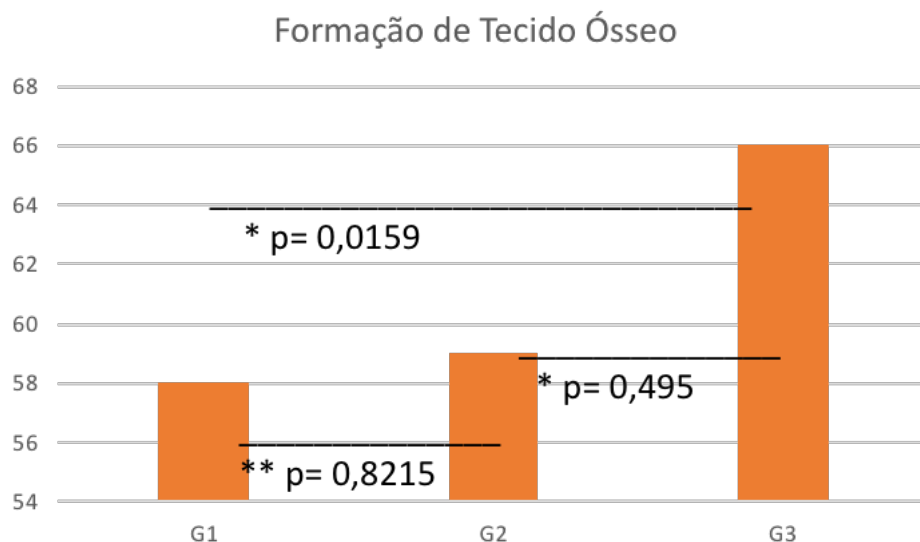


Gráfico 2: Avaliação comparativa da formação de tecido ósseo. (*) sem diferença estatística entre os grupos. (**) diferença estatística significativa entre os grupos.

Análise Imunoistoquímica

As imunomarcações foram avaliadas na região de interesse, com o objetivo de caracterizar as etapas de formação/mineralização óssea foi utilizada a proteína (OC) e para quantificação de reabsorção/atividade osteoclástica as proteínas (RANKL) e (TRAP).

Grupo 1 (coágulo)

Para a marcação de (OC) o grupo 1 apresentou precipitação de minerais em poucas regiões obtendo escore moderado, enquanto para (RANKL) obteve apenas marcação leve em osteócitos, assim como leve marcação para (TRAP) em osteoclastos. (Tabela , Figura 12)

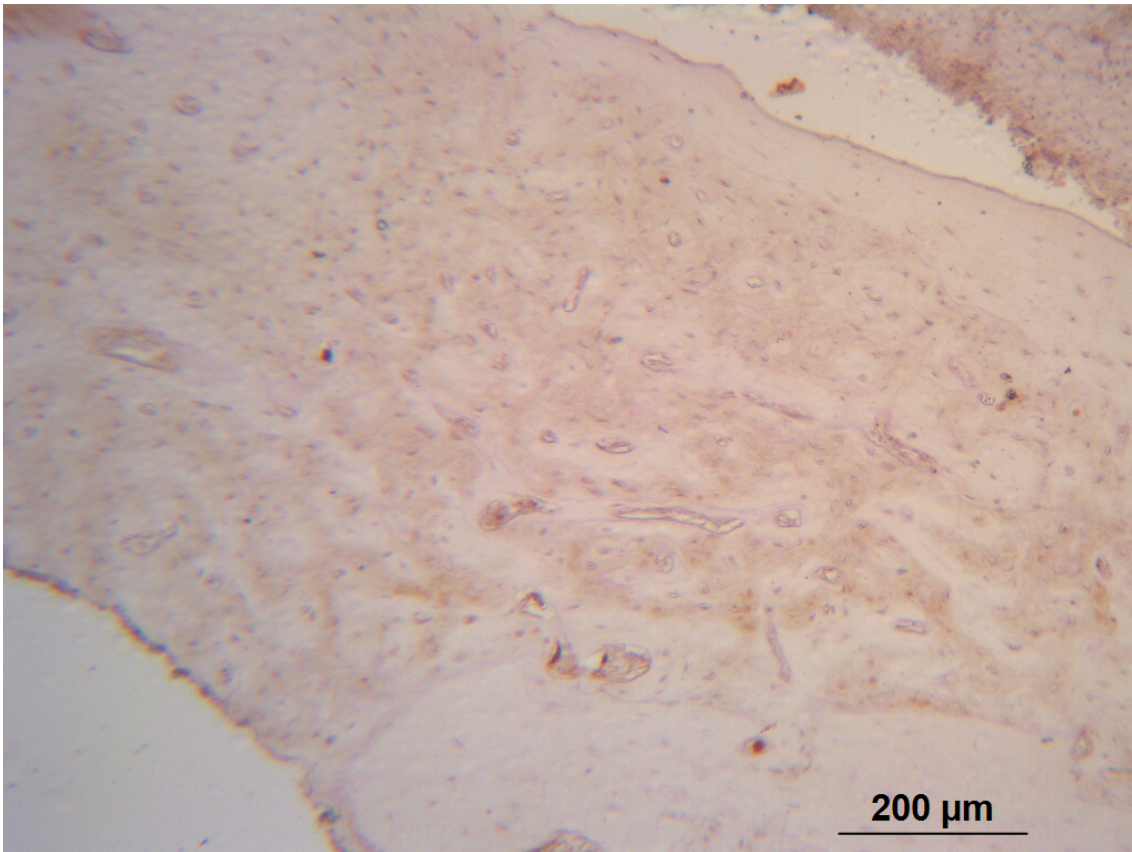


Figura 12: Imunomarcção de TRAP em animal do grupo controle em aumento de 10x.

Grupo 2 (Enxerto xenógeno)

Para a marcação de (OC) o grupo 2 apresentou precipitação sobre o tecido ósseo, com osteócitos marcados positivamente, obtendo escore moderado. Para (RANKL) e (TRAP) também obteve marcação moderada em osteócitos e osteoclastos ativos. (Tabela 7, Figura 13)

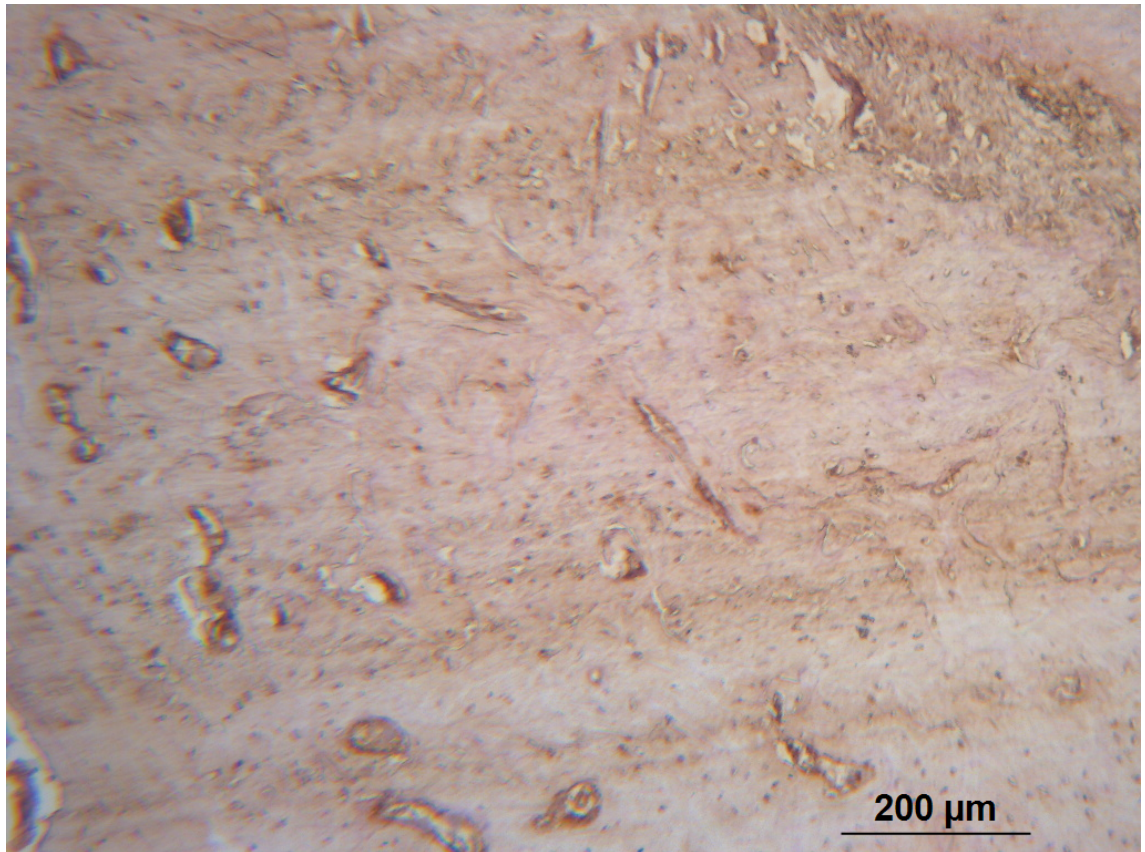


Figura 13: Imunomarcção de RANKL em animal do grupo 2 em aumento de 10x.

Grupo 3 (BTCP)

O grupo 3 apresentou muitos osteócitos marcados positivamente para (OC) obtendo escore moderado. Também foi encontrado marcação moderada para (RANKL) e (TRAP). (Tabela 7, Figura 14)

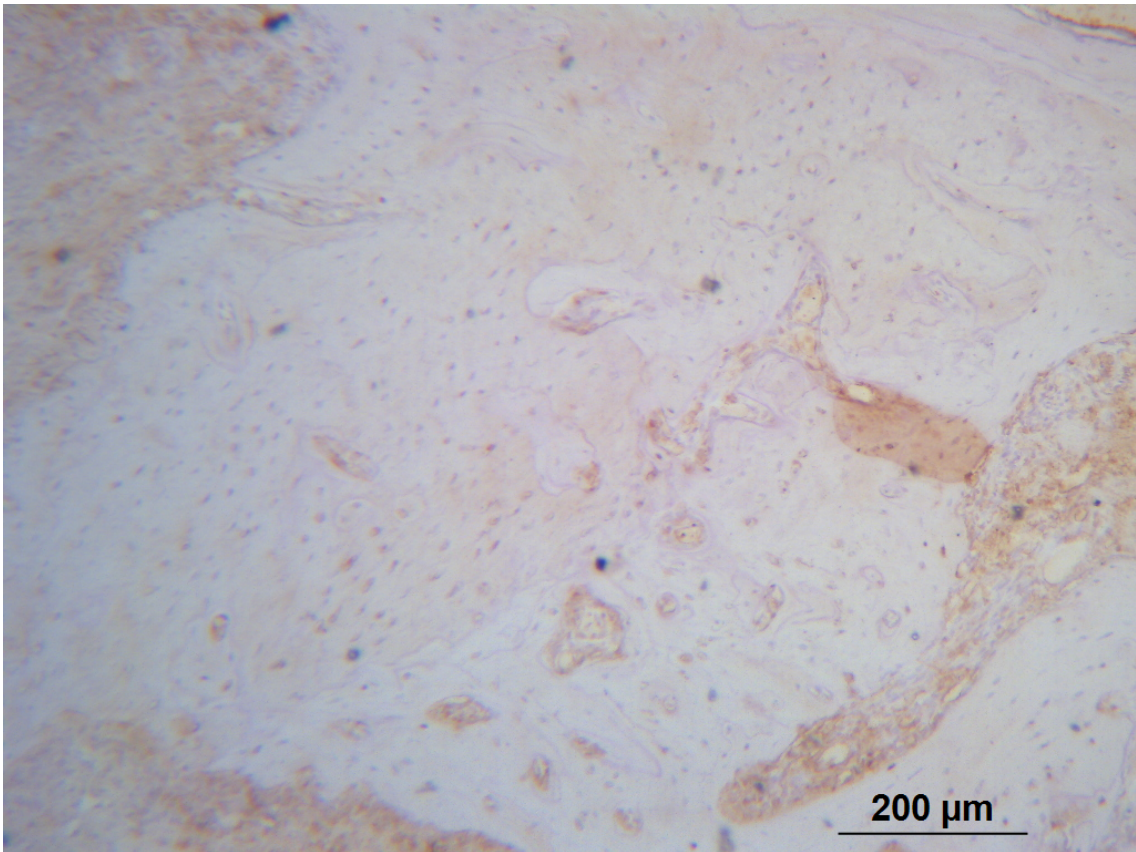


Figura 14: Imunomarcção de OC em animal do grupo 3 em aumento de 10x.

	TRAP	RANKL	OC
Grupo 1	1	1	2
Grupo 2	2	2	2
Grupo 3	2	2	2

Tabela 5: Escores de imuno-histoquímica dos grupos .1 (leve),2 (moderada) e 3 (intensa).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os primeiros relatos da OMIM começaram a partir de 2003 onde ainda pouco se sabia sobre esta patologia, mas desde então muito se evoluiu neste tema, e após 14 anos existem protocolos bem estabelecidos para cada fase da doença, métodos de prevenção com exames laboratoriais, assim como a identificação de novos medicamentos associados a OMIM. (5, 6) Apesar de toda evolução, o manejo da OMIM ainda se baseia na prevenção, pois não existe um método de tratamento definitivo capaz de reverter a osteonecrose quando a doença já está instalada, o que gera uma alta morbidade para estes pacientes. (12-14)

Mesmo com a ampla divulgação no meio científico das complicações da OMIM, ainda existe uma crescente na ocorrência desta patologia. (5, 15) O uso indiscriminado de bifosfonatos para tratamento da osteoporose, e a falta de conhecimento no manejo da OMIM por parte do cirurgião dentista representam o maior problema para o aumento na ocorrência destes casos.(4, 16)

A eminente necessidade de extração dentária em um paciente em risco de OMIM representa um grande desafio para tomada de decisão por parte do cirurgião, visto que não existe um protocolo de prevenção desta complicação ainda bem estabelecido (2). Howie e colaboradores em 2015 conseguiram realizar a remoção do bifosfonato da matriz óssea utilizando agentes quelantes, sendo uma otimista opção a ser desenvolvida, mas ainda necessitando de mais estudos (18). Zandi et al em 2017 obteve bons resultados com o uso da tereparatida em baixas doses para estimulação da atividade osteoblástica e osteoclastica em ratos, e sua associação com Bmp's

também teve resultado positivo para o tratamento da OMIM em estágio 3, tendo como única desvantagem o alto custo para este tratamento (19,20).

Na busca de novos métodos de prevenção desta complicação, este trabalho realizou um modelo experimental para indução da OMIM utilizando biomateriais, para evitar a manifestação clínica desta patologia em ratos. Os resultados obtidos indicaram que a aplicação do BTCP após a extração esteve diretamente relacionado com a menor formação de lacunas e maior formação de tecido ósseo (Gráficos 1 e 2). Sarkarat et al. em seu trabalho realizou uma metodologia similar com a utilização de PRP, e também encontrou maior formação de tecido ósseo no grupo experimental (16). O resultado deste estudo também vai ao encontro de Almeida e colaboradores, onde a utilização de hidroxiapatita foi capaz de prevenir a ocorrência da OMIM em ratos. (21)

A formação de tecidos moles saudáveis sem a presença de exposição de osso necrótico é o objetivo primário durante o manejo da OMIM (2,4). A avaliação macroscópica deste estudo obteve 100% de prevenção desta complicação nos grupos experimentais, resultado similar ao encontrado por Barba-Recreo et al. com o uso do PRF e tecido adiposo (22).

A aplicabilidade do PRF e das BMP'S já vem sendo relatada em estudos em humanos com resultados promissores, tanto para o tratamento quanto para a prevenção da OMIM (23,24). Porém, o real potencial dos biomateriais ainda não foi profundamente pesquisado, necessitando de análises comparativas entre essas técnicas de forma mais específica.

Foram utilizadas as proteínas OC, TRAP, e RANKL para análise do processo de reparo do tecido ósseo no local do alvéolo, e desta forma foi possível identificar marcações moderadas para OC em todos os grupos. Porém, quando avaliado a remodelação óssea (RANKL) e osteoclastos, ativos (TRAP), os grupos experimentais obtiveram marcação moderada enquanto o controle obteve apenas marcação leve. Tendo em vista o mecanismo de ação dos bifosfonatos reduzindo a atividade osteoclástica, os resultados dos grupos experimentais representam um viés favorável para melhora do processo de remodelação óssea em casos de OMIM. Por conta da reduzida amostragem e pelo desenho do estudo, novas pesquisas avaliando a reativação do processo de remodelação óssea em casos de OMIM devem ser realizadas no futuro.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram que os grupos experimentais apresentaram maior atividade de remodelação óssea, e ausência de manifestação clínica da OMIM. O grupo BTCP ainda demonstrou menor quantidade de lacunas e maior quantidade de osso formado durante análise histológica. No entanto, mais estudos necessitam ser realizados até o desenvolvimento de um protocolo de prevenção desta complicação.

AGRADECIMENTOS

A Presente pesquisa foi apoiada pela AOCMF Suíça, projeto número AOCMF-16-02H. Os autores agradecem o suporte da Fundação AO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mortality GBD, Causes of Death C. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459-1544.
2. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(5 Suppl):2-12.
3. Marx RE, Cillo JE, Jr., Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65(12):2397-2410.
4. Schwartz HC. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update and CTX. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015;73(3):377.
5. Marx RE. A decade of bisphosphonate bone complications: what it has taught us about bone physiology. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29(2):e247-258.
6. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(9):1115-1117.

7. Cardoso CL, Barros CA, Curra C, Fernandes LM, Franzolin SO, Junior JS, et al. Radiographic Findings in Patients with Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Int J Dent*. 2017;2017:3190301.
8. Dal Pra KJ, Lemos CA, Okamoto R, Soubhia AM, Pellizzer EP. Efficacy of the C-terminal telopeptide test in predicting the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2017;46(2):151-156.
9. Marx RE. Reconstruction of defects caused by bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(5 Suppl):107-119.
10. Caldrony S, Ghazali N, Dyalram D, Lubek JE. Surgical resection and vascularized bone reconstruction in advanced stage medication-related osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2017;46(7):871-876.
11. Kim HY, Lee SJ, Kim SM, Myoung H, Hwang SJ, Choi JY, et al. Extensive Surgical Procedures Result in Better Treatment Outcomes for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw in Patients With Osteoporosis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016;75(7):1404-1413
12. Pelaz A, Junquera L, Gallego L, Garcia-Consuegra L, Garcia-Martinez L, Cutilli T, et al. Epidemiology, pharmacology and clinical characterization of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. A retrospective study of 70 cases. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2015;66(3):139-147.
13. Campisi G, Fedele S, Fusco V, Pizzo G, Di Fede O, Bedogni A. Epidemiology, clinical manifestations, risk reduction and treatment strategies of jaw osteonecrosis in cancer patients exposed to antiresorptive agents. *Future Oncol*. 2014;10(2):257-275.

14. Hokugo A, Christensen R, Chung EM, Sung EC, Felsenfeld AL, Sayre JW, et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res.* 2010;25(6):1337-49.
15. Biasotto M, Chiandussi S, Zacchigna S, Moimas S, Dore F, Pozzato G, et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(5):390-6.
16. Sarkarat F, Kalantar Motamedi MH, Jahanbani J, Sepehri D, Kahali R, Nematollahi Z. Platelet-Rich Plasma in Treatment of Zoledronic Acid-Induced Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaws. *Trauma Mon.* 2014;19(2):e17196.
17. Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia Junior IR, et al. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(6):1233-40.
18. Howie RN, Bhattacharyya M, Salama ME, Refaey ME, Isales C, Borke J, et al. Removal of pamidronate from bone in rats using systemic and local chelation. *Arch Oral Biol.* 2015;60(12):1699-707.
19. Zandi M, Dehghan A, Zandipoor N, Amini P, Doulati S. Effect of different doses and durations of teriparatide therapy on resolution of medication-related osteonecrosis of the jaw: A randomized, controlled preclinical study in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018;46(3):466-72.
20. Jung J, Yoo HY, Kim GT, Lee JW, Lee YA, Kim DY, et al. Short-Term Teriparatide and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for

Regenerative Approach to Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Preliminary Study. *J Bone Miner Res.* 2017;32(12):2445-52.

21. de Almeida AD, Leite FG, Chaud MV, Rebelo MA, Borges L, Viroel FJM, et al. Safety and efficacy of hydroxyapatite scaffold in the prevention of jaw osteonecrosis in vivo. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017.

22. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, Georgiev-Hristov T, Ruiz Bravo-Burguillos E, Abarrategi A, Burgueno M, et al. Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(7):1161-8.

23. Park JH, Kim JW, Kim SJ. Does the Addition of Bone Morphogenetic Protein 2 to Platelet-Rich Fibrin Improve Healing After Treatment for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw? *J Oral Maxillofac Surg.* 2017;75(6):1176-84.

24. Cano-Duran JA, Pena-Cardelles JF, Ortega-Concepcion D, Paredes-Rodriguez VM, Garcia-Riart M, Lopez-Quiles J. The role of Leucocyte-rich and platelet-rich fibrin (L-PRF) in the treatment of the medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). *J Clin Exp Dent.* 2017;9(8):e1051-e9.

ANEXO A – Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos e seu tratamento com enxerto autógeno e β -Trifosfato de cálcio (β -TCP)", Processo FOA nº 00940-2017, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 09 de Março de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 09 de Março de 2018.


DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 09 de Abril de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) and treatment with autogenous graft and β -TCP.", Protocol FOA nº 00940-2017, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 09, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 09, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 09, 2019.


Prof. Ass. Dra. Maria Gsela Laranjeira
Vice-Coordenador da CEUA
CEUA Vice-Coordinator

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

**ANEXO B: NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO: THE INTERNATIONAL
JOURNAL OF ORAL & MAXILLOFACIAL IMPLANTS**

GUIDELINES FOR AUTHORS MANUSCRIPT SUBMISSION Submit manuscripts via JOMI's online submission service: www.manuscriptmanager.com/jomi Manuscripts should be uploaded as a Word (doc) file with tables and figures preferably embedded at the end of the document. No paper version is required.

Acceptable material. Original articles are considered for publication on the condition they have not been published or submitted for publication elsewhere (except at the discretion of the editors). Articles on implant or tissue engineering (TE) basic or clinical research, clinical applications of implant/TE research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant/TE field are invited.

Number of authors. Authors listed in the byline should be limited to four. Secondary contributors can be acknowledged at the end of the article. (Special circumstances will be considered by the editorial chairman.)

Review/editing of manuscripts. Manuscripts will be reviewed by the editorial chairman and will be subjected to blind review by the appropriate section editor and editorial staff consultants with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

Adherence to guidelines. Manuscripts that are not prepared in accordance with these guidelines will be returned to the author before review.

ONLINE ONLY ARTICLES All technology and case reports will appear in online format only. Articles are listed in the issue's Table of Contents and abstracts are printed in the issue. Full text of articles is available online.

MANUSCRIPT PREPARATION

- The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36–47). See <http://www.icmje.org>

- Manuscripts should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.

- Title page. Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.

- Abstract/key words. The abstract should include a maximum of 350 words. A list of key words should be provided, not to exceed six. Abstract

for basic and clinical research articles must be structured with the following four sections: Purpose, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Abstracts of short communications should also be structured but should be a maximum of 250 words. For all other types of articles (ie, literature reviews, technical and case reports), abstracts should not exceed 250 words and need not be structured.

- Article text. Currently there is no article page limit (within reason).

- Acknowledgments. Persons who have made substantive contributions to the study can be acknowledged at the end of the article. Also specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.

- Legends. Figure legends should be typed as a group at the end of the manuscript. Detailed legends are encouraged. For photomicrographs, specify original magnification and stain.
- Tables. Each table should be logically organized, typed on a separate page at the end of the manuscript, and numbered consecutively. Table title and footnotes should be typed on the same page as the table.
- Abbreviations. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
- Trade names. Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name should be included parenthetically at first mention.
- Numbers. Per SI convention, authors are requested to use decimal points rather than commas for fractional numbers.

REFERENCES • All references must be cited in the text, numbered in order of appearance.

- The reference list should appear at the end of the article in numeric sequence.
- Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.
- Avoid using abstracts as references.
- Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

Journal reference style: 1. Waasdorp J, Reynolds MA. Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25:525–531.

Book reference style: 1. Wikesjo UME, Hanisch O, Sigurdsson TJ, Caplanis N. Application of rhBMP-2 to alveolar and periodontal defects. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Chicago: Quintessence, 1999:269–286

ARTICLE ACCEPTANCE Article acceptance is pending receipt of images judged to be of sufficient quality for publication (see the guidelines below). Once a manuscript is accepted, authors should submit high-resolution digital image files (by email or on disk) to:

Managing Editor JOMI Quintessence Publishing Co, Inc 4350 Chandler Drive Hanover Park, IL 60133 Email: jomi.submit@quintbook.com

The disk/package should be labeled with the first author's name, shortened article title, and article number.

DIGITAL IMAGES/ACCEPTED ARTICLES When preparing final images to send, consider the following points: • Resolution must be at least 300 dpi when the image is 3 inches wide.

- Images saved in TIFF format are preferred, but JPG or EPS files are acceptable.
- Images grouped together must be saved as individual files.
- Images containing type should either be saved as a layered file or provided along with a second file with type removed.
- Line art (graphs, charts, drawings) should be provided as vector art (AI or EPS files)
- Please do not embed images into other types of documents (eg, Word, Excel, PowerPoint, etc).

MANDATORY SUBMISSION FORM The Mandatory Submission Form (accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and can be uploaded as a separate document with the article submission, or it can be mailed (see address above) or faxed (630-736-3634) to the JOMI Managing Editor.

PERMISSIONS AND WAIVERS • Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author. • Waivers must be obtained for photographs showing persons, otherwise faces will be masked to prevent identification. • Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Managing Editor (630-736-3634).

REPRINTS Reprints can be ordered from the publisher. Authors receive a 40% discount on quantities of 100 or 200.