

CRISTIAN STATKIEVICZ

“Efeito do zoledronato sobre o processo de reparo alveolar: estudo envolvendo os principais fatores de risco para a osteonecrose dos maxilares e avaliação da terapia com laser em baixa intensidade e terapia fotodinâmica antimicrobiana como propostas preventivas”

**Araçatuba - SP
2016**

CRISTIAN STATKIEVICZ

“Efeito do zoledronato sobre o processo de reparo alveolar: estudo envolvendo os principais fatores de risco para a osteonecrose dos maxilares e avaliação da terapia com laser em baixa intensidade e terapia fotodinâmica antimicrobiana como propostas preventivas”

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia - Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Okamoto

**Araçatuba - SP
2016**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S897e	Statkievicz, Cristian. Efeito do zoledronato sobre o processo de reparo alveolar: estudo envolvendo os principais fatores de risco para a osteonecrose dos maxilares e avaliação da terapia com laser em baixa intensidade e terapia fotodinâmica antimicrobiana como propostas preventivas / Cristian Statkievicz. - Araçatuba, 2016 96 f.; 6 il.; 1 tab. + 1 CD-ROM Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Edilson Ervolino Coorientadora: Profa. Roberta Okamoto 1. Osteonecrose 2. Arcada osseodentária 3. Difosfonatos 4. Lasers 5. Fotoquimioterapia. I. Título Black D64 CDD 617.6
-------	---

Dedicatoria

A Deus

Agradeço à Deus por ter me dado a oportunidade de seguir o meu sonho, por ter colocado ao meu lado pessoas que me conduziram, que me apoiaram, que me compreenderam e que agora compartilham desse alegre momento junto a mim.

Obrigado meu Senhor e meu Deus, eu sei que estava comigo durante os momentos de alegria e de angústia, durante os sorrisos e as lágrimas, entrego essa conquista em tuas mãos, pois tu me destes força e coragem para persistir.

Obrigado Nossa Senhora por ter iluminado meu caminho na direção do aprendizado e assim firmo meu compromisso de aplicar meus conhecimentos para o diagnóstico e tratamento de todo ser humano que assim necessitar.

*“Amai a Deus sobre todas as coisas”
(Mateus 22:37)*

À minha família

Aos meus pais, Gerônimo Statkiewicz e Cecília Koswoski Statkiewicz, eu dedico a vocês esse trabalho, vocês me ensinaram a ser uma pessoa de fé. Cresci vendo o amor e o compromisso de vocês pelo meu futuro e isso me fez se dedicar incansavelmente. Obrigado pelo apoio e pela confiança depositada em mim, jamais alcançaria o que alcancei sem vocês ao meu lado. Obrigado meu pai por dedicar sua vida de intenso trabalho na formação de seus filhos. Obrigado minha mãe por toda a preocupação, por todas as noites que passou acordada cuidando de mim, obrigado por todas as orações. Eu amo vocês.

À minha irmã Tatiane Statkiewicz de Farias e ao meu cunhado Eziquiel Thiago de Farias, agradeço por todo apoio que me deram para realização do meu sonho, pelas horas que passaram conversando comigo me orientando pelo melhor, por todas as orações destinadas ao meu sucesso, e por serem meu espelho profissional. Eu amo vocês.

Ao nosso anjinho, minha sobrinha Carolina Statkiewicz de Farias que me trouxe à alegria de ser tio em meio à turbulência que dia a dia nos coloca, seja muito bem-vinda minha pequena. Eu te amo.

Ao amor da minha vida

Lílian Galanti Zarpelon, minha noiva, minha companheira, meu conforto, minha segurança. Obrigado por meu apoiar em todos os momentos, por entender a minha ausência durante todo esse tempo, por compreender as minhas preocupações, por comemorar comigo a cada conquista. Tenho certeza do seu sucesso, sua dedicação e sua vontade de crescer me fizeram mais forte. Obrigado meu amor pelas orações, que nas horas difíceis me levantaram. Eu te amo.

Aos meus familiares

Agradeço os meus familiares em especial Adriana Tetericz, Paulo Sérgio Lisboa e Valentina que torceram e acreditaram em meu potencial, agradeço a dona Marli, ao seu João, ao Allan e a dona Juraci por sempre me receberem alegremente durante as minhas idas e vindas, sei que vocês torcem pelo meu sucesso, muito obrigado.

*Agradecimentos
especiais*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edilson Ervolino, obrigado por confiar seu trabalho a mim, trabalho esse que conduzimos com muita dedicação, paciência e confiança. Quero lhe agradecer por sempre me receber de portas abertas, por permitir que eu compartilhasse com o senhor minhas preocupações e minhas dúvidas. Meu querido “mestre”, o senhor é um exemplo de pessoa humilde, persistente, compromissada e alegre. Agradeço a Deus por ter recebido um enorme presente de tê-lo como orientador. Entre tantos orientados que o senhor ainda terá, saiba que eu levarei o seu nome e o seu exemplo. Muito obrigado.

À minha coorientadora Profa. Dra. Roberta Okamoto, obrigado por compartilhar de todo seu conhecimento e experiência nesse trabalho, obrigado por esclarecer minhas inúmeras dúvidas e sempre nos receber com um sorriso no rosto. Muito obrigado professora.

Ao Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior e ao Prof. Dr. Francisley Ávila Souza e a todos os professores da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, meus agradecimentos por terem contribuído para minha formação.

Ao Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani que me ajudou e me indicou os caminhos dentro da pós graduação, você me estendeu a mão para que eu pudesse subir. Obrigado meu grande amigo, estou sempre torcendo pelo seu sucesso.

Aos professores da Disciplina de Periodontia do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, em especial, ao Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia e a Profa. Dra. Leticia Helena Theodoro pela preciosa colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Laerte Luiz Bremm, Profa. Dra. Cristina Sayuri Nishimura Miura e ao Prof. Dr. Wagner Basseggio, professores que me ensinaram e me incentivaram durante toda minha graduação a fazer o mestrado, muito obrigado.

À família ZOL, meus queridos: Luan, João, Fernanda, Letícia, Thamires, Tiago e Daniela e Nathalia, gostaria que soubessem que sem o apoio e ajuda de todos vocês a realização desse trabalho não seria possível, tenho guardado no meu coração cada um de vocês, por terem compartilhado comigo inúmeros momentos, dias e dias de trabalho. Hoje posso dizer com toda certeza que vocês são realmente uma família para mim.

Ao meu querido amigo Luan Felipe Toro, obrigado pela sua amizade e por dividir comigo tantos momentos alegres, tristes e engraçados. Tenha certeza que o seu futuro será brilhante e que a vida nunca nos distancie, você é o verdadeiro exemplo de competência, grande abraço meu irmão.

À minha segunda família: Valthierre, sua esposa Fernanda e a pequena Maria Tereza, quero agradecer a vocês por tudo que fizeram por mim, por sempre me receberem de portas abertas, pela confiança depositada em mim. Valthierre, irmão que Deus me

deu, obrigado por me ensinar todos os dias sobre cirurgia, sobre família, sobre a vida, minha gratidão por você é imensurável. Deus os proteja hoje, amanhã e sempre.

Aos meus amigos: Tárik, Willian, Jaqueline, Maria del Pilar, Gestter obrigado por toda força.

Aos meus colegas do curso de pós-graduação que de alguma forma participaram dessa conquista. Muito obrigado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Dr. Wilson Roberto Poi e ao vice-diretor Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, em especial aos dos departamentos de Cirurgia e Clínica Integrada e Ciências Básicas, muito obrigado pela colaboração na realização desse trabalho.

À Capes, pela concessão da bolsa de mestrado (março – maio / 2014).

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado (junho / 2014 – fevereiro / 2016, PROCESSO FAPESP 2014/02199-1).

Aos animais utilizados na pesquisa.

Muito Obrigado!

Epigrafe

*“Por mais que os homens e mulheres sejam
vistos por seus feitos, eles ainda são
reconhecidos por suas faces”*

Charles G. Child III

Resumo



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

Statkiewicz C. **Efeito do zoledronato sobre o processo de reparo alveolar: estudo envolvendo os principais fatores de risco para a osteonecrose dos maxilares e avaliação da terapia com laser em baixa intensidade e terapia fotodinâmica antimicrobiana como propostas preventivas** [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

OBJETIVOS: Os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) e da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no processo de reparo alveolar de ratas com os principais fatores de risco para a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M). **MATERIAIS E MÉTODOS:** Ratas senis (n=29) foram distribuídas nos grupos: SAL, ZOL, ZOL/LLLT e ZOL/aPDT. Durante sete semanas, a cada dois dias, administrou-se pela via intraperitoneal 0,45ml de NaCl 0,9% (SAL) ou 0,45ml desta mesma solução acrescida de 100µg/Kg de zoledronato (ZOL, ZOL/LLLT e ZOL/aPDT). Decorridas três semanas, realizou-se a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Nos grupos ZOL/LLLT e ZOL/aPDT as ratas foram submetidas respectivamente a LLLT ou aPDT aos 0, 2 e 4 dias pós exodontia. A eutanásia foi realizada 28 dias após a exodontia. No sítio de extração dental foram realizadas análises: histopatológica do processo de reparação tecidual, histométrica da área de tecido ósseo neoformado (ATO) e imunoistoquímica direcionada para os seguintes biomarcadores: PCNA, BAX, C3C, TNF α , IL-1 β , IL-6, HIF-1 α , VEGF, CD31, BMP2/4, RUNX-2, OCN, OPG, RANKL e TRAP. **RESULTADOS:** Os grupos tratados com zoledronato apresentaram maior imunomarcção para OPG e menor imunomarcção para RANKL e TRAP. Em ZOL observou-se áreas de osteonecrose, comprometimento da reparação tecidual, menor ATO, menor imunomarcção para PCNA, HIF-1 α , VEGF, CD31, BMP2/4 e OCN, e maior imunomarcção para BAX, C3C, TNF α , IL-1 β , IL-6 e RUNX-2 em relação ao SAL. ZOL/LLLT apresentou melhora em alguns parâmetros em relação ao ZOL (ATO, PCNA, TNF α , HIF-1 α , VEGF, CD31 e RUNX-2), no entanto, poucos foram os parâmetros que se igualaram ao SAL (PCNA, HIF-1 α , VEGF, CD31 e RUNX-2). ZOL/aPDT não apresentou áreas de osteonecrose, o processo de reparação tecidual não diferiu significativamente de SAL, assim como, os seguintes parâmetros ATO, PCNA, BAX, C3C, IL-1 β , HIF-1 α , VEGF, CD31, RUNX-2 e OCN. **CONCLUSÕES:**

O zoledronato compromete o processo de reparação tecidual do sítio de extração dental em ratas com os principais fatores de risco para a ONM-M. LLLT e aPDT são capazes de melhorar eventos relacionados com o processo de reparo alveolar. A aPDT se mostrou a terapia preventiva mais efetiva para evitar a ONM-M. RELEVÂNCIA CLÍNICA: A aPDT pode se constituir em uma alternativa de terapia preventiva para evitar o desencadeamento de ONM-M pós exodontia.

PALAVRAS-CHAVE: osteonecrose, arcada ósseo-dentária, difosfonatos, lasers, fotoquimioterapia

Abstract



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

Statkiewicz C. **The effect of zoledronate during the alveolar healing process: study of the major risk factors for osteonecrosis of the jaw and evaluation with low-level laser therapy and antimicrobial photodynamic therapy proposed as a preventative** [dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2016.

ABSTRACT

OBJECTIVES: The aim of this study was to evaluate the effects of Low Level Laser Therapy (LLLT) and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the alveolar bone repair in rats with the high risk factors for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ). **MATERIALS AND METHODS:** Senile rats (n = 29) were distributed into four groups: SAL, ZOL, ZOL/LLLT and ZOL/aPDT. For seven weeks, every two days, 0,45ml 0.9% NaCl (SAL) or 0,45ml of this same solution plus 100µg/kg zoledronate (ZOL, ZOL/LLLT and ZOL/aPDT) were administered intraperitoneally. After three weeks, the first lower left molar was extracted. In ZOL/LLLT and ZOL/aPDT groups, the rats were submitted to LLLT or aPDT therapy at 0, 2 and 4 days after tooth extraction. Euthanasia was performed 28 days after tooth extraction. In dental extraction site was performed the histopathology analysis of the tissue repair, histometric analysis of newly formed bone area (NFB) and immunohistochemistry related to the following biomarkers: PCNA, BAX, C3C, TNFα, IL-1β, IL-6, HIF-1α, VEGF, CD31, BMP2/4, RUNX-2, OCN, OPG, RANKL and TRAP.

RESULTS: The groups treated with zoledronate showed higher immunolabeling for OPG and lower immunolabeling for RANKL and TRAP. In ZOL group was observed areas of osteonecrosis, impairment of wound healing, lower ATO, lower immunolabeling for PCNA, HIF-1α, VEGF, CD31, BMP2/4 and OCN, and higher immunolabeling for BAX, C3C, TNFα, IL-1β, IL-6 and RUNX-2 when compared to the SAL group. ZOL/LLLT showed improvement in some parameters regarding to ZOL (ATO, PCNA, TNFα, HIF-1α, VEGF, CD31 and RUNX-2), however, few parameters were similar to the SAL (PCNA, HIF-1α, VEGF, CD31 and RUNX-2). ZOL/aPDT did not present areas of osteonecrosis and the tissue repair did not differ significantly from the SAL groups, as well as the following parameters: PCNA, BAX, C3C, IL-1β, HIF-1α, VEGF, CD31, RUNX-2 and OCN. **CONCLUSIONS:** The zoledronate compromises the tissue repair of dental extraction site in rats with the high risk factors for MRONJ. LLLT and aPDT were able to improved the events related to wound's healing. The aPDT

showed to be the most effective preventive therapy to MRONJ. CLINICAL RELEVANCE: The aPDT can be in a preventive therapy to prevent the triggering of MRONJ after dental extraction.

KEYWORDS: bisphosphonates, osteonecrosis, jaw, laser, photochemotherapy

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspectos histológicos quantitativos e qualitativos do sítio de extração dental e adjacências. A: Gráfico apresentando a área de tecido ósseo neoformado (ATO) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós-operatórios. B-J: Fotomicrografias evidenciando a ATO entre o terço apical e médio do alvéolo dental anteriormente ocupado pela raiz mesial do primeiro molar inferior nos grupos SAL (B), ZOL (C), ZOL/LLLT (D) e ZOL/aPDT (E). F-Q: Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido conjuntivo e tecido ósseo no sítio de extração dental e adjacências nos grupos SAL (F, J, N), ZOL (G, K, O), ZOL/LLLT (H, L, P) e ZOL/aPDT (I, M, Q). Em ZOL observar: persistência de inflamação no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental (G); presença frequente de área ocupada por osso não vital (K); grandes sequestros ósseos nas adjacências do sítio de extração (O); pequena quantidade de tecido ósseo neoformado no alvéolo dental (C) e; Em SAL e ZOL/aPDT as características histológicas se mostraram similares: ausência de inflamação no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental (F, I); ausência de grandes áreas de osso não vital (J, M); presença de pequena quantidade de lacunas vazias (N, Q) e; nenhum sequestro ósseo nas adjacências do sítio de extração. Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo; vs, vasos sanguíneos; setas brancas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias; setas azuis, osteoblastos; setas verdes, osteoclastos; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL/LLLT. Coloração: HE. Aumento original: 400x (B-E); 200x (F-Q). Barras de escala: 150 µm (B-E); 75 µm (F-Q).

65

Figura 2: Padrão de imunomarcacão para biomarcadores de proliferaçãocelular (PCNA) e apoptose celular (BAX e C3C). A: Tabela apresentando a quantidade de células PCNA-positivas, BAX-positivas e C3C-positivas no tecido epitelial (te) e tecido conjuntivo (tc) da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós-operatórios. B-J: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para PCNA (B, E, H), BAX (C, F, I) e C3C (D, G, J) em SAL (B-D), ZOL (E-G) e ZOL/aPDT (H-J). Abreviações e símbolos: te, tecido epitelial; tc, tecido conjuntivo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL. Contra-coloraçã: Fast green (B, E, H); Hematoxilina de Harris (C, D, F, G, I, J). Barras de escala: 20 µm.

66

Figura 3: Padrão de imunomarcacão para as principais citocinas com atividade pró-inflamatória (TNFα, IL-1β e IL-6). A: Tabela apresentando a densidade óptica de imunomarcacão para TNFα, IL-1β e IL-6 no tecido conjuntivo (tc) da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós-operatórios. B-G: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para TNFα (B,

67

E, H), IL-1 β (C, F, I) e IL-6 (D, G, J) em SAL (B-D), ZOL (E-G) e ZOL/aPDT (H-J). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL/LLLT. Barras de escala: 20 μ m.

Figura 4: Padrão de imunomarcação para biomarcadores da angiogênese (HIF-1 α e VEGF) e vasculatura (CD31). A: Tabela apresentando a quantidade de células HIF-1 α -positivas, VEGF-positivas e vasos sanguíneos CD31-positivas no tecido conjuntivo (tc) e tecido ósseo (to) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós-operatórios. B-G: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcação para HIF-1 α (B, E, H), VEGF (C, F, I) e CD31 (D, G, J) em SAL (B-D), ZOL (E-G) e ZOL/aPDT (H-J). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris* (B-M). Barras de escala: 20 μ m.

68

Figura 5: Padrão de imunomarcação para biomarcadores da osteoblastogênese e atividade dos osteoblastos (BMP2/4, RUNX-2 e OCN). A: Tabela apresentando a quantidade de células BMP2/4-positivas, RUNX-2-positivas e OCN-positivas no tecido ósseo (to) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós-operatórios. B-J: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcação para BMP2/4 (B, E, H), RUNX-2 (C, F, I) e OCN (D, G, J) em SAL (B-D), ZOL (E-G) e ZOL/aPDT (H-J). Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL/LLLT. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris* (B, D, E, G, H, J); *Fast green* (C, F, I). Barras de escala: 20 μ m.

69

Figura 6: Padrão de imunomarcação para biomarcadores da osteoclastogênese/ atividade dos osteoclastos (OPG, RANKL) e recrutamento de osteoclastos (TRAP). A: Tabela apresentando a quantidade de células OPG-positivas, RANKL-positivas e TRAP-positivas no tecido ósseo (to) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós-operatórios. B-J: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcação para OPG (B, E, H), RANKL (C, F, I) e TRAP (D, G, J) em SAL (B-D), ZOL (E-G) e ZOL/aPDT (H-J). Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Barras de escala: 20 μ m.

70

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos moles e duros durante o processo de reparação pós-extração dental em SAL, ZOL, ZOL/LLLT e ZOL/aPDT aos 28 dias pós-operatórios.	63
---	-----------

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

%: porcentagem

°C: graus Celsius

±: mais ou menos

<: menor

†: diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL

‡: diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL

¶: diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL/LLLT

µg/kg: microgramas por quilograma

µg: micrograma

µl: microlitro

µm: micrômetro

AAOMS: Associação Americana de Cirurgiões Buco-Maxilo-Faciais

AM: Amazonas

ANOVA: Análise de Variância

aPDT: terapia fotodinâmica antimicrobiana

ATO: área de tecido ósseo neoformado

BAX: proteína X associada ao BCL-2

BMP2/4: proteína óssea morfogenética 2 e 4

BPs: bisfosfonatos

C3C: caspase 3 ativada

cm²: centímetro quadrado

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO: espécie reativa de oxigênio

EUA: Estados Unidos da América

FOA: Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g: gramas

HE: hematoxilina e eosina

HIF1α: fator induzido por hipóxia 1 alfa

IL-1β: interleucina 1 beta

IL-6: interleucina 6

InGaAlP: Índio Gálio Alumínio Fósforo

J: joule

J/cm²: joules por centímetro quadrado

Kg: quilograma

kVp: peak kilovoltagem

LLLT: terapia com laser em baixa intensidade

M: molar

mg: miligrama

ml: mililitros

mm²: milímetros quadrados

mW: miliwatts

nm: nanômetro

NaCl: cloreto de sódio

OCN: osteocalcina

ONM-M: osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa

OPG: osteoprotegerina

PBS: tampão fosfato salino

PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular

PE: periodontite experimental

pH: potencial hidrogeniônico

RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B

RS: Rio Grande do Sul

RUNX-2: fator de transcrição relacionado a Runt 2

s: segundos

SP: São Paulo

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

W/cm²: watts por centímetro quadrado

Lista de anexos

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Normas para publicação segundo o periódico <i>Clinical Oral Investigation</i>	83
ANEXO B: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	96

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	33
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3 RESULTADOS	43
4 DISCUSSÃO	48
5 CONCLUSÃO.....	58
AGRADECIMENTOS	60
TABELAS	62
FIGURAS	64
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS	82

Manuscrito para publicação



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA



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

Normatização segundo a revista *Clinical Oral Investigation*

Título: Efeito do zoledronato sobre o processo de reparo alveolar: estudo envolvendo os principais fatores de risco para a osteonecrose dos maxilares e avaliação da terapia com laser em baixa intensidade e terapia fotodinâmica antimicrobiana como propostas preventivas

Autores:

¹ Cristian Statkiewicz

² Roberta Okamoto

² Edilson Ervolino

1 - CD, Aluno de Mestrado em Odontologia (Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial), Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Brasil.

2 - CD, ME, DR, Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Brasil.

Autor correspondente: Edilson Ervolino

Endereço: Rodovia Marechal Rondon, km 528, Araçatuba, São Paulo, Brasil

CEP: 16015-050

Fax: (+55) - (18) 3636 2758

E-mail: eervolino@foa.unesp.br

Introdução



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BPs) são fármacos amplamente utilizados para o tratamento de osteopatias com atividade osteolítica, controle de dor óssea, regulação de hipercalcemia e inibição da progressão de metástase em neoplasias malignas osteotrópicas [1]. Tais medicamentos exercem potente ação inibitória sobre o processo de reabsorção óssea [2]. Os BPs apresentam uma estrutura química análoga ao pirofosfato endógeno, representada por dois grupamentos fosfatos unidos covalentemente a um carbono central, no qual estão ligadas duas cadeias laterais, R1 e R2, responsáveis pela afinidade da droga aos cristais de hidroxiapatita e pela potência/principais propriedades farmacológicas de cada um dos BPs, respectivamente [2]. Há duas classes de BPs, cujas estruturas químicas diferem por apresentarem ou não nitrogênio em sua cadeia lateral R2 [2]. Dos BPs que contêm nitrogênio, o zoledronato é o que apresenta a maior potência relativa. O zoledronato altera o metabolismo ósseo atuando pela inibição da via do mevalonato [2], que impede a ocorrência de inúmeras alterações na dinâmica do citoesqueleto dos osteoclastos, as quais são essenciais para a execução da atividade reabsortiva. Além disso, inibe a osteoclastogênese [3] e estimula o desencadeamento de apoptose prematura em osteoclastos ativos [2,4-6].

O crescente envelhecimento da população mundial ocasiona um aumento de doenças ou condições osteolíticas, o que faz com que o emprego de drogas com ação anti-reabsortiva, como os BPs e o inibidor de RANKL, seja cada vez mais frequente. Uma reação adversa ocasionada por estes tipos de medicamentos e que ainda se constitui em um desafio para a odontologia é a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M). A Associação Americana de Cirurgiões Bucal-Maxilo-Faciais (AAOMS, American Association of Oral and Maxillofacial Surgery) define a ONM-M como a presença de osso exposto na região buco-maxilo-facial, por um período maior do que oito semanas, em pacientes submetidos a tratamento prévio ou atual com droga anti-reabsortiva e que não possuem história prévia de radioterapia nos maxilares [7]. Esta é uma condição menos frequente em pacientes que fazem uso de BPs administrados por via oral, no entanto, sua incidência atinge de 1 a 12% dos pacientes que utilizam tais medicamentos pela via intravenosa. Além disso, os BPs têm efeito cumulativo, e esta incidência pode atingir 21% dos pacientes após o terceiro ano de uso deste tipo de fármaco [8].

Ainda que as primeiras descrições de ONM-M tenham sido publicadas em 2003 [9-11], a etiopatogenia da doença é pobremente compreendida, o que dificulta sobremaneira sua prevenção e tratamento [12-14]. Dentre os supostos fatores etiopatológicos apontados como desencadeadores da ONM-M estão: a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos; o efeito citotóxico dos BPs; o potente efeito antiangiogênico; e o favorecimento à infecção induzida por tais medicamentos [15-19]. A investigação dos fatores etiopatológicos em humanos apresenta limitações, portanto, os modelos experimentais em animais são de grande importância, inclusive para avaliação de terapias curativas e preventivas para a ONM-M, e direcionam as pesquisas clínicas.

O tratamento da ONM-M tem sido efetuado por diferentes abordagens clínicas, as quais têm se baseado exclusivamente no estadiamento clínico da doença, e compreendem desde bochechos com gluconato de clorexidina 0,12%, antibioticoterapia prolongada e debridamento cirúrgico da lesão, que em casos mais graves pode consistir em mandibulectomia ou maxilectomia parcial [12-14,20]. Atualmente tem sido sugerida a prescrição de antibioticoterapia profilática em pacientes que fazem uso crônico de BPs e necessitam de intervenções odontológicas invasivas, especialmente exodontias [21-23], no entanto, esta terapia preventiva pode se mostrar falha. Soma-se a isso o fato de o uso inadequado de um antimicrobiano na antibioticoprofilaxia ser capaz de gerar cepas de bactérias antibiótico-resistentes, predispor ao desenvolvimento de superinfecções, ocasionar reações alérgicas e interagir com outras drogas, especialmente em pacientes oncológicos, cujo tratamento envolve a utilização concomitante de diversos medicamentos para o tratamento da doença de base [23-25].

A laserterapia tem sido amplamente empregada na área da saúde, em especial nas diversas especialidades odontológicas. Duas modalidades de laserterapia que poderiam se constituir em terapias preventivas para ONM-M são: a terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) e a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). Embora o mecanismo de ação da LLLT ainda não tenha sido completamente elucidado, seus efeitos são explicados por reações primárias que ocorrem ao nível das mitocôndrias, onde a irradiação promove a ativação de fotoreceptores envolvidos com a cadeia transportadora de elétrons, o que resulta em aumento do potencial energético das células. Além disso, ocorrem reações secundárias que consistem na transdução de sinais ao nível citoplasmático que ocasionam aumento da proliferação celular e/ou

diferenciação celular. Estudos em modelos animais mostram que a LLLT pós exodontia melhora o processo de reparo alveolar [26-32]. Da mesma forma, estudos clínicos em humanos também demonstram que a LLLT pós exodontia exerce efeitos positivos sobre os principais sinais e sintomas que acompanham o processo de reparo alveolar [31,33-35].

A aPDT consiste em uma reação fotoquímica oxigênio-dependente, que ocorre sob ação da luz, na qual a ativação de um agente fotossensibilizador gera altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO). Deste modo, tem-se uma cascata de eventos oxidativos que levam à morte bacteriana pela ação citotóxica [36]. Além da ação antimicrobiana, alguns estudos mostram que a aPDT ainda preserva grande parte das ações biostimulatórias do laser de baixa intensidade [37,38]. Theodoro et al. [39] reportaram que a aPDT se mostrou um tratamento efetivo para reduzir a carga microbiana de alvéolos dentais pós-extração de molares com periodontite experimental, o que favoreceria o processo de reparação tecidual. Estudos clínicos em humanos mostram que a aPDT atua acelerando o processo de reparação tecidual pós exodontia, minimizando os sintomas indesejáveis e as complicações pós-operatórias [35,40,41].

Tendo em vista o potencial da laserterapia, e diante da necessidade de terapias efetivas e seguras para prevenir o desencadeamento da ONM-M pós exodontia, o presente estudo avaliou o efeito da LLLT e da aPDT no processo de reparo alveolar de ratas com os principais fatores de risco para a ONM-M.

Materiais e Métodos



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizados vinte e nove *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar. Para que houvesse uma correlação com o perfil epidemiológico da ONM-M no ser humano, empregou-se neste estudo fêmeas senis, 20 meses de idade, e com peso corporal compreendido entre 350 – 450 g, tendo em vista que a doença acomete com maior frequência mulheres com idade avançada. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA – UNESP (PROCESSO CEUA Nº 00581-2013).

Delineamento experimental

Anestesia

Para todos os procedimentos cirúrgicos (instalação da ligadura, exodontia e eutanásia), os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil).

Periodontite induzida por ligadura

Um dia antes do início do plano de tratamento medicamentoso foi instalada uma ligadura de algodão (fio de algodão #24, Coats Corrente®, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo, que foi mantida durante três semanas, com o intuito de induzir a periodontite experimental (PE).

Protocolo medicamentoso

O plano de tratamento medicamentoso teve duração de sete semanas e a administração de veículo ou zoledronato (Sigma Chemical®, St Louis, MO, EUA) ocorreu pela via intraperitoneal, obedecendo um intervalo de dois dias entre as injeções. A dose de zoledronato foi de 100 µg/Kg, a qual foi diluída em 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%. Tal dose e o plano de tratamento medicamentoso

consistiram em uma adaptação para o rato do protocolo empregado atualmente para a terapia oncológica em humanos [42-43].

Exodontia

Para a exodontia do primeiro molar inferior, os animais foram posicionados em mesa cirúrgica, a ligadura foi removida, foi executada a antisepsia da cavidade bucal, sindesmotomia, luxação e extração do primeiro molar inferior esquerdo com a utilização de instrumentais odontológicos adaptados.

Laserterapia (LLLT ou aPDT)

Para LLLT e aPDT o laser de baixa potência empregado no presente estudo foi o Thera Lase® (D.M.C. Equipamentos Ltda®, SP, Brasil) com os seguintes parâmetros: emissor: InGaAlP; comprimento de onda: 660 nm (laser visível - vermelho); potência: 35 mW; modo de operação: laser contínuo; diâmetro do spot: 0,0283 cm²; modo de aplicação: laser contato, pontual; energia: 2,1 J/ponto; tempo de aplicação: 60 seg; quantidade de pontos de aplicação: 1; densidade energética por ponto: 74,2 J/cm²; irradiância: 1,23 W/cm².

Para a LLLT foi realizada a irradiação do alvéolo dental durante 60 segundos. O laser foi aplicado em um único ponto no centro do alvéolo dental com a ponteira laser posicionada paralelamente ao seu longo eixo e em contato com a área tratada.

Para a aPDT utilizou como agente fotossensibilizador o azul de metileno na concentração de 100 µg/ml. Foi depositado no sítio de extração e na mucosa sobrejacente do primeiro molar inferior esquerdo 500 µl do agente fotossensibilizador. Sessenta segundos após a sua deposição foi realizada a irradiação do alvéolo dental do modo que foi descrito anteriormente para a LLLT.

Grupos experimentais

Um dia antes do início do plano de tratamento medicamentoso foi instalada uma ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. Em seguida as ratas foram distribuídas em quatro grupos experimentais: SAL (n=7), ZOL (n=7), ZOL/LLLT (n=8) e ZOL/aPDT (n=7). Durante sete semanas, a cada dois dias, administrou-se pela via intraperitoneal 0,45ml de NaCl 0,9% (SAL) ou 0,45ml desta mesma solução acrescida de 100µg/Kg de zoledronato (ZOL, ZOL/LLLT e ZOL/aPDT). Decorridas três semanas, removeu-se a ligadura e realizou-se a

exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Nos grupos SAL e ZOL não foi realizado nenhum tratamento local. No grupo ZOL/LLLT as ratas foram submetidas à três sessões de LLLT no sítio de extração aos 0, 2 e 4 dias pós exodontia. No grupo ZOL/aPDT as ratas foram submetidas à três sessões de aPDT no sítio de extração aos 0, 2 e 4 dias pós exodontia. Em todos os grupos as eutanásias foram realizadas 28 dias após a exodontia.

Eutanásia e obtenção das amostras

Para eutanásia, os animais foram profundamente anestesiados e procedeu-se a perfusão transcardíaca com solução salina fisiológica acrescida de 0,1% de heparina (100 ml), seguida de solução fixadora (800 ml), constituída de 4% de formaldeído (Sigma Chemical®, Saint Louis, MO, EUA) em tampão fosfato salino (PBS - Sigma Chemical®), 0,1M, 4°C, pH 7,4.

Processamento histológico das amostras

As hemimandíbulas foram dissecadas e submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora durante 72 horas. As amostras foram desmineralizadas em solução constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma Chemical®), durante 60 dias, submetidas ao processamento histológico convencional, incluídas em parafina, e seccionadas em micrótomo com 4 µm de espessura. Foram coletados, de lingual para vestibular, as secções histológicas da porção do alvéolo dental anteriormente ocupada pelo primeiro molar inferior esquerdo e mucosa sobrejacente.

Para a análise histopatológica do sítio de extração dental e adjacências, e para a análise histométrica do tecido ósseo neoformado (ATO), as secções histológicas foram submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina (HE).

Para análise imunoistoquímica, as secções histológicas foram submetidas à técnica da imunoperoxidase indireta empregando-se os seguintes anticorpos primários: anti-PCNA do rato gerado em camundongo (VP-P980, Vector Laboratories Inc.®, Burlingame, CA, EUA), anti-BAX do rato gerado em coelho (SC-526, Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, EUA), anti-C3C do rato gerado em coelho (Asp175, Cell Signaling Technology®, Beverly, MA, EUA), anti-TNFα do rato gerado em cabra (SC-1348, Santa Cruz Biotechnology®), anti-IL-1β do rato gerado em cabra (SC-1252, Santa Cruz Biotechnology®), anti-IL-6 do rato gerado em coelho (SC-1265 R, Santa

Cruz Biotechnology®), anti-HIF-1 α do rato gerado em coelho (SC-10790, Santa Cruz Biotechnology®), anti-VEGF do rato gerado em camundongo (SC-7269, Santa Cruz Biotechnology®), anti-CD31 do rato gerado em cabra (SC-1506, Santa Cruz Biotechnology®), anti-BMP2/4 do rato gerado em coelho (SC-9003, Santa Cruz Biotechnology®), anti-RUNX-2 do rato gerado em coelho (SC-10758, Santa Cruz Biotechnology®), anti-OCN do rato gerado em cabra (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology®), anti-OPG do rato gerado em cabra (SC-8468, Santa Cruz Biotechnology®), anti-RANKL do rato gerado em cabra (SC-7628, Santa Cruz Biotechnology®) e anti-TRAP do rato gerado em cabra (SC-30833, Santa Cruz Biotechnology®). O processamento imunoistoquímico seguiu o protocolo descrito por Garcia et al. [44]. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos mesmos procedimentos, suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

Análise dos resultados

Análise da condição geral de saúde e exame clínico intrabucal

Foi verificada a condição geral de saúde dos animais durante todo o período experimental e efetuado o monitoramento do peso corporal semanalmente. Foi realizado o exame clínico intrabucal, que consistiu na inspeção minuciosa da cavidade bucal, em especial, do sítio de extração dental.

Análises histológicas

Foram utilizadas três secções histológicas situadas na porção vestibular, media e lingual do alvéolo dental para se efetuar a análise histopatológica e histométrica, e uma secção histológica da porção central do alvéolo para se efetuar as análises imunoistoquímicas. As imagens foram capturadas via utilização de câmera digital (AxioCam®, Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (AxioLab®) e conectada a um microcomputador. Todas as análises foram realizadas por um histologista certificado (EE), previamente calibrado e cego aos tratamentos.

Análise histopatológica do sítio de extração dental e adjacências

Foi efetuada em microscopia óptica avaliando-se os seguintes parâmetros: 1) intensidade da resposta inflamatória local; 2) extensão do processo inflamatório; 3) padrão de celularidade e de estruturação do tecido epitelial; 4) padrão de celularidade

e de estruturação do tecido conjuntivo; 5) padrão de celularidade e de estruturação do tecido ósseo e; 6) padrão de contaminação do sítio de extração dental.

Análise histométrica do osso alveolar neoformado

Foram capturadas as imagens das áreas descritas acima e com o auxílio do programa de análise de imagens (Axiovision 4.8.2®, Carl Zeiss) foi mensurada a ATO, a qual foi expressa em mm², como média $\pm$ desvio padrão em cada grupo experimental.

Análise imunoistoquímica

Foram adquiridas imagens do tecido epitelial da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental nas secções histológicas imunomarcadas com PCNA, BAX e C3C; do tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental nas secções histológicas imunomarcadas com HIF-1 α , VEGF e CD31; e do tecido ósseo neoformado nas secções histológicas imunomarcadas com HIF-1 α , VEGF, CD31, BMP2/4, RUNX-2, OCN, OPG, RANKL e TRAP. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Axiovision 4.8.2) foi realizada a mensuração da área ocupada por tecido epitelial e conjuntivo sobre os alvéolos dentais, e da área ocupada por tecido ósseo no sítio de extração dental. Em cada uma destas secções histológicas foram quantificadas as células imunomarcadas, assim como, os vasos sanguíneos imunomarcados com CD31. Tais valores foram expressos por mm² sob a forma de média $\pm$ desvio padrão.

Para TNF- α , IL-1 β e IL-6, a análise imunoistoquímica foi realizada no tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental, utilizando-se o programa de análise de imagens citado anteriormente, no qual foi demarcada a imunomarcção por meio da ferramenta *limiar de cor*, o que possibilitou a obtenção da densidade óptica de imunomarcção, expressa em porcentagem de unidade arbitrária de densidade óptica como média $\pm$ desvio padrão.

Análise estatística dos dados

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brasil). Foram empregados os testes de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

RESULTADOS

Condição geral de saúde e exame clínico intrabucal

As condições gerais de saúde dos animais utilizados neste estudo se mantiveram constantes durante todo o período experimental. Tais animais toleraram muito bem o procedimento cirúrgico de exodontia do primeiro molar inferior, realizado em todos os grupos experimentais, assim como as três sessões de LLLT ou aPDT, realizadas nos grupos ZOL/LLLT e ZOL/aPDT, respectivamente. Ao final do período experimental não houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal médio dos animais entre SAL (350 ± 5 g), ZOL (342 ± 7 g), ZOL/LLLT (340 ± 6 g) e ZOL/aPDT (350 ± 7 g). Também não houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal dos animais de um mesmo grupo ao longo do período experimental. A maioria dos animais apresentou uma leve redução do peso corporal após a exodontia, todavia houve um rápido restabelecimento.

Ao exame clínico intrabucal não foi constatada nenhuma alteração macroscópica na cavidade bucal e no sítio de extração dental em SAL, ZOL/LLLT e ZOL/aPDT. Em ZOL a dimensão das lojas cirúrgicas se apresentou maior em relação aos demais grupos experimentais, e em algumas ratas observou-se exposição óssea no sítio de extração e adjacências.

Análise histopatológica do processo de reparação tecidual pós exodontia

Os grupos SAL, ZOL/LLLT e ZOL/aPDT apresentaram um processo de reparação tecidual do sítio de extração dental e mucosa sobrejacente similar. No entanto, o grupo ZOL teve o processo de reparação tecidual severamente comprometido e condizente com um quadro de ONM-M (Fig. 1). Os parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos durante o processo de reparação pós-exodontia em SAL, ZOL, ZOL/LLLT e ZOL/aPDT aos 28 dias pós-operatórios estão apresentados na Tabela 1.

Área de osso neoformado no sítio de extração dental

A ATO foi menor nos grupos ZOL e ZOL/LLLT em relação ao SAL. Em ZOL/aPDT, a ATO não diferiu de SAL e foi significativamente maior que ZOL e ZOL/LLLT (Fig. 1).

Padrão de imunomarcacão

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de PCNA, BAX, C3C, TNF α , IL-1 β , IL-6, HIF-1 α , VEGF, CD31, BMP2/4, RUNX-2, OCN, OPG, RANKL e TRAP mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação. As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom escura confinada exclusivamente ao núcleo, no caso de PCNA e RUNX-2, predominantemente confinada ao núcleo, no caso de HIF-1 α e BAX, confinada exclusivamente ao citoplasma, no caso de C3C, CD31 e TRAP, e confinada ao citoplasma e em menor escala à matriz extracelular, no caso de TNF α , IL-1 β , IL-6, VEGF, BMP2/4, OCN, OPG e RANKL.

PCNA, BAX e C3C nos tecidos epitelial e conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental

A imunomarcacão para PCNA, BAX e C3C estava predominantemente presente em queratinócitos e fibroblastos. Em ambos os tecidos, em ZOL a quantidade de células PCNA-positivas foi menor que em SAL. ZOL/LLLT e ZOL/aPDT não diferiram entre si e em relação ao SAL, no entanto, a quantidade de células PCNA-positivas em ambos os grupos foi maior que em ZOL. Em ZOL e ZOL/LLLT a quantidade de células BAX-positivas e C3C-positivas, tanto no tecido epitelial quanto no tecido conjuntivo, foi maior que em SAL. Em ZOL/aPDT, a quantidade de células BAX-positivas e C3C-positivas nos tecidos epitelial e conjuntivo foi menor que em ZOL. Não houve diferença significativa na imunomarcacão para BAX e C3C em ambos os tecidos entre SAL e ZOL/aPDT, exceto na quantidade de células BAX-positivas no tecido conjuntivo, que se mostrou maior em ZOL/aPDT (Fig. 2).

TNF α , IL-1 β e IL-6 no tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental

A imunomarcacão para TNF α , IL-1 β e IL-6 estava presente em células inflamatórias. A matriz extracelular do tecido conjuntivo também exibiu marcação que variou de discreta à moderada. Em ZOL, ZOL/LLLT e ZOL/aPDT, a densidade óptica de imunomarcacão para TNF α , IL-1 β e IL-6 foi maior que em SAL, exceto em ZOL/aPDT, onde a densidade óptica de imunomarcacão para IL-1 β não diferiu de SAL. Em ZOL/LLLT e ZOL/aPDT a densidade óptica de imunomarcacão para todos

os mediadores inflamatórios foi menor que em ZOL, exceto em ZOL/LLLT, onde a imunomarcacão para IL-6 não diferiu de ZOL. A imunomarcacão para TNF α e IL-6 em ZOL/aPDT foi menor que em ZOL/LLLT (Fig. 3).

HIF-1 α , VEGF e CD31 nos tecidos conjuntivo e ósseo do sítio de extração dental

A imunomarcacão para HIF-1 α e VEGF estava predominantemente presente em fibroblastos e osteoblastos, e para CD31 em células do endotélio vascular. Em ZOL a quantidade de células HIF-1 α -positivas e VEGF-positivas, tanto no tecido conjuntivo quanto no tecido ósseo, foi menor que em SAL. Em ZOL/LLLT a quantidade de células HIF-1 α -positivas e VEGF-positivas no tecido ósseo foi menor que em SAL. No tecido conjuntivo a imunomarcacão para HIF-1 α e VEGF foi maior no grupo ZOL/LLLT em relação ao grupo ZOL. ZOL/aPDT, tanto no tecido conjuntivo quanto no tecido ósseo, apresentou imunomarcacão para HIF-1 α e VEGF que não diferiu de SAL e foi significativamente maior que ZOL. Em ZOL e ZOL/aPDT a quantidade de vasos sanguíneos CD31-positivos no tecido conjuntivo foi menor que em SAL. Neste tecido, a imunomarcacão em ZOL/LLLT e ZOL/aPDT foi significativamente maior que em ZOL. Em ZOL e ZOL/LLLT a quantidade de vasos sanguíneos CD31-positivos no tecido ósseo foi menor que em SAL. Neste tecido, ZOL/aPDT não diferiu de SAL e foi significativamente maior que ZOL (Fig. 4).

BMP2/4, RUNX-2 e OCN no tecido ósseo do sítio de extração dental

A imunomarcacão para BMP2/4 estava presente nas adjacências do tecido ósseo neoformado e em osteoblastos, para RUNX-2 em pré-osteoblastos nas adjacências da matriz óssea e para OCN em osteoblastos e na matriz extracelular. A quantidade de células BMP2/4-positivas foi menor nos grupos tratados com zoledronato quando comparados com o grupo SAL. Em ZOL/aPDT a imunomarcacão para BMP2/4 foi maior que em ZOL. A imunomarcacão para RUNX-2 foi maior em ZOL em relação ao SAL. ZOL/LLT e ZOL/aPDT não diferiram entre si, não diferiram de SAL e apresentaram uma quantidade de células RUNX-2-positivas menor que ZOL. A imunomarcacão para OCN foi menor nos grupos ZOL e ZOL/LLLT em relação ao SAL. Em ZOL/aPDT, a imunomarcacão para OCN não diferiu de SAL e foi significativamente maior que ZOL e ZOL/LLLT (Fig. 5).

OPG, RANKL e TRAP no tecido ósseo do sítio de extração dental

A imunomarcacão para OPG e RANKL estava predominantemente presente em osteoblastos. A imunomarcacão para TRAP estava presente em osteoclastos. A quantidade células OPG-positivas não diferiu nos grupos tratados com zoledronato e se mostrou maior em relação ao SAL. A imunomarcacão, tanto para RANKL quanto para TRAP, não diferiu nos grupos tratados com zoledronato e se mostrou menor em relação ao SAL (Fig. 6).

Discussão



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

DISCUSSÃO

O zoledronato é empregado no tratamento de doenças ou condições osteolíticas. Por ser o bisfosfonato de maior potência relativa dentro desta classe de medicamentos, seu uso tem sido associado com a maioria dos casos de ONM-M. A etiopatogenia da doença ainda é pobremente compreendida, o que dificulta sua prevenção e tratamento. Com o intuito de compreender sua etiopatologia o presente estudo estabeleceu e avaliou vários parâmetros em um modelo experimental que reuniu os principais fatores de risco para a ONM-M. Foi constatado neste estudo que o zoledronato comprometeu significativamente o processo de reparo pós exodontia e desencadeou ONM-M. Além disso, uma vez que a única proposta preventiva para a ONM-M é a antibioticoterapia, a qual se mostra falha na profilaxia desta condição, o outro propósito deste estudo foi avaliar neste modelo experimental a efetividade da LLLT e aPDT na prevenção desta condição patológica. Foi verificado que, dentre as terapias avaliadas, a aPDT foi a mais efetiva e minimizou as consequências negativas do zoledronato, tanto sobre os tecidos moles quanto sobre os tecidos duros do sítio de extração dental, via estimulação da capacidade de reparação tecidual, o que a coloca como estratégia potencialmente capaz de evitar o desencadeamento da ONM-M.

A análise histopatológica efetuada no presente estudo evidenciou que o zoledronato comprometeu a capacidade de regeneração do tecido epitelial, uma vez que não houve restituição deste tecido aos 28 dias pós-operatórios. Tais achados, em associação com a menor quantidade de células PCNA-positivas e maior quantidade de células BAX-positivas e C3C-positivas deixam claro que o zoledronato exerce um efeito inibitório sobre a proliferação e estimulatório sobre apoptose dos queratinócitos do tecido epitelial sobrejacente ao sítio de extração dental. Tais resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram que os BPs exercem um efeito negativo sobre os queratinócitos da mucosa bucal. Estes estudos mostraram que os BPs são capazes de diminuir significativamente a proliferação [45-49], capacidade de migração [45,50], adesão intercelular [46] e maturação de queratinócitos [46], eventos essenciais para o processo de regeneração do tecido epitelial. Além disso, a viabilidade dos queratinócitos maduros é consideravelmente prejudicada pelos BPs uma vez que tais fármacos são capazes de induzir apoptose [50,51] e senescência

prematura [52] em tais células, o que comprometeria a integridade da estrutura do tecido epitelial.

No presente estudo constatamos ainda com a análise histopatológica e imunoistoquímica que o zoledronato retardou e dificultou sobremaneira a conclusão do reparo do tecido conjuntivo, uma vez que houve persistência de infiltrado inflamatório na lâmina própria, o qual é sustentado pela alta e prolongada expressão das principais citocinas com atividade pró-inflamatória, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 . Além disso, o presente estudo mostrou um efeito negativo do zoledronato sobre a proliferação de células conjuntivas, o que está de acordo com estudos anteriores [53-56]. Este estudo também mostrou que o zoledronato provocou aumento de apoptose em células conjuntivas, o que corrobora com estudos prévios [55-59].

O uso da LLLT em ratas com os principais fatores de risco para a ONM foi capaz de exercer efeitos positivos sobre o processo de reparo do tecido epitelial e tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental, exercendo efeito anti-inflamatório e atuando via estimulação da proliferação de queratinócitos e fibroblastos. Tais achados estão de acordo com estudos que demonstraram aumento da viabilidade celular quando queratinócitos e fibroblastos tratados com BPs são submetidos à LLLT [60,61]. A LLLT também foi capaz de atenuar a resposta inflamatória que persistia no sítio de extração dental, o que foi constatado pela menor intensidade e extensão do processo inflamatório, assim como, pela redução dos níveis de algumas citocinas com atividade pró-inflamatória, o que favoreceu ainda mais o processo de reparação da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental. Um dos eventos que poderiam comprometer a integridade dos tecidos moles neoformado é a elevada taxa de apoptose celular, a qual se mostrou elevada durante tratamento com zoledronato independentemente do emprego da LLLT. Tais resultados estão de acordo com Pansani et al. [53] que reportaram que a taxa de apoptose de fibroblastos tratados com zoledronato não sofreu significativa redução após LLLT. Todavia, Lee et al. [60] mostraram que queratinócitos tratados com BPs e submetidos à LLLT, embora não tenham alterações significativas nos níveis de BAX, caspase 3, 7 e 9, exibiram redução expressiva de alterações morfológicas condizentes com apoptose celular.

No grupo ZOL/aPDT as características histopatológicas do sítio de extração dental e adjacências, o aumento da proliferação celular, a diminuição da apoptose celular e o decréscimo dos níveis das principais citocinas com atividade pró-inflamatória na mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental evidenciaram que a

aPDT foi capaz de reverter as consequências negativas do zoledronato nestes tecidos. O presente estudo foi o primeiro a fazer a proposição e a caracterização da aPDT como estratégia preventiva para evitar a ONM-M diante dos principais fatores de risco para a doença. Nossos achados estão de acordo com estudos prévios que mostraram que a aPDT exerce efeito positivo sobre o processo de reparação do tecido epitelial e do tecido conjuntivo e reduz a infecção local. Estudos em feridas cutâneas infectadas mostraram que a aPDT reduziu a carga bacteriana [62], diminuiu o infiltrado inflamatório local [62], reduziu os níveis de marcadores inflamatórios [62-64], atenuou a degradação do colágeno da matriz extracelular [65], elevou os marcadores de proliferação celular [64], estimulou a neoangiogênese local [64], elevou a taxa de reepitelização [62,65] e estimulou tanto a remodelação do colágeno quanto a organização das fibras colágenas da matriz extracelular. Garcia et al. [66] reportaram que durante o processo de reparo de queimadura cutânea de terceiro grau o emprego da aPDT reduziu a magnitude da resposta inflamatória, estimulou a neoangiogênese local, elevou a taxa de reepitelização e estimulou a reestruturação das fibras colágenas da matriz extracelular. Ainda evidenciando o benefício desta terapia sobre os tecidos moles, Cruz et al. [67] reportaram que a aPDT reduziu significativamente a severidade da mucosite oral induzida por 5-fluorouracil.

A ação do zoledronato sobre a vasculatura e seus principais moduladores locais também é algo que poderia afetar substancialmente o processo de reparo tanto dos tecidos moles quanto dos tecidos duros do sítio de extração dental. HIF-1 é um fator de transcrição sensível ao oxigênio. Na presença de O_2 , HIF-1 α é hidrolisado e degradado. Todavia, durante hipóxia tecidual, HIF-1 α é estabilizado, forma um complexo com HIF-1 β , e é translocado para o núcleo onde induz a transcrição de genes relacionados com neoangiogênese e neovasculogênese, em especial, VEGF e angiopoietina-1 [68]. No presente estudo constatamos que a quantidade de células HIF-1 α -positivas no tecido conjuntivo e no tecido ósseo foi menor em ZOL, além disso, a quantidade de células VEGF-positivas e o número de vasos sanguíneos CD31-positivos também se mostrou menor neste grupo. Tais resultados podem ser interpretados conjuntamente, ou seja, supostamente o zoledronato interfere com a responsividade de HIF-1 α à hipóxia tecidual, fazendo com que a imunomarcagem deste fator de transcrição se apresente baixa em ZOL, provavelmente sendo isso responsável pela baixa imunomarcagem de VEGF, um dos principais fatores

relacionados com a neoangiogênese e neovasculogênese, o que explicaria o menor número de vasos sanguíneos CD31-positivos.

Ziebart [69] reportaram que o zoledronato reduz a capacidade de migração e de diferenciação de células progenitoras endoteliais. Outros estudos demonstraram que o zoledronato afeta negativamente a viabilidade [57,70], proliferação [71], migração [57,71] e formação de tubo [71] de células endoteliais, além disso, aumenta o índice de apoptose em tais células [57,70]. Santini et al. [72] demonstraram que ocorre redução na quantidade de precursores de células endoteliais e células endoteliais no sangue periférico de pacientes sob tratamento com dose oncológica de zoledronato. Em estudo clínico Wehrhan et al. [73] observaram que em amostras da mucosa bucal de pacientes com OMN-M e pacientes controle ocorreu redução na angiogênese, no entanto, a vasculogênese permaneceu inalterada. Em outro estudo clínico, Mozzati et al. [74] reportaram que em amostras da mucosa bucal de pacientes tratados com zoledronato e que desenvolveram ONM-M a expressão de VEGF, hidroximetilglutaril coenzima A redutase (um marcador de proliferação celular) e IL-6 foi menor do que em pacientes tratados com esta droga e que não desenvolveram a doença. Tais dados clínicos estão de acordo com nossos resultados e o presente estudo inclusive explica alguns destes achados clínicos.

Em nosso estudo tanto a LLLT como a aPDT exerceram um efeito positivo sobre os principais reguladores da angiogênese e vasculatura no tecido conjuntivo da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental das ratas tratadas com zoledronato, no entanto, no tecido ósseo apenas foi notado um efeito significativo nos sítios onde se empregou a aPDT. Walter et al. [61] demonstraram que células endoteliais tratadas com BPs e submetidas à LLLT apresentaram maior viabilidade celular, o que está de acordo com o presente estudo, no entanto, constatamos que tais efeitos foram pronunciados apenas nos tecidos mais superficiais, supostamente por conta do poder de penetração limitado do laser vermelho visível [75]. No que se refere ao notado efeito da aPDT sobre os reguladores da angiogênese e vasculatura, inclusive nos tecidos mais profundamente situados, supomos que, pelo menos em parte, o mecanismo de ação desta terapia tenha sido o diferencial. O fotosensibilizador ao ser depositado sobre a ferida cirúrgica é capaz de atingir em profundidade o sítio de extração dental, por sua vez, ao se irradiar a área, a luz atinge os diversos níveis deste sítio de modo diferenciado. Tem sido proposto que baixa dose de terapia fotodinâmica promove modulação nos níveis de ERO, as quais quando sofrem pequenas elevações

desencadeiam efeitos benéficos ao nível celular e tecidual [76], inclusive inúmeros eventos são, em parte, ERO-dependentes [77], dentre eles a neoangiogênese [78]. Em sendo assim, se pode pressupor que na porção mais profunda do alvéolo dental a modulação dos níveis de ERO desencadeada pela aPDT tenham contribuído para a maior imunomarcagem de HIF-1 α , VEGF e vasos sanguíneos CD31-positivos.

Com relação à osteoblastogênese e os principais reguladores da atividade dos osteoblastos durante o processo de reparo alveolar, nosso estudo demonstrou maior quantidade de células RUNX-2-positivas no sítio de extração dental no grupo ZOL aos 28 dias pós-exodontia, todavia, verificou-se menor quantidade de tecido ósseo neoformado, menor quantidade de células BMP2/4-positivas e células OCN-positivas. Tais achados, interpretados conjuntamente, mostram que o zoledronato compromete o processo de reparo do tecido ósseo alveolar. BMP2/4 é um dos principais fatores de crescimento que induzem a diferenciação de osteoblastos [79], processo este comprometido pelo tratamento com zoledronato, o que está de acordo com Huang et al. [80]. RUNX-2 é um fator de transcrição que denota a diferenciação dos osteoblastos [81]. Em ZOL a quantidade de células RUNX-2-positivas se mostrou maior que nos demais grupos experimentais, no entanto, isto não pode ser interpretado como um efeito positivo do zoledronato sobre o tecido ósseo alveolar. Estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (dados não mostrados) demonstrou que em ratas tratadas com veículo a quantidade de células RUNX-2 aumenta de forma gradativa aos 7 e 14 dias pós exodontia e diminuiu bruscamente aos 28 dias pós-operatórios, tendo em vista que nesta fase do processo de reparo alveolar predominam os osteoblastos maduros. O tratamento com zoledronato altera essa dinâmica de expressão de RUNX-2, ou seja, aos 7, 14 e 28 dias pós exodontia, a quantidade de células RUNX-2-positivas não sofreu alteração quantitativa, se mostrando muito menor em relação ao grupo tratado com o veículo aos 7 e 14 dias pós-operatórios, que é o período de diferenciação osteoblástica. Todavia, com a severa redução de células RUNX-2-positivas que ocorreu neste grupo aos 28 dias pós exodontia, a quantidade destas células no grupo tratado com zoledronato se mostrou significativamente maior. Tais dados estão de acordo com Huang et al. [80], que reportaram uma redução dose-dependente na expressão gênica de RUNX-2 em osteoblastos tratados com zoledronato. Além disso, a área de tecido ósseo neoformado e a quantidade de células BMP2/4-positivas e OCN-positivas foi menor em ZOL, indicando um severo comprometimento da neoformação óssea.

Huang et al. [80] ainda reportaram que a expressão gênica de colágeno tipo I, o principal elemento da matriz óssea orgânica, e de fosfatase alcalina e OCN, essenciais para o processo de biomineralização da matriz, é drasticamente reduzida em osteoblastos tratados com zoledronato. Tais autores reportaram que em altas concentrações o zoledronato exerce um potente efeito citotóxico sobre os osteoblastos, e em baixas concentrações compromete o processo de diferenciação destas células via redução do nível de BMP-2, o que corrobora com nossos achados. Efeitos negativos do zoledronato sobre os osteoblastos foram reportados por vários outros autores [82-86], todavia, outros estudos relatam que o zoledronato exerce efeito positivo sobre os osteoblastos [87-90]. As diferenças tão contraditórias existentes entre a ação do zoledronato sobre os osteoblastos podem ser resultado da quantidade da droga a que tais células estão sendo expostas, ou seja, até determinada concentração os efeitos podem ser positivos, mas ultrapassado tal limite, e quanto maior a concentração, observam-se os efeitos negativos, incluindo a ação citotóxica.

Os efeitos negativos do zoledronato sobre a osteoblastogênese e sobre os osteoblastos foram parcialmente revertidos pela LLLT. Tal terapia promoveu melhora no processo de reparação do tecido ósseo no sítio de extração dental. O aspecto histológico do tecido ósseo neoformado e do tecido ósseo pré-existente nas adjacências do alvéolo dental, a maior ATO e a menor quantidade de células RUNX-2-positivas foram os parâmetros que melhoraram quando comparados com aqueles apresentados por ZOL. Estudos mostraram que a LLLT exerceu efeito bioestimulatório sobre linhagens de osteoblastos tratados com zoledronato [61,91]. Basso et al. [92] constataram que a LLLT apresentou um efeito limitado sobre osteoblastos tratados com zoledronato, exercendo efeito positivo sobre expressão gênica do colágeno tipo I, mas sem efeito sobre viabilidade celular, produção de proteínas totais, atividade e expressão gênica de fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização. Tais estudos estão de acordo com nossos achados. Mergoni et al. [93] mostraram que a LLLT não alterou a expressão de osteopontina e aumentou a expressão de OCN no sítio de extração dental de ratos tratados com zoledronato, todavia, no presente estudo, embora a ATO tenha se mostrado maior no grupo tratado com LLLT, a quantidade de células OCN-positivas não se mostrou significativamente maior. Em um estudo clínico Vescovi et al. [94] reportaram sucesso na associação de antibioticoterapia (pré e pós-operatória) e múltiplas sessões de LLLT após exodontia

em pacientes que previamente haviam desenvolvido ONM-M. O presente estudo explica o modo como a LLLT exerceu sua função durante tratamento com zoledronato, fundamentando o sucesso deste estudo clínico. Em nosso estudo não se empregou antimicrobiano, pois nosso intuito foi analisar o efeito genuíno das duas modalidades de laserterapia. A LLLT, diferente da aPDT, não tem ação antimicrobiana, o que nos faz acreditar que, como constatado no estudo de Vescovi et al. [94], a associação de antibioticoterapia e LLLT potencialize o processo de reparação tecidual, todavia, estudos se fazem necessários, inclusive sobre qual o antibiótico mais efetivo nesta condição.

Não há estudos que empregaram aPDT como estratégia terapêutica preventiva pós exodontia durante tratamento com BPs, no entanto, o emprego desta terapia em outras condições de caráter infeccioso / inflamatório que envolvem o processo de reparo do tecido ósseo alveolar tem gerado resultado muito promissores. Esta modalidade de tratamento foi empregada com sucesso para promover a reparação tecidual de feridas de extração dental infectadas [95]. Além disso, a aPDT tem se mostrado uma terapia efetiva quando empregada como adjuvante à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite experimental, uma outra condição infecciosa / inflamatória [96,97]. Os efeitos positivos da aPDT no processo de reparo periodontal são reportados inclusive em situações onde a resposta do hospedeiro apresenta algum tipo de comprometimento, como é o caso do diabetes [98], da severa imunossupressão [99], da ação da nicotina [100,101] ou da depleção de hormônios sexuais em fêmeas [102]. Longo [105] reportaram ainda que a aPDT empregada como monoterapia ou como terapia adjuvante à raspagem e alisamento radicular exerceu efeitos positivos sobre a reparação periodontal em ratos com periodontite experimental e submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil.

Embora o presente estudo não tenha sido delineado de modo a permitir uma avaliação microbiológica apurada, vale a pena ressaltar que enquanto o grupo ZOL apresentou áreas de osso necrótico (sequestro ósseo) envoltas por colônias de bactérias, isso não foi constatado no grupo ZOL/aPDT, o que sugere uma ação antimicrobiana. Tendo em vista que em amostras de ONM-M há uma alta prevalência de bactérias, especialmente do gênero *Actinomyces*, alguns autores têm correlacionado esta condição com tais microrganismos [104]. Hafner et al. [105] reportaram em um estudo *in vitro* que a aPDT promoveu uma redução quatro vezes maior na carga bacteriana de *Actinomyces naeslundii* isolados de pacientes com

ONM-M quando comparada com a clorexidina e com a polihexanida. Theodoro et al. [39] também mostraram a aPDT é um tratamento efetivo para reduzir a carga microbiana de alvéolos dentais pós-extração de molares com periodontite experimental. Fimple et al. [106] demonstraram que a aPDT foi capaz de promover uma redução de mais de 80% nas unidades formadoras de colônias bacterianas, inclusive de *Actinomyces*. Os dados do presente estudo suportam que a aPDT teve uma ação antimicrobiana no sítio de extração dental de ratas tratadas com zoledronato, todavia, estudos microbiológicos são necessários para complementar e tornar tais achados mais consistentes.

O zoledronato, como todo BP nitrogenado, altera o metabolismo ósseo atuando pela inibição da via do mevalonato nos osteoclastos [107]. A interrupção de tal via metabólica provoca alterações na dinâmica do citoesqueleto destas células, impossibilitando a formação da zona clara e da zona pregueada, as quais são essenciais para a interação da célula com a matriz óssea e para a formação do microambiente propício para o início da atividade reabsortiva [107,108]. Além disso, promove inibição da osteoclastogênese e indução de apoptose prematura em osteoclastos ativos [3]. No presente estudo, mesmo tendo apenas o alvéolo dental em processo de reparação como o foco de atenção, os efeitos do zoledronato ficaram evidentes. Nos grupos tratados com zoledronato constatou-se menor quantidade de células TRAP-positivas em comparação com os grupos tratados com o veículo e, além disso, esta e a análise histopatológica revelaram ainda que os osteoclastos presentes mostravam característica de inatividade, ou seja, grandes células arredondadas, hipernucleadas, desprovidas de polarização e distantes da matriz óssea, como reportado por Kuroshima et al. [109]. A observação de tais características nos fez analisar ainda a quantidade de osteoclastos multinucleados acoplados à matriz óssea, um indício de atividade reabsortiva da célula. Em tal análise constatou-se uma quantidade extremamente reduzida de osteoclastos acoplados à matriz óssea nos grupos tratados com o zoledronato. Ambos os dados demonstram a efetividade da terapia anti-reabsortiva empregada neste estudo.

A osteoclastogênese e atividade osteoclástica têm como um dos principais mecanismos de regulação local o sistema RANK/RANKL/OPG. RANK é expresso em pré-osteoclastos e osteoclastos. Quando é ativado por RANKL, promove osteoclastogênese, estimula a atividade de osteoclastos ativos e inibe a apoptose de osteoclastos maduros. Todavia, todos estes eventos são inibidos quando OPG se liga

à RANKL, impedindo sua interação com RANK [110]. Neste estudo, os grupos tratados com zoledronato apresentaram menor quantidade de células RANKL-positivas, o que corrobora com estudos anteriores [111-113]. No presente estudo o zoledronato aumentou a quantidade de células OPG-positivas no sítio de extração dental, o que está de acordo com estudos prévios. Em tais estudos constatou-se significativo aumento no nível de OPG no sítio de extração dental [113,114]. Çankaya et al. [111] reportaram que o nível de OPG na mandíbula mostrou apenas uma tendência ao aumento após tratamento com zoledronato. Yang et al. [113] reportaram que durante tratamento com zoledronato ocorre uma drástica redução na razão RANKL/OPG no sítio de extração dental, o que determina o severo bloqueio da reabsorção óssea. Supostamente tal balanço também tenha sido reduzido no presente estudo. Kim et al. [115] mostraram severa redução tanto no nível sérico de TRAP 5b quanto na razão RANKL/OPG em um modelo experimental de ONM-M, colocando-os como potenciais biomarcadores para o monitoramento do risco de desencadeamento da doença.

Nas ratas tratadas com zoledronato, tanto a LLLT quanto a aPDT não promoveram nenhuma modificação na quantidade de células OPG-positivas, RANKL-positivas e TRAP-positivas no sítio de extração dental, ou seja, os tratamentos locais em nada influenciaram o tratamento sistêmico com zoledronato, o que indica que a potente ação anti-reabsortiva da droga permaneceu inalterada. A supressão da reabsorção óssea é tida como um dos supostos fatores etiopatogênicos da ONM-M, no entanto, nosso estudo mostrou que os efeitos da LLLT e aPDT sobre os tecidos moles e tecidos duros do sítio de extração dental permitiram que ocorresse a reparação da ferida cirúrgica, sem que a supressão da atividade osteoclástica fosse capaz de, por si só, desencadear a ONM-M. Tais achados nos permitem inferir que o emprego da LLLT, e especialmente da aPDT, pós exodontia tem uma ação positiva sobre o processo de reparação tecidual e evita o desencadeamento da ONM-M, inclusive em situações onde outras terapias anti-reabsortivas são empregadas, como é o caso do inibidor de RANKL, Denosumab, cujo uso também está relacionado com as mesmas taxas de desencadeamento de ONM-M [116].

Conclusão



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, conclui-se que o zoledronato compromete significativamente o processo de reparo pós exodontia, via diminuição da capacidade de reparo tanto dos tecidos moles, quanto dos tecidos duros, o que estaria entre os fatores etiopatogênicos da ONM-M. Tanto LLLT quanto aPDT são capazes de melhorar eventos envolvidos com o processo de reparação tecidual pós exodontia, no entanto, a ação desta última é muito mais efetiva. A aPDT minimiza as consequências negativas do zoledronato sobre o complexo buco-maxilo-facial uma vez que é capaz de estimular a capacidade de reparação tecidual e evitar infecção. O uso da aPDT como terapia preventiva pós intervenções odontológicas invasivas durante tratamento com BPs se mostra bastante efetivo, seguro e capaz de evitar o desencadeamento da ONM-M.

Agradecimentos



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio Regular à Pesquisa (Processo FAPESP nº 2013/26779-4) e pela concessão de bolsa de mestrado (Processo FAPESP nº 2014/02199-1).

Tabelas



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

Tabela 1 - Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos durante o processo de reparação pós-extração dental em SAL, ZOL, ZOL/LLLT e ZOL/aPDT aos 28 dias pós-operatórios.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA				
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES			
	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	SAL (n=7)	ZOL (n=7)	ZOL/ LLLT (n=8)	ZOL/ aPDT (n=7)
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL				
(0) ausência de inflamação	100%	-	50%	71%
(1) pequena quantidade de células inflamatórias	-	-	50%	29%
(2) moderada quantidade de células inflamatórias	-	43%	-	-
(3) grande quantidade de células inflamatórias	-	57%	-	-
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO				
(0) ausência de inflamação	100%	-	50%	71%
(1) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo	-	-	50%	29%
(2) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo, sem atingir o tecido ósseo	-	29%	-	-
(3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo	-	71%	-	-
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO EPITELIAL				
(0) tecido epitelial de moderada espessura recobrindo completamente o sítio de extração	57%	-	25%	29%
(1) tecido epitelial de delgada espessura recobrindo completamente o sítio de extração	43%	-	50%	71%
(2) delgada camada de tecido epitelial apenas nas margens da ferida cirúrgica aberta	-	57%	25%	-
(3) ausência de tecido epitelial sobre a ferida cirúrgica aberta	-	43%	-	-
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO				
(0) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas	57%	-	25%	43%
(1) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	43%	-	50%	57%
(2) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	29%	25%	-
(3) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose tecidual	-	71%	-	-
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO				
(0) ausência de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo mais da metade do alvéolo dental	100%	-	25%	71%
(1) ausência de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo menos da metade do alvéolo dental	-	-	50%	29%
(2) presença de poucas áreas de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo menos de um terço do alvéolo dental	-	29%	25%	-
(3) presença de muitas áreas de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo menos de um terço do alvéolo dental	-	71%	-	-
PADRÃO DE CONTAMINAÇÃO DO SÍTIO DE EXTRAÇÃO DENTAL				
(0) presença de bactérias difusamente distribuídas no sítio de extração, condizente com um quadro de normalidade	100%	-	37%	86%
(1) presença de grandes colônias de bactérias nos tecidos moles sobrejacentes ao alvéolo dental	-	-	50%	14%
(2) presença de grandes colônias de bactérias na superfície do osso alveolar no interior do alvéolo dental	-	-	13%	-
(3) presença de grandes colônias de bactérias envolvendo osso necrosado e/ou no interior de espaços medulares no interior e adjacências do alvéolo dental	-	100%	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor

Figuras



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

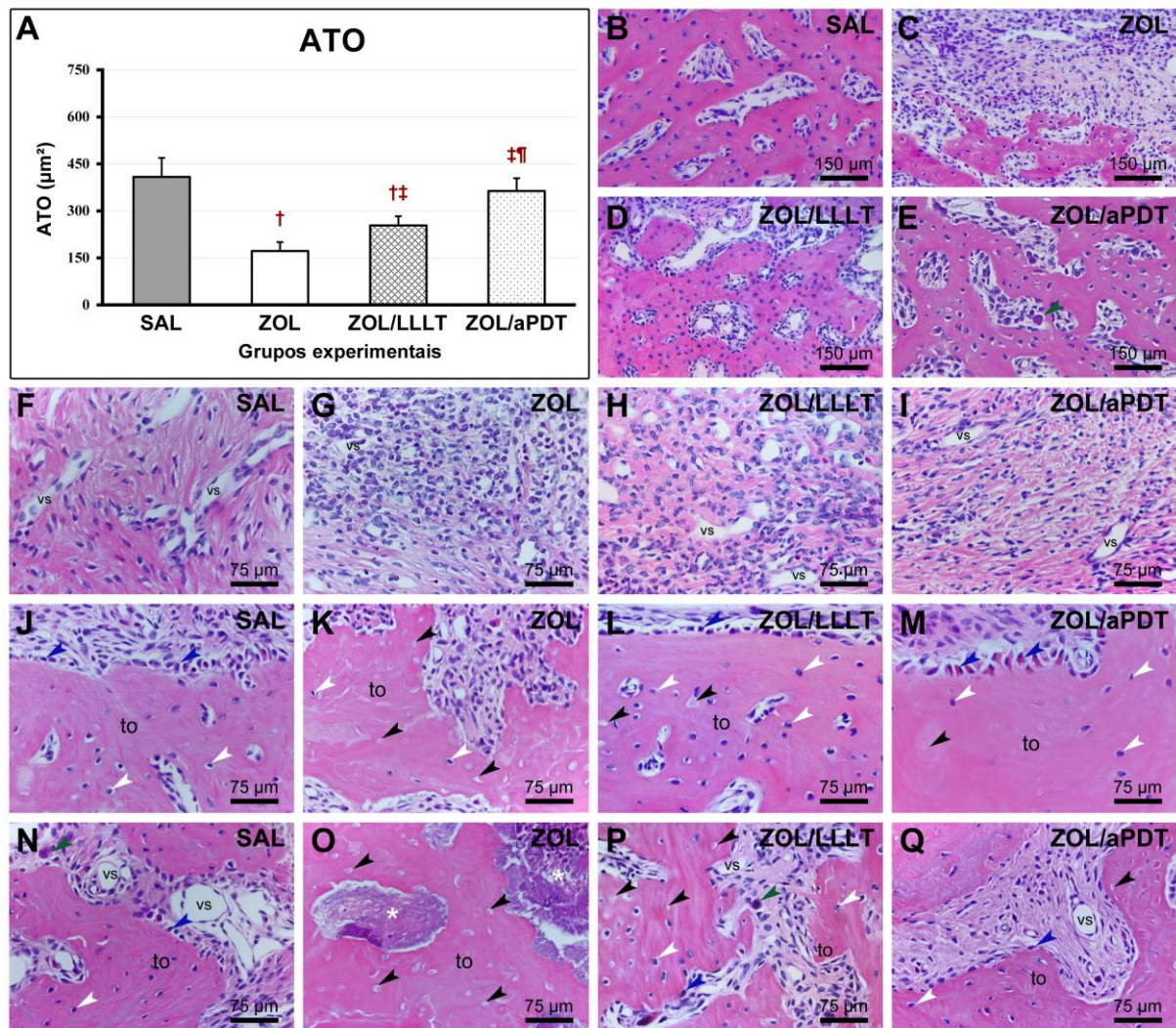


Figura 1: Aspectos histológicos quantitativos e qualitativos do sítio de extração dental e adjacências. A: Gráfico apresentando a área de tecido ósseo neoformado (ATO) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós-operatórios. B-J: Fotomicrografias evidenciando a ATO entre o terço apical e médio do alvéolo dental anteriormente ocupado pela raiz mesial do primeiro molar inferior nos grupos SAL (B), ZOL (C), ZOL/LLLT (D) e ZOL/aPDT (E). F-Q: Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico do tecido conjuntivo e tecido ósseo no sítio de extração dental e adjacências nos grupos SAL (F, J, N), ZOL (G, K, O), ZOL/LLLT (H, L, P) e ZOL/aPDT (I, M, Q). Em ZOL observar: persistência de inflamação no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental (G); presença frequente de área ocupada por osso não vital (K); grandes sequestros ósseos nas adjacências do sítio de extração (O); pequena quantidade de tecido ósseo neoformado no alvéolo dental (C) e; Em SAL e ZOL/aPDT as características histológicas se mostraram similares: ausência de inflamação no tecido conjuntivo sobrejacente ao sítio de extração dental (F, I); ausência de grandes áreas de osso não vital (J, M); presença de pequena quantidade de lacunas vazias (N, Q) e; nenhum sequestro ósseo nas adjacências do sítio de extração. Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo; vs, vasos sanguíneos; setas brancas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias; setas azuis, osteoblastos; setas verdes, osteoclastos; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL; †‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL/LLLT. Coloração: HE. Aumento original: 400x (B-E); 200x (F-Q). Barras de escala: 150 μm (B-E); 75 μm (F-Q).

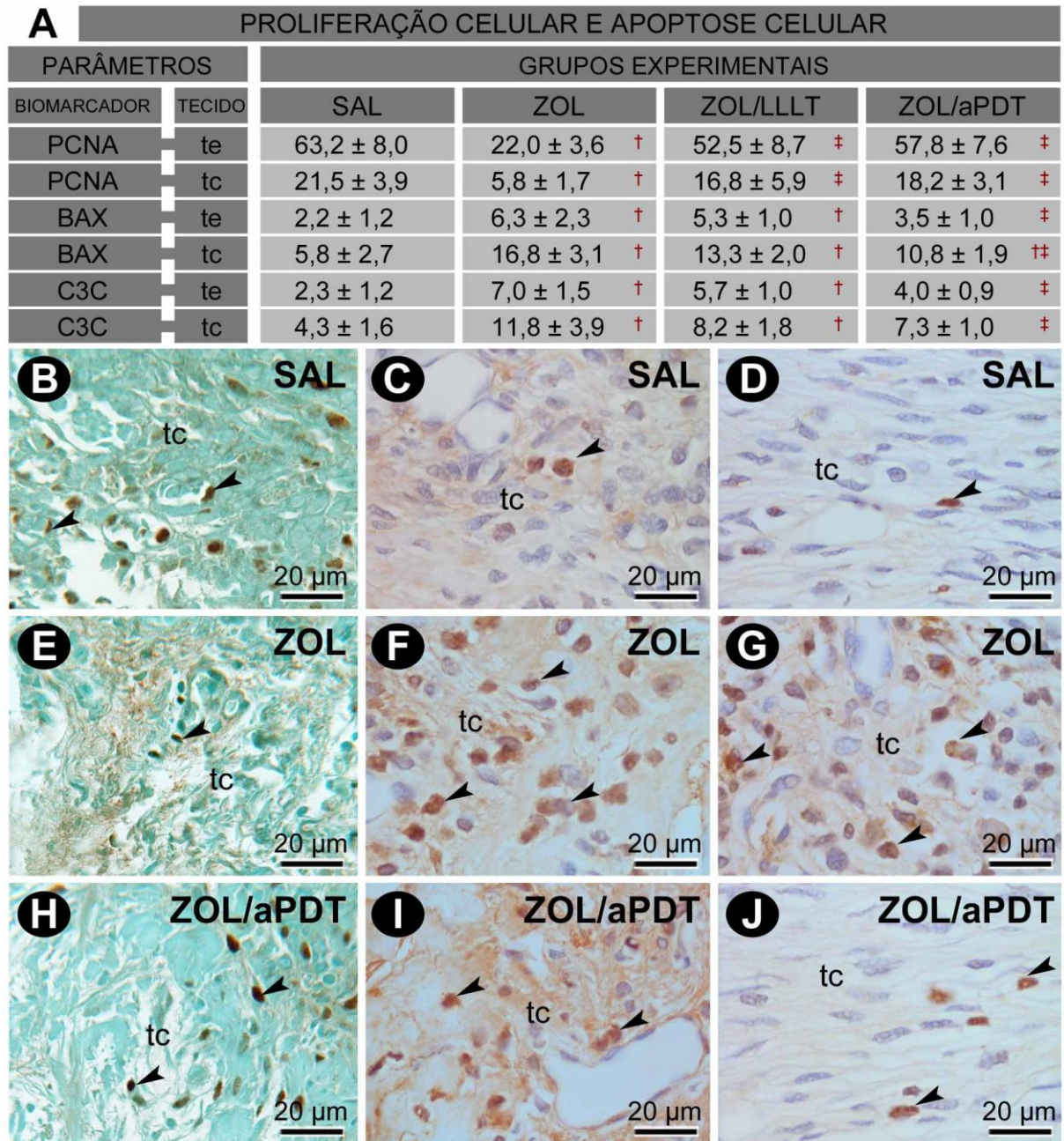


Figura 2: Padrão de imunomarcação para biomarcadores de proliferação celular (PCNA) e apoptose celular (BAX e C3C). A: Tabela apresentando a quantidade de células PCNA-positivas, BAX-positivas e C3C-positivas no tecido epitelial (te) e tecido conjuntivo (tc) da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós-operatórios. B-J: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcação para PCNA (B, E, H), BAX (C, F, I) e C3C (D, G, J) em SAL (B-D), ZOL (E-G) e ZOL/aPDT (H-J). Abreviações e símbolos: te, tecido epitelial; tc, tecido conjuntivo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL. Contra-coloração: *Fast green* (B, E, H); *Hematoxilina de Harris* (C, D, F, G, I, J). Barras de escala: 20 μm.

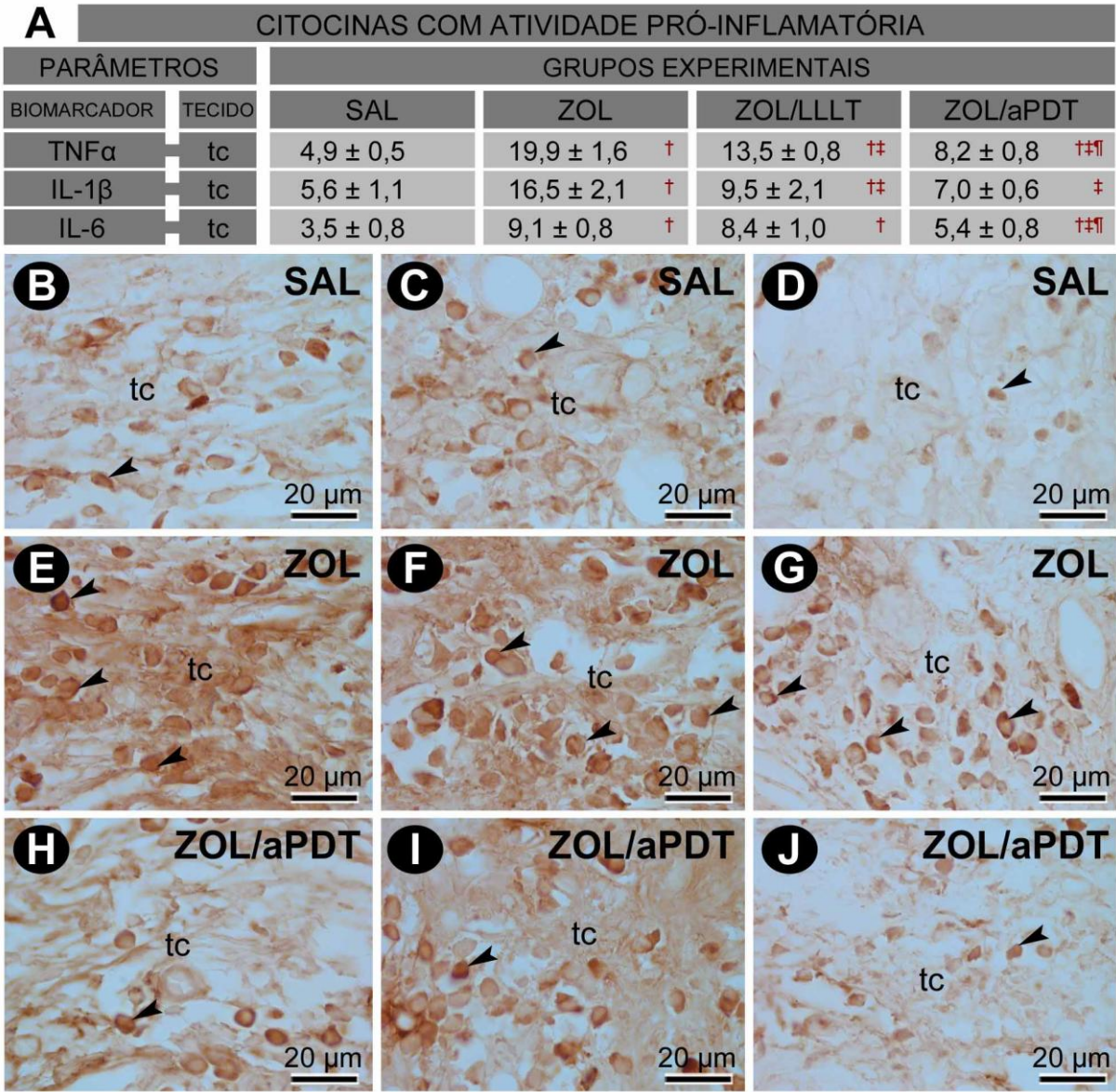


Figura 3: Padrão de imunomarcagem para as principais citocinas com atividade pró-inflamatória (TNF α , IL-1 β e IL-6). A: Tabela apresentando a densidade óptica de imunomarcagem para TNF α , IL-1 β e IL-6 no tecido conjuntivo (tc) da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós-operatórios. B-G: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcagem para TNF α (B, E, H), IL-1 β (C, F, I) e IL-6 (D, G, J) em SAL (B-D), ZOL (E-G) e ZOL/aPDT (H-J). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL; ††, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL/LLLT. Barras de escala: 20 μ m.

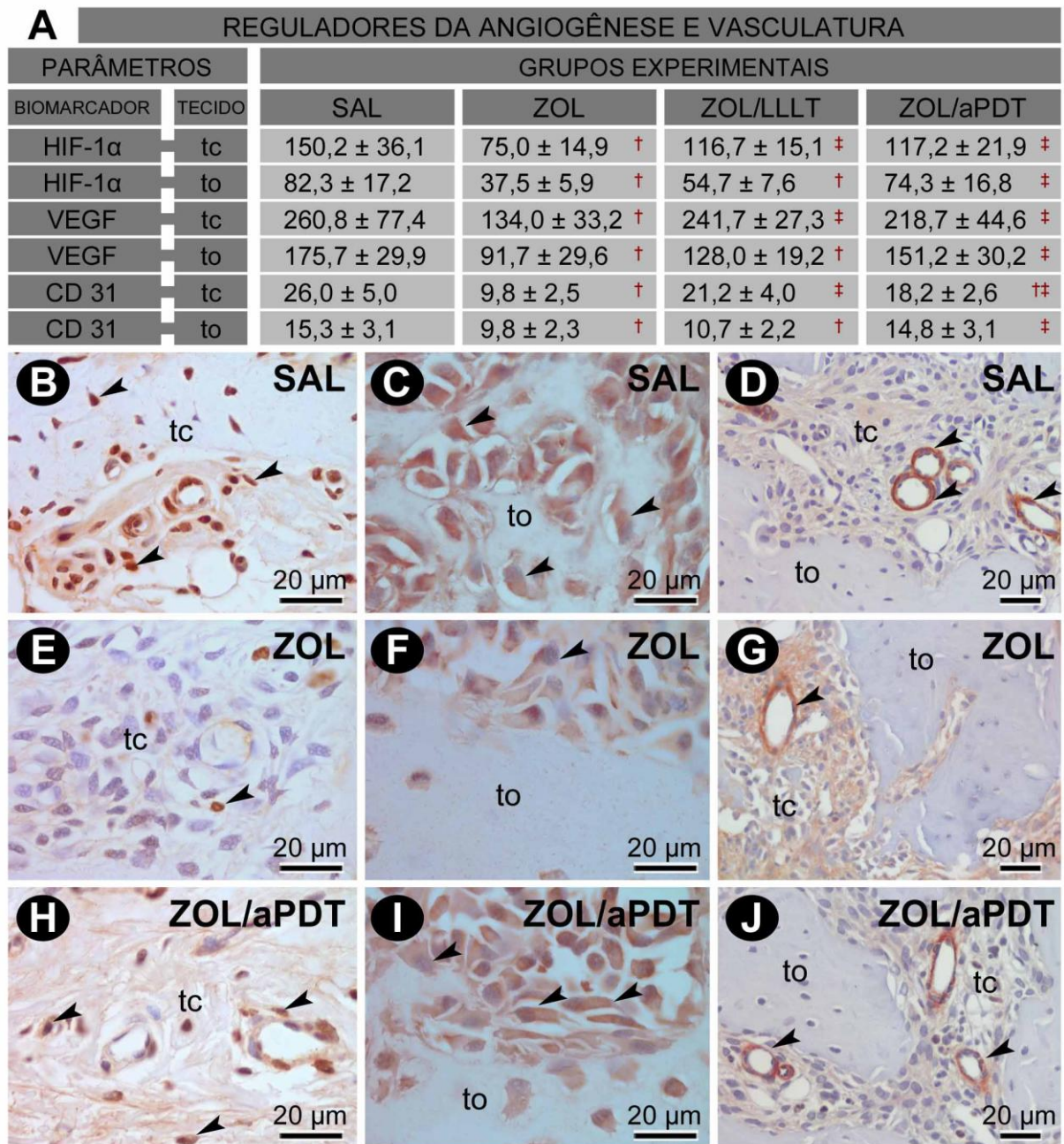


Figura 4: Padrão de imunomarcacão para biomarcadores da angiogênese (HIF-1 α e VEGF) e vasculatura (CD31). A: Tabela apresentando a quantidade de células HIF-1 α -positivas, VEGF-positivas e vasos sanguíneos CD31-positivos no tecido conjuntivo (tc) e tecido ósseo (to) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós-operatórios. B-G: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para HIF-1 α (B, E, H), VEGF (C, F, I) e CD31 (D, G, J) em SAL (B-D), ZOL (E-G) e ZOL/aPDT (H-J). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; to, tecido ósseo; setas, células imunomarcadas; $\dagger$, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL; $\ddagger$, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris* (B-M). Barras de escala: 20 μ m.

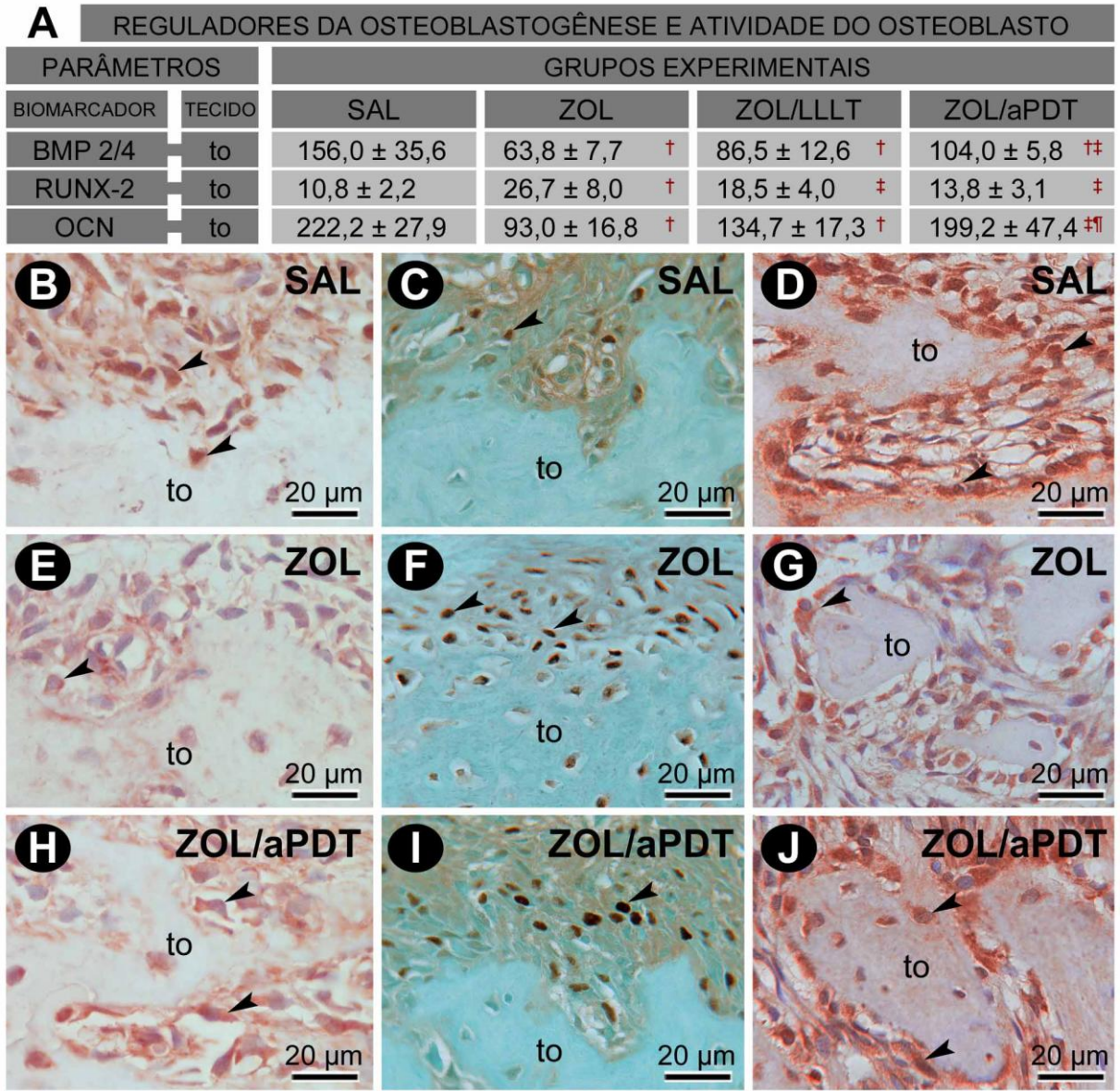


Figura 5: Padrão de imunomarcção para biomarcadores da osteoblastogênese e atividade dos osteoblastos (BMP2/4, RUNX-2 e OCN). A: Tabela apresentando a quantidade de células BMP2/4-positivas, RUNX-2-positivas e OCN-positivas no tecido ósseo (to) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós-operatórios. B-J: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para BMP2/4 (B, E, H), RUNX-2 (C, F, I) e OCN (D, G, J) em SAL (B-D), ZOL (E-G) e ZOL/aPDT (H-J). Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL/LLLT. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris* (B, D, E, G, H, J); *Fast green* (C, F, I). Barras de escala: 20 μm.

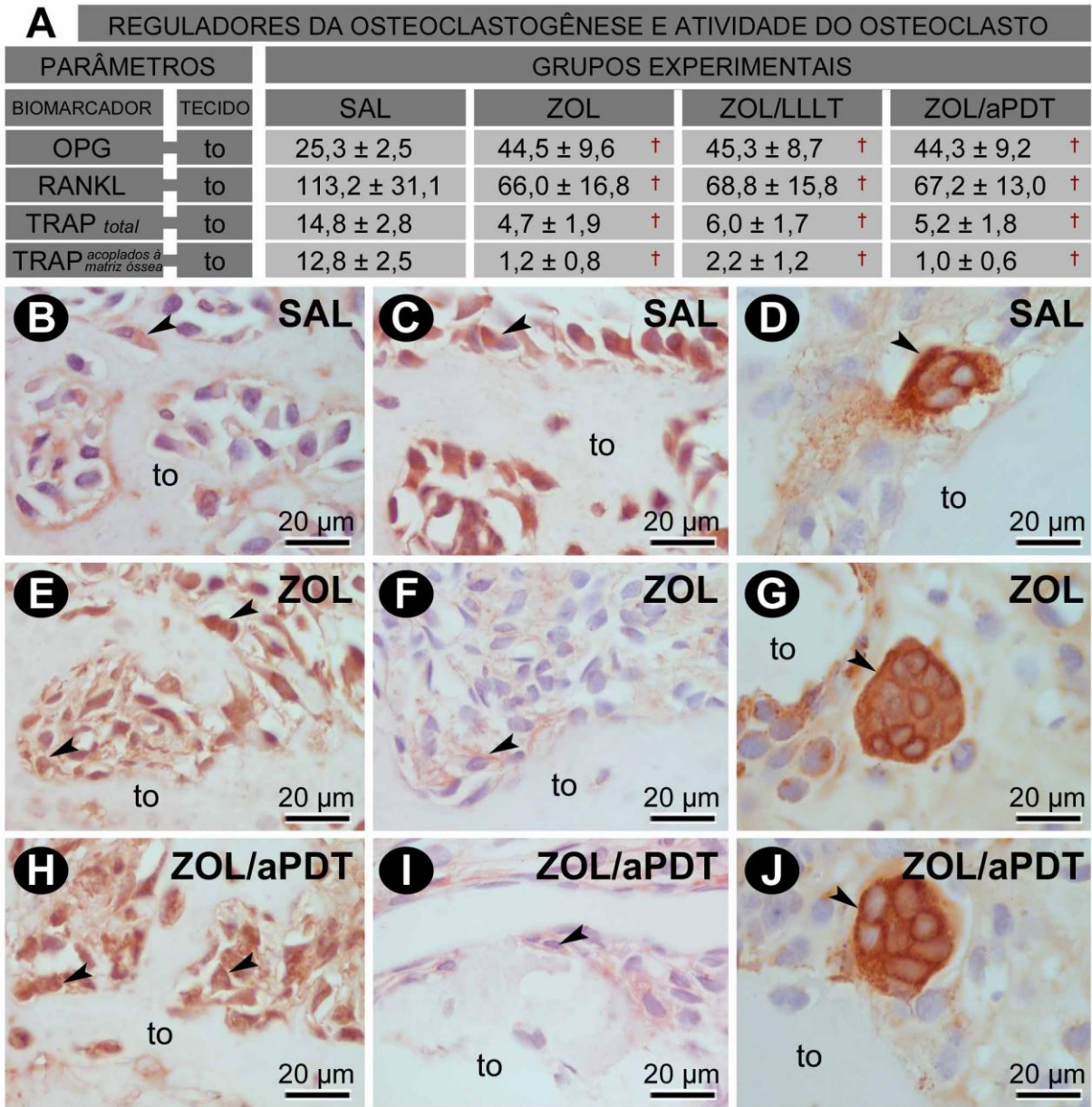


Figura 6: Padrão de imunomarcção para biomarcadores da osteoclastogênese/ atividade dos osteoclastos (OPG, RANKL) e recrutamento de osteoclastos (TRAP). A: Tabela apresentando a quantidade de células OPG-positivas, RANKL-positivas e TRAP-positivas no tecido ósseo (to) no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós-operatórios. B-J: Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OPG (B, E, H), RANKL (C, F, I) e TRAP (D, G, J) em SAL (B-D), ZOL (E-G) e ZOL/aPDT (H-J). Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo; setas, células imunomarcadas; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Barras de escala: 20 μm.

Referências



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

REFERÊNCIAS

1. Drake MT, Clarke BL, Khosla S (2008) Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 83:1032-45.
2. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Monkkonen J (2011) Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 49(1):34-41.
3. Abe K, Yoshimura Y, Deyama Y, Kikuri T, Hasegawa T, Tei K, Shinoda H, Suzuki K, Kitagawa Y (2012) Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* 29(6):1007-1015.
4. Ebertino FH, Hogan AM, Sun S, Tsoumpra MK, Duan X, Triffitt JT, Kwaasi AA, Dunford JE, Barnett BL, Oppermann U, Lundy MW, Boyde A, Kashemirov BA, McKenna CE, Russell RG (2011) The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone* 49(1):20-33.
5. Ory S, Brazier H, Pawlak G, Blangy A (2008) Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *Eur J Cell Biol* 87(8-9):469-477.
6. Coxon FP, Rogers MJ (2003) The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 72(1):80-84.
7. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F (2014) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws - 2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg* 72:2381-2
8. Gomez Font R, Martinez GML, Olmos MJM (2008) Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments. Update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13(5):E318-324.
9. Marx RE (2003) Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61:1115-7.
10. Migliorati CA (2003) Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J. Clin Oncol* 21(22):4253-4.
11. Wang J, Goodger NM, Pogrel MA (2003) Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. *J Oral Maxillofac Surg* 61:1104-110.
12. Hanasono MM, Militsakh ON, Richmon JD, Rosenthal EL, Wax MK (2013) Mandibulectomy and free flap reconstruction for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 139:1135-42.
13. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B (2009) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 67:2-12.

14. Weitzman R, Sauter N, Eriksen EF et al (2007) Critical review: updated recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in cancer patients. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007, 62:148-52.
15. Badel T, Pavicin IS, Carek AJ, Rosin-Grget K, Grbesa D (2013) Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate. *Coll Antropol* 37:645-651.
16. Migliorati CA, Epstein JB, Abt E, Berenson JR (2011) Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates in cancer: a narrative review. *Nat Rev Endocrinol* 7:34-42.
17. Shannon J, Modelevsky S, Grippo AA (2011) Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *J Am Geriatr Soc* 59:2350-2355.
18. Allen MR, Burr DB (2009) The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg* 67:61-70.
19. Siddiqi A, Payne AG, Zafar S (2009) Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a medical enigma? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108:e1-8.
20. Lam DK, Sandor GK, Holmes HI, Evans AW, Clokie CM (2007) A review of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws and its management. *J Can Dent Assoc* 73:417-22.
21. Hoefert S, Eufinger H (2011) Relevance of a prolonged preoperative antibiotic regime in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Maxillofac Surg* 69:362-80.
22. Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F, Martinez-Canovas A, Molina-Minano F, Gomez-Garcia F, Vicente-Ortega V (2011) Perioperative antibiotic regimen in rats treated with pamidronate plus dexamethasone and subjected to dental extraction: a study of the changes in the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 69(10):2488-2493.
23. Little JW, Falace DA, Miller CS, Rhodus NL (2008) Antibiotic prophylaxis in dentistry: an update. *Gen Dent* 56(1):20-28.
24. Page CP, Bohnen JM, Fletcher JR, Mcmanus AT, Solomkin JS, Wittmann DH (1993) Antimicrobial prophylaxis for surgical wounds. Guidelines for clinical care. *Arch Surg* 128(1):79-88.
25. Kunin CM, Johansen KS, Worning AM, Daschner FD (1990) Report of a symposium on use and abuse of antibiotics worldwide. *Ver Infect Dis* 12(1):12-19.
26. Noda M, Aoki A, Mizutani K, Lin T, Komaki M, Shibata S, Izumi Y (2016) High-frequency pulsed low-level diode laser therapy accelerates wound healing of tooth extraction socket: An in vivo study. *Lasers Surg Med*. 2016 Jul 25. doi: 10.1002/lsm.22560. [Epub ahead of print].
27. Park JB, Ahn SJ, Kang YG, Kim EC, Heo JS, Kang KL (2015) Effects of increased

low-level diode laser irradiation time on extraction socket healing in rats. *Lasers Med Sci* 30(2):719-26.

28. Korany NS, Mehanni SS, Hakam HM, El-Maghraby EM (2012) Evaluation of socket healing in irradiated rats after diode laser exposure (histological and morphometric studies). *Arch Oral Biol* 57(7):884-91.

29. Park JJ, Kang KL (2012) Effect of 980-nm GaAlAs diode laser irradiation on healing of extraction sockets in streptozotocin-induced diabetic rats: a pilot study. *Lasers Med Sci* 27(1):223-30.

30. Fukuoka H, Daigo Y, Enoki N, Taniguchi K, Sato H (2011) Influence of carbon dioxide laser irradiation on the healing process of extraction sockets. *Acta Odontol Scand* 69(1):33-40.

31. Aras MH, Güngörmüş M (2009) The effect of low-level laser therapy on trismus and facial swelling following surgical extraction of a lower third molar. *Photomed Laser Surg* 27(1):21-4.

32. Takeda Y (1988) Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 17(6):388-391.

33. Eroglu CN, Keskin Tunc S (2016) Effectiveness of Single Session of Low-Level Laser Therapy with a 940 nm Wavelength Diode Laser on Pain, Swelling, and Trismus After Impacted Third Molar Surgery. *Photomed Laser Surg*. 2016 Jul 15. [Epub ahead of print]

34. Ferrante M, Petrini M, Trentini P, Perfetti G, Spoto G (2013) Effect of low-level laser therapy after extraction of impacted lower third molars. *Lasers Med Sci* 28(3):845-9.

35. Batinjan G, Filipović Zore I, RupiĆ I, Bago Jurić I, Zore Z, Gabrić Pandurić D (2013) Assessing Health-Related Quality of Life with Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) and Low Level Laser Therapy (LLLT) after Third Molar Removal. *J Lasers Med Sci* 4(3):120-6.

36. Hamblin MR (2016) Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol* 12;33:67-73.

37. Qiao J, Wang S, Wen Y, Jia H (2014) Photodynamic effects on human periodontal-related cells in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 11(3):290-9.

38. Stein E, Koehn J, Sutter W, Schmidl C, Lezaic V, Wendtlandt G, Watzinger F, Turhani D (2009) Phenothiazine chloride and soft laser light have a biostimulatory effect on human osteoblastic cells. *Photomed Laser Surg* 27(1):71-7

39. Theodoro LH, Pires JR, Fernandes LA, Gualberto Júnior EC, Longo M, De Almeida JM Garcia VG (2015) Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontally infected tooth sockets in rats. *Lasers Med Sci* 30(3):677-83.

40. Batinjan G, Zore Z, Čelebić A, Papić M, Gabrić Pandurić D, Filipović Zore I (2014)

Thermographic monitoring of wound healing and oral health-related quality of life in patients treated with laser (aPDT) after impacted mandibular third molar removal. *Int J Oral Maxillofac Surg* 43(12):1503-8.

41. Neugebauer J, Jozsa M, Kübler A (2004) Antimicrobial photodynamic therapy for prevention of alveolar osteitis and post-extraction pain. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 8(6):350-5.

42. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Dose Calculator: Conversion Chemotherapy of Human to Animals. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov>>.

43. Silva PG, Ferreira Junior AE, Teófilo CR, Barbosa MC, Lima Júnior RC, Sousa F B, Mota MR, Ribeiro RA, Alves AP (2015) Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate related osteonecrosis. *Arch Oral Biol* 60(9):1237-45.

44. Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, Theodoro LH (2014) Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 49(5):584-94.

45. Saito T, Izumi K, Shiomi A, Uenoyama A, Ohnuki H, Kato H (2014) Zoledronic acid impairs re-epithelialization through down-regulation of integrin α v β 6 and transforming growth factor β signalling in a three-dimensional in vitro wound healing model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 43:373-80.

46. Donetti E, Gualerzi A, Sardella A, Lodi G, Carrassi A, Sforza C (2014) Alendronate impairs epithelial adhesion, differentiation and proliferation in human oral mucosa. *Oral Dis* 20:466-72.

47. Ohnuki H, Izumi K, Terada M, Saito T, Kato H, Suzuki A, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Takagi R, Maeda T (2012) Zoledronic acid induces S-phase arrest via a DNA damage response in normal human oral keratinocytes. *Arch Oral Biol* 57:906-17.

48. Saracino S, Canuto RA, Maggiora M, Oraldi M, Scoletta M, Ciuffreda L (2012) Exposing human epithelial cells to zoledronic acid can mediate osteonecrosis of jaw: an in vitro model. *J Oral Pathol Med* 41:788-92.

49. Scheller EL, Baldwin CM, Kuo S, D'silva NJ, Feinberg SE, Krebsbach PH, Edwards PC (2011) Bisphosphonates inhibit expression of p63 by oral keratinocytes. *J Dent Res* 90:894-99.

50. Pabst AM, Ziebart T, Koch FP, Taylor KY, Al-Nawas B, Walter C (2012) The influence of bisphosphonates on viability, migration, and apoptosis of human oral keratinocytes--in vitro study. *Clin Oral Investig* 16:87-93.

51. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF (2009) Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol* 144:667-76.

52. Kim RH, Lee RS, Williams D, Bae S, Woo J, Lieberman M, Oh JE, Dong Q, Shin KH, Kang MK, Park NH (2011) Bisphosphonates induce senescence in normal human oral keratinocytes. *J Dent Res* 90:810-16.
53. Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi C, Hebling J, De Souza Costa CA (2014) Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg* 43:1030-34.
54. Acil Y, Moller B, Niehoff P, Rachko K, Gassling V, Wiltfang J (2012) The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Craniomaxillofac Surg* 40:229-35.
55. Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS (2011) Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Arch Oral Biol* 56:491-98.
56. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF (2009) Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol* 144(5):667-76.
57. Walter C, Pabst A, Ziebart T, Klein M, Al-Nawas B (2011) Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral Dis* 17:194-99.
58. Scheper M, Chaisuparat R, Cullen K, Meiller T (2010) A novel soft-tissue in vitro model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 3:6.
59. Simon MJ, Niehoff P, Kimmig B, Wiltfang J, Acil Y (2010) Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Investig* 14:51-8.
60. Lee JY, Kim IR, Park BS, Kim YD, Chung IK, Song JM, Shin SH (2015) Effect of low-level laser therapy on oral keratinocytes exposed to bisphosphonate. *Lasers Med Sci* 30(2):635-43.
61. Walter C, Pabst AM, Ziebart, T (2015) Effects of a low-level diode laser on oral keratinocytes, oral fibroblasts, endothelial cells and osteoblasts incubated with bisphosphonates: An in vitro study. *Biomed Rep* 3(1):14-18.
62. Sahu K, Sharma M, Bansal H, Dube A, Gupta PK (2013) Topical photodynamic treatment with poly-L-lysine-chlorin p6 conjugate improves wound healing by reducing hyperinflammatory response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds of mice. *Lasers Med Sci* 28(2):465-71.
63. Sahu K, Sharma M, Gupta PK (2015) Modulation of inflammatory response of wounds by antimicrobial photodynamic therapy. *Laser There* 2;24(3):201-8.
64. Sahu K, Sharma M, Dube A, Gupta PK (2015) Topical antimicrobial photodynamic therapy improves angiogenesis in wounds of diabetic mice. *Lasers Med Sci* 30(7):1923-9.

65. Sahu K, Sharma M, Sharma P, Verma Y, Rao KD, Bansal H, Dube A, Gupta PK (2014) Effect of poly-L-lysine-chlorin P6-mediated antimicrobial photodynamic treatment on collagen restoration in bacteria-infected wounds. *Photomed Laser Surg* 32(1):23-9.
66. Garcia VG, de Lima MA, Okamoto T, Milanezi LA, Júnior EC, Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH (2010) Effect of photodynamic therapy on the healing of cutaneous third-degree-burn: histological study in rats. *Lasers Med Sci* 25(2):221-8.
67. Cruz Éde P, Campos L, Pereira Fda S, Magliano GC, Benites BM, Arana-Chavez VE, Ballester RY, Simões A (2015) Clinical, biochemical and histological study of the effect of antimicrobial photodynamic therapy on oral mucositis induced by 5-fluorouracil in hamsters. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015 Jun;12(2):298-309.
68. Semenza GL (2009) Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1. *Ann N Y Acad Sci* 1177:2-8.
69. Ziebart T, Ziebart J, Gauss L, Pabst A, Ackermann M, Smeets R, Konerding MA, Walter C (2013) Investigation of inhibitory effects on EPC-mediated neovascularization by different bisphosphonates for cancer therapy. *Biomed Rep* 1:719-722.
70. Zafar S, Coates DE, Cullinan MP, Drummond BK, Milne T, Seymour GJ (2014) Zoledronic acid and geranylgeraniol regulate cellular behaviour and angiogenic gene expression in human gingival fibroblasts. *J Oral Pathol Med* 43:711-721.
71. Michailidou M, Brown HK, Lefley DV, Evans A, Cross SS, Coleman RE, Brown N. J, Holen I (2010) Microvascular endothelial cell responses in vitro and in vivo: modulation by zoledronic acid and paclitaxel? *J Vasc Res* 47:481-493.
72. Santini D, Zoccoli A, Gregorj C, Di Cerbo M, Iuliani M, Pantano F, Zamarchi R, Sergi F, Flammia G, Buscarini M, Rizzo S, Cicero G, Russo A, Vincenzi B, Avvisati G, Tonini G (2013) Zoledronic acid induces a significant decrease of circulating endothelial cells and circulating endothelial precursor cells in the early prostate cancer neoadjuvant setting. *Oncology* 85:342-347.
73. Wehrhan F, Stockmann P, Nkenke E, Schlegel Ka, Guentsch A, Wehrhan T, Neukam Fw, Amann K (2011) Differential impairment of vascularization and angiogenesis in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw-related mucoperiosteal tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 112:216-221.
74. Mozzati M, Gallesio G, Arata V, Pol R, Scoletta M (2012) Platelet-rich therapies in the treatment of intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a report of 32 cases. *Oral Oncol* 48:469-74.
75. Arany PR (2016) Craniofacial Wound Healing with Photobiomodulation Therapy: New Insights and Current Challenges. *J Dent Res* 95(9):977-84.
76. Blázquez-Castro A, Breitenbach T, Ogilby PR (2014) Singlet oxygen and ROS in

a new light: low-dose subcellular photodynamic treatment enhances proliferation at the single cell level. *Photochem Photobiol Sci* 13(9):1235-40.

77. Holmström KM, Finkel T (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(6):411-21.

78. Craige SM, Kant S, Keaney JF Jr (2015) Reactive oxygen species in endothelial function - from disease to adaptation - . *Circ J* 79(6):1145-55.

79. Salazar VS, Gamer LW, Rosen V (2016) Bmp signaling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol* 12(4):203-21.

80. Huang X, Huang S, Guo F, Xu F, Cheng P, Ye Y, Dong Y, Xiang W, Chen A (2016) Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. *Mol Med Rep* 13(1):613-22.

81. Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, Selvamurugan N (2015) Runx-2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol* 78:202-8.

82. Anavi-lev K, Anavi Y, Chaushu G, Alon DM, Gal G, Kaplan I (2013) Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws: clinico-pathological investigation and histomorphometric analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 115:660-6.

83. Basso FG, Silveira-Turrioni AP, Hebling J, De-Souza-Costa CA (2013) Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology* 59:534-41.

84. Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA (2008) The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106:5-13.

85. Orriss IR, Key ML, Colston KW, Arnett TR (2009) Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. *J Cell Biochem* 106:109-18.

86. Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S, Cirstea D, Vaghela N, Santo L, Rosen E, Ikeda H, Okawa Y, Kiziltepe T, Schoonmaker J, Xie W, Hideshima T, Weller E, Bouxsein ML, Munshi NC, Anderson KC, Raje N (2009) High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin Cancer Res* 15:5829-5839.

87. Fromigué O, Body JJ (2002) Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest* 25:539-546.

88. Koch FP, Merkel C, Al-Nawas B, Smeets R, Ziebart T, Walter et al (2011) zoledronate, ibandronate and clodronate enhance osteoblast differentiation in a dose dependent manner--a quantitative in vitro gene expression analysis of *Dlx5*, *Runx2*, *OCN*, *MSX1* and *MSX2*. *J Craniomaxillofac Surg* 39:562-69.

89. Pan B, To LB, Farrugia NA, Findlay DM, Green J, Gronthos S (2004) The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro. *Bone* 34:112-23.
90. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN (2000) Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 60:6001-7.
91. Bayram H, Kenar H, Taşar F, Hasirci V (2013) Effect of low level laser therapy and zoledronate on the viability and ALP activity of Saos-2 cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 42(1):140-6.
92. Basso FG, Turrioni AP, Soares DG, Bagnato VS, Hebling J, De Souza Costa CA (2014) Low-level laser therapy for osteonecrotic lesions: effects on osteoblasts treated with zoledronic acid. *Support Care Cancer* 22(10):2741-8.
93. Mergoni G, Vescovi P, Sala R, Merigo E, Passerini P, Maestri R, Corradi D, Govoni P, Nammour S, Bianchi MG (2016) The effect of laser therapy on the expression of osteocalcin and osteopontin after tooth extraction in rats treated with zoledronate and dexamethasone. *Support Care Cancer* 24(2):807-13.
94. Vescovi P, Giovannacci I, Merigo E, Meleti M, Manfredi M, Fornaini C, Nammour S (2015) Tooth extractions in high-risk patients under bisphosphonate therapy and previously affected with osteonecrosis of the jaws: surgical protocol supported by low-level laser therapy. *J Craniofac Surg* 26(3):696-9.
95. Lopes-Júnior W Reparação em feridas de extração dental, infectadas, tratadas com droga fotossensibilizadora, associada ou não ao laser de baixa intensidade: Estudo histológico em ratos. 2000. 142f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2000.
96. De Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG (2007) Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 78(3):566-75.
97. De Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG (2008) In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol* 79(6):1081-8.
98. De Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG (2008) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* 79(11):2156-65.
99. Fernandes LA, De Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Martins TM, Okamoto T, Garcia VG (2009) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* 36(3):219-28.
100. Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, De Almeida JM, Martins TM, Bosco AF, Nagata MJ, Cirelli JA, Theodoro LH (2011) Treatment of experimental periodontal

disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol* 38(12):1106-14.

101. Gualberto-Júnior EC (2013) Efeitos do laser e da terapia fotodinâmica no tratamento periodontal mecânico em ratas ovariectomizadas e sob influências sistêmicas de nicotina: Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico. 2013. 103f. Tese (Doutorado em Odontologia, Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

102. Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casatti CA, Ervolino E, Theodoro LH (2013) Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol* 84(4):556-65.

103. Longo M. Avaliação de diferentes protocolos de aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento da periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e microbiológico. 2015. 178f. Tese (Doutorado em Odontologia, Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

104. De Ceulaer J, Tacconelli E, Vandecasteele SJ (2014) *Actinomyces osteomyelitis* in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): the missing link? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33(11):1873-80.

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

106. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner AC, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS (2008) Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 35 (6):728-34.

107. Kimmel DB (2007) Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates - Review. *J Dent Res* 86(11):1022-33.

108. Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ (2006) Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates - Review. *Curr Opin Pharmacol* 6(3):307-12.

109. Kuroshima S, Go VA, Yamashita J (2012) Increased numbers of nonattached osteoclasts after long-term zoledronic acid therapy in mice. *Endocrinology* 153(1):17-28.

110. Martin TJ, Sims NA (2015) RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev Endocr Metab Disord* 16(2):131-9.

111. Çankaya M, Cizmeci Şenel F, Kadioglu Duman M, Muci E, Dayisoğlu EH, Balaban F (2013) The effects of chronic zoledronate usage on the jaw and long bones evaluated using RANKL and osteoprotegerin levels in an animal model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 42(9):1134-9.
112. Nakagawa T, Ohta K, Kubozono K, Ishida Y, Naruse T, Takechi M, Kamata N (2015) Zoledronate inhibits receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand-induced osteoclast differentiation via suppression of expression of nuclear factor of activated T-cell c1 and carbonic anhydrase 2. *Arch Oral Biol* 60(4):557-65.
113. Yang H, Pan H, Yu F, Chen K, Shang G, Xu, Y (2015) A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rats. *Int J Clin Exp Pathol* 8(5):5161-7.
114. Ohe JY, Kwon YD, Lee HW (2012) Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived osteoblasts. *Clin Oral Investig* 16(4):1153-9.
115. Kim JW, Cha IH, Kim SJ, Kim MR (2016) Biomarkers for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Clin Implant Dent Relat Res* 18(2):281-91.
116. De Oliveira CC, Brizeno LA, De Sousa FB, Mota MR, Alves AP (2016) Osteonecrosis of the jaw induced by receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (Denosumab) – Review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 21(4):e431-9.

A nexos



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

ANEXO A: NORMAS PARA PUBLICAÇÃO SEGUNDO O PERIÓDICO *CLINICAL ORAL INVESTIGATION*

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

Papers may be submitted for the following sections:

- Original articles
- Invited reviews
- Short communications
- Letters to the editor

It is the general policy of this journal not to accept case reports and pilot studies.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

TITLE PAGE

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Objectives (stating the main purposes and research question)
- Materials and Methods

Results
Conclusions
Clinical Relevance

These headings must appear in the abstract.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
Use italics for emphasis.
Use the automatic page numbering function to number the pages.
Do not use field functions.
Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
Use the equation editor or MathType for equations.
Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8 Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that

the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own

calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling

("self-plagiarism")).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted. **Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest
Research involving Human Participants and/or Animals
Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
Honoraria for speaking at symposia
Financial support for attending symposia
Financial support for educational programs
Employment or consultation

- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

Please make sure to submit all Conflict of Interest disclosure forms together with the manuscript.

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable)

personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer’s online platform SpringerLink.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Open Choice

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)

ANEXO B: CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

	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 "Efeito do zoledronato sobre o processo de reparo alveolar em ratos: estudo envolvendo os principais fatores de risco para o desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares e avaliação de diferentes terapias preventivas" sob responsabilidade do Pesquisador EDILSON ERVOLINO e colaboração de Cristian Statkiewicz, Valdir Gouveia Garcia, Cláudio Aparecido Casatti, Letícia Helena Theodoro, Juliano Milanezi de Almeida, Maria José Hitomi Nagata, João Paulo Mardegan Issa, Rita Cássia Menegatti Dorneles, Luan Felipe Toro, Thamires Priscila Cavazana, João Martins de Mello Neto, Letícia Chaves Ferreira, Fernanda Furuse Ventura dos Santos e João Vicente Feres-Rodrigues está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-00581-2013.		
CERTIFICATE		
We certify that the research "Effect of zoledronate during the alveolar healing process in rats: study involving the major risk factors for developing osteonecrosis of the jaws and evaluation of different preventive therapies", process number FOA-00581-2013, under responsibility of EDILSON ERVOLINO and with collaboration of Cristian Statkiewicz, Valdir Gouveia Garcia, Cláudio Aparecido Casatti, Letícia Helena Theodoro, Juliano Milanezi de Almeida, Maria José Hitomi Nagata, João Paulo Mardegan Issa, Rita Cássia Menegatti Dorneles, Luan Felipe Toro, Thamires Priscila Cavazana, João Martins de Mello Neto, Letícia Chaves Ferreira, Fernanda Furuse Ventura dos Santos and João Vicente Feres-Rodrigues agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.		
 Profa. Dra. Mary Marcondes Vice-Coordenadora 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		