

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

CAMILA LINS VIEIRA

**AVALIAÇÃO DO USO DE L-PRF COMPARADO AO LASER DE BAIXA
POTÊNCIA, COMO FATOR PREVENTIVO PARA AS LESÕES DE
OSTEONECROSE INDUZIDAS POR BISFOSFONATO**

Recife

2019

CAMILA LINS VIEIRA

**AVALIAÇÃO DO USO DE L-PRF COMPARADO AO LASER DE BAIXA
POTÊNCIA, COMO FATOR PREVENTIVO PARA AS LESÕES DE
OSTEONECROSE INDUZIDAS POR BISFOSFONATO**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em odontologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Clínica integrada

Orientador: JAIR CARNEIRO LEÃO

Co-orientador: LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS

Recife

2019

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

V658a Vieira, Camila Lins
Avaliação do uso de L-PRF comparado ao laser de baixa
potência, como fator preventivo para as lesões de osteonecrose
induzidas por bisfosfonato / Camila Lins Vieira. - 2019.
74 f.: il.

Orientador: Jair Carneiro Leão
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências da Saúde (CCS). Pós-graduação em
Odontologia. Recife, 2019.
Inclui referências e anexos.

1. Osteonecrose de mandíbula por bisfosfonato. 2. L-PRF. 3.
Fibrina rica em plaquetas e leucócitos. 4. Fibrina Rica em Plaquetas. I.
Leão, Jair Carneiro (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2021-017)

CAMILA LINS VIEIRA

**AVALIAÇÃO DO USO DE L-PRF COMPARADO AO LASER DE BAIXA
POTÊNCIA, COMO FATOR PREVENTIVO PARA AS LESÕES DE
OSTEONECROSE INDUZIDAS POR BISFOSFONATO**

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutora pelo
Programa de Pós-Graduação em
odontologia pela Universidade Federal de
Pernambuco.

Aprovada em : 28/08/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^a. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Ricardo Dias Pereira (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Gomes (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco

Prof^a. Dr. José Rodrigues Laureano Filho (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha família, por ter ponderado e compreendido tantos momentos de ausência, não só no doutorado como em toda minha jornada de estudos até aqui. A Deus por ter me guiado por melhores escolhas e ter me feito evoluir com todas elas.

AGRADECIMENTOS

Tão difícil quanto escrever uma tese é agradecer em poucas palavras sem esquecer tantas pessoas que passaram por minha trajetória acadêmica.

À minha família tão querida. Meus pais **Angélica Lins** e **Eliasi Filho**, que me fizeram entender que era possível se eu tentasse. Dependeria da minha dedicação. Aos meus irmãos e amigos, sempre com palavras e de carinho e apoio. Ao meu marido **Augusto Lins** que conviveu com minha ausência, meus episódios de ansiedade, escutou minhas queixas e vibrou com minhas conquistas, meu muito obrigada. Em especial a minha filha, **Julia Lins**, meu bem mais precioso, ser de luz que faz tudo fluir quando temos uma a outra. Eu amo o que você fez em minha vida, obrigada também por suportar as ausências e tentar entender e admirar minha força em não parar de tentar.

Gostaria de agradecer à Universidade Federal de Pernambuco, onde fiz minha formação, por ter servido como minha casa por tantos anos. Aqui entrei em 2001, desde então, entre glórias e sacrifícios pude evoluir como estudante e amadurecer como ser humano.

Gratidão expressa também a todos que compõem a disciplina de estomatologia, sem exceção. Professor **Jair Carneiro Leão**, meu orientador, grande incentivador e ao professor **Luiz Alcino**, mestres aos quais expresso minha admiração pela incessante busca por evolução acadêmica. Destaco minha gratidão a professora **Alessandra Carvalho**, sempre tão doce e justa quando se faz necessário. Ao professor **José Ricardo Pereira**, também expresso minha admiração.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, dentre eles:

A todos os funcionários do biotério do NCE (núcleo de cirurgia experimental), com os quais tive meses de convivência, entre cafés e lanchinhos, cirurgias, materiais sempre disponíveis na medida do possível, dispostos a ajudar sempre. Posso citar os veterinários, **Joaquim** e **Adriana** e todos que compõem este departamento, **Veridiana**, **Hugo**, **Antonio** e em especial a seu **Paulo**, sempre tão disposto a ajudar, muito obrigada.

Também conservo enorme gratidão aos funcionários do DEN (departamento de energia nuclear) da UFPE, os quais não hesitaram que eu partilhasse do ambiente do departamento e da aquisição e processamento das imagens. Lá pude aprender

muito de um mundo mais distante dos profissionais da área de saúde, graças à enorme paciência de todos, em especial **Daniel Amancio** e ao professor **Antonio Celso Dantas Antonino**.

A todos os colegas de doutorado, pelos momentos vividos, as disciplinas cursadas, as aulas compartilhadas. Um agradecimento especial a **Marina Maymone**, minha contemporânea, que tanto me ajudou, se disponibilizou sempre! Da mesma forma ao amigo **Guilherme Soares**, pelo grande auxílio.

Agradeço também aos colegas do centro de imagens da UFPB, **Hugo Dantas** e professor **Frederico Barbosa de Sousa** os quais no momento de problemas técnicos operacionais com o escaneamento das peças pela UFPE, disponibilizaram seu departamento e equipamentos.

Gratidão pelo professor **Danyel Perez**, o qual disponibilizou o laboratório de patologia para processamento da lâminas histológicas, a seu **Rogério** pela disponibilidade diária, a **Gustavo Godoy** pelas orientações e a **Augusto** pelo suporte.

Agradeço o apoio do professor **José Sandro Pereira da Silva**, que em seu Fellowship no Massachusetts General Hospital, Boston, EUA , deu apoio a distância, tirando dúvidas e fazendo suas considerações.

Por fim, mas não menos importante, minha gratidão eterna a todos os animais que participaram deste estudo e que tiveram suas vidas sacrificadas em prol de um ideal de pesquisa. Sem eles não seria possível extrair dados importantes que somados a outros, suportam diretrizes científicas. Mesmo sofrendo com a empatia por animais quando se trabalha com esse tipo de estudo, que não percamos ela, nem a sensibilidade e respeito por esse seres que já nascem com um propósito de servir à ciência. A eles toda minha homenagem.

Agradecimento à **CAPES** pela concessão de dois anos de apoio financeiro na forma de bolsa de apoio à pós-graduação, a qual subsidiou minha formação como pesquisadora.

Enfim, gratidão é o sentimento que mais me enche o coração quando aqui escrevo, fico muito feliz por isso.

"Com as perdas, só há um jeito: perdê-las. Com os ganhos, o proveito é saborear cada um como uma fruta boa da estação".

(LUFT, 2009, p.27)

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o uso da L-PRF como fator preventivo para lesões de Osteonecrose induzidas por bisfosfonatos em ratos após procedimento cirúrgico, sob aspectos clínicos, histológicos e imaginológicos. Foram utilizados 31 ratos, divididos em 4 grupos G1 (controle negativo)- solução salina/ G2 (controle positivo), G3 (Laser) e G4 (L-PRF) ácido zolendrônico 0,15mg/kg), sendo 2 ratos utilizados como doadores do sangue para obtenção do L-PRF. Todos os animais receberam injeções intraperitoneais durante 8 semanas, após as quais os mesmos foram submetidos à cirurgia para exodontia dos primeiros e segundos molares inferiores esquerdos. No momento da cirurgia o grupo G3, recebeu aplicação de dose de laser (PHOTON LASE III- 808 nm/ 100mW 2.2 J 22 seg. cont.) e o grupo G4, membrana de L-PRF. Após 4 semanas, todos os animais foram eutanasiados e submetidos a análises clínica, microtomográfica e histológica. O grupo G2 mostrou alta incidência de osteonecrose, com desorganização de trabeculado ósseo e presença de intensa área de necrose ao exame histológico. Os grupos G3 e G4 mostraram resultados mais favoráveis em relação ao grupo G2, com ligeira predominância do grupo G4, porém, não houve diferença significativa em vários parâmetros entre os grupos G3 e G4. A L-PRF foi ligeiramente superior em alguns parâmetros porém não há evidência que ele pode ser um fator fundamental para a prevenção da osteonecrose.

Palavras-chave: Osteonecrose de mandíbula por bisfosfonato. L-PRF. Fibrina rica em plaquetas e leucócitos. Fibrina Rica em Plaquetas.

ABSTRACT

This study aims to evaluate L-PRF as a preventive factor for bisphosphonate-induced osteonecrosis lesions in rats after surgical, clinical, histological and imaging studies, improving the understanding of its action on the pathophysiology of the disease based on its biological effects. Twenty-nine rats were divided into four groups. All animals received intraperitoneal injections for 8 weeks (G1-saline / G2, G3 and G4-zoledronic acid 0.15mg / kg), after which they underwent surgery for first left and second lower molar extraction. At the time of surgery the G3 group received laser dose application (PHOTON LASE III-808 nm / 100mW 2.2 J 22 sec cont.) And the G4 group L-PRF membrane. After 4 weeks, all animals were euthanized and subjected to clinical, imaging and histological analysis. RESULTS: Group G2 showed a high incidence of osteonecrosis, with bone trabecular disorganization and presence of intense area of necrosis on histological examination. Groups G3 and G4 showed more favorable results compared to group G2, with a slight predominance of group G4, however, there was no significant difference in several parameters between groups G3 and G4. L-PRF was slightly higher in some parameters, but there is no evidence that it can be a key factor in preventing osteonecrosis.

Keywords: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). L-PRF. Leucocyte-rich platelet-rich fibrin. Platelet-Rich Fibrin.

LISTA DE FIGURAS

METODOLOGIA

Figura 1 -	Posicionamento do animal na mesa cirúrgica.....	36
Figura 2 -	Visão intra bucal de área operatória.....	36
Figura 3 -	Visão intra bucal de área operatória.....	36

ARTIGO

Figura 1 -	Peça para análise clínica- Grupo 1.....	47
Figura 2 -	Peça para análise clínica- Grupo 2.....	47
Figura 3 -	Peça para análise clínica- Grupo 3.....	47
Figura 4 -	Peça para análise clínica- Grupo 4.....	47
Figura 5 -	Imagem microtomográfica- Grupo 1.....	47
Figura 6 -	Imagem microtomográfica- Grupo 2.....	47
Figura 7 -	Imagem microtomográfica- Grupo 3.....	47
Figura 8 -	Imagem microtomográfica- Grupo 4.....	47
Figura 8 -	Corte histológico- Grupo 1.....	48
Figura 10 -	Corte histológico- Grupo 2.....	48
Figura 11 -	Corte histológico- Grupo 3.....	48
Figura 12 -	Corte histológico- Grupo 4.....	48

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 –	Tratamento proposto para cada fase de estadiamento da doença.....	21
------------	---	----

METODOLOGIA

Tabela 2 –	Divisão dos grupos e modalidades de intervenções.....	29
------------	---	----

ARTIGO CIENTÍFICO

Tabela 1 –	Divisão dos grupos e modalidades de intervenções.....	41
Tabela 2 –	Dados clínicos.....	49
Tabela 3 –	Dados microtomográficos.....	49
Tabela 4 –	Dados histológicos.....	50
Tabela 5 –	Dados histológicos objetivos.....	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

PRF	Fibrina Rica em Plaquetas
L-PRF	Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
N-BP	Bisfosfonatos Nitrogenados
CTX	C Telopectídeo Terminal
US FDA	US Food and drug administration
NCE	Núcleo de Cirurgia Experimental
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
TGF	Fator de Crescimento Transformador
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
AAOMS	Associação Americana de Cirurgiões Orais e Maxilo Faciais
MRONJ	Osteonecrose de Mandíbula Associada a Medicação
ZA	Ácido Zolendrônico
BRONJ	Osteonecrose de Mandíbula por Bisfosfonato
LLLT	Terapia com Laser de Baixa Potência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	PREÂMBULO	14
1.2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.2.1	Osteonecrose por bisfosfonatos.....	15
1.2.2	Prevalência.....	17
1.2.3	Prevenção e modalidades de tratamento.....	18
1.2.3.1	Laser.....	21
1.2.3.2	L-prf.....	22
2	OBJETIVOS.....	26
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
2.3	HIPÓTESES.....	26
3	METODOLOGIA.....	28
3.1	DELINEAMENTO.....	28
3.2	LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	28
3.3	MODELO EXPERIMENTAL DE EXPERIMENTAÇÃO.....	28
3.4	PROTOCOLO DE MEDICAÇÃO	29
3.5	TÉCNICA ANESTÉSICA.....	29
3.6	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	29
3.7	PROTOCOLO DO LASER.....	30
3.8	OBTENÇÃO DE L-PRF	30
3.9	EUTANÁSIA.....	31
3.10	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	32
3.11	AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA.....	32
3.12	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	33
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS- Artigo 1.....	38
6	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	ANEXO A- NORMA DE DEFESA UFPE.....	65
	ANEXO B- NORMA DA REVISTA ORAL DISEASES.....	69
	ANEXO C- PARECER COMETÊ DE ÉTICA.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 PREÂMBULO

O trabalho foi redigido conforme as normas para defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (Anexo A). O artigo científico que o compõe foi elaborado de acordo com as normas da revista científica "Oral Disease" (Anexo B).

O presente trabalho teve início em 2017, foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, aprovado conforme anexo C e finalizado em 2019.

O trabalho surgiu da ideia de se averiguar a base racional para o emprego da fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) em pacientes afetados por osteonecrose de mandíbula por bisfosfonatos, baseando-se na suposição de que a alta concentração de fatores de crescimento, representa uma estimulação potente para a reparação óssea obtida através de moléculas do próprio paciente, mimetizando desta forma os processos fisiológicos normais.

A L-PRF já tem sido usada em pacientes que apresentam osteonecrose de mandíbula por bisfosfonato, porém, há escassez de artigos que façam a análise na base experimental e como fator preventivo para entendimento de sua fisiopatogenia.

Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar o padrão de reparo mucoso e ósseo com o uso de L-PRF pós exodontia de elementos dentários de roedores submetidos à terapia com ácido zolendrônico, avaliando seu potencial como fator de prevenção da osteonecrose.

No decorrer do estudo, encontrou-se dificuldades na obtenção de padrões de modelos de desenvolvimento de osteonecrose em animais, assim como na obtenção de protocolo de desenvolvimento da L-PRF em ratos.

Ressalta-se desta forma, a tentativa do presente trabalho em esclarecer achados observados na osteonecrose sob os aspectos clínicos, microtomográficos e histológicos, muitas vezes inviável em ensaios clínicos e importante para o entendimento da doença.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Osteonecrose por Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos pertencem a um grupo de drogas comumente utilizadas para tratar desordens ósseas benignas como osteoporose, doença de Paget e osteogênese imperfeita, assim como neoplasias malignas envolvendo osso, como mieloma múltiplo e metástases ósseas de tumores sólidos como câncer de próstata, pulmão e mama. O principal efeito da droga é inibir a reabsorção óssea. São divididos em duas classes: Bisfosfonatos nitrogenados e não nitrogenados (CURRA et al., 2016; KOLPAKOVA et al., 2017; HADERSLEV et al., 2000; RUGGIERO et al., 2014).

Os bisfosfonatos nitrogenados suprimem potencialmente a reabsorção óssea, portanto reduzindo a ocorrência de eventos indesejáveis no esqueleto, como fraturas patológicas e dor associada com doenças malignas ósseas (YAMASHITA et al., 2011).

Embora o uso de bisfosfonato seja benéfico para o tratamento de câncer e doenças do esqueleto, tem sido relatada "osteonecrose em mandíbula" decorrente do seu uso, principalmente em pacientes que foram submetidos a intervenções cirúrgicas dentais, doença periodontal e que receberam corticóide cronicamente (YAMASHITA et al., 2011; KANG et al. 2013).

Em 2003 e 2004, os cirurgiões orais e maxilofaciais foram os primeiros a reconhecer e relatar casos de osso necrótico exposto não cicatrizado em região Maxilo facial em pacientes tratados com bisfosfonatos (Marx, 2003; HOHNECKER, 2004).

A BRONJ (osteonecrose de mandíbula por bisfosfonato) é um evento adverso raro, mas grave, associado à terapia com bisfosfonatos nitrogenados (N-BP), podendo ser atribuído ao ambiente celular alterado no osso causado pela inibição dos osteoclastos (YAMASHITA et al., 2011). Pode ser descrita tipicamente como a falência da cicatrização de ferida na cavidade bucal, ou como severa inflamação periodontal não resolvida, levando à exposição de osso necrótico (HOKUGO et al., 2010; FABBRO; GALLESIO; MOZZATI, 2014).

Sarasquete et al. (2009) mostraram algumas alterações (polimorfismo de nucleotídeo único) no gene do citocromo P450-2C em pacientes afetados por mieloma múltiplo apresentando BRONJ. O início da BRONJ pode estar relacionado a

alterações na vascularização óssea e no metabolismo do ácido araquidônico, ambos controlados por esse gene.

Silva et al. (2019) realizaram revisão sistemática para avaliar se a variação genética é um preditor para o desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares relacionada à medicação (MRONJ) em pacientes que recebem terapia com antirreabsortivos para várias condições. Concluíram que até o presente momento, estudos não conseguiram mostrar um único gene como fator de risco para o MRONJ (Osteonecrose de mandíbula associada a medicação).

Para distinguir a Osteonecrose de mandíbula de outras condições de deficiência de cicatrização, a seguinte sequência de definição clínica tem sido adotada pela AAOMS (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons): Pacientes podem ser considerados como portadores de Osteonecrose se todas as três condições estiverem presentes. 1- Tratamento atual ou prévio com bisfosfonato; 2- Exposição de osso necrótico ou osso que possa ser sondado através de fístula intra ou extra oral, na região maxilofacial que seja persistente por mais de 8 semanas; 3- Nenhuma história de radioterapia de mandíbula (KAIBUCHI et al., 2019; RUGGIERO et al., 2004).

Acredita-se que a patogênese da doença seja de origem multifatorial. Seriam basicamente quatro mecanismos envolvidos: 1- Inibição da remodelação óssea, onde os osteoclastos são as principais células alvo dos bisfosfonatos; 2- Inibição da angiogênese, onde o suprimento vascular é afetado; 3- Efeito tóxico no epitélio oral, onde a cicatrização do tecido mole é afetada; 4- Infecção, onde a presença de um biofilme complexo no osso exposto é um importante componente no desenvolvimento da doença (KAIBUCHI et al., 2019; RUGGIERO et al., 2004; SILVEIRA; ETGES; CORREA; VASCONCELOS, 2016; AGHALOO et al., 2011; PACHECO et al., 2015).

Com relação à hipótese de toxicidade de tecido mole, embora se saiba que os bisfosfonatos fazem forte ligação com a hidroxiapatita no osso, tem sido visto múltiplos tipos celulares que apresentam apoptose aumentada e proliferação diminuída após o contato com o bisfosfonato em estudos in vitro (GIRAUDO; INOUE; HANAHAN, 2004; MONTAGUE; HART; GEORGE, 2004).

Tem sido sugerido que a taxa de remodelação óssea é alta no osso mandibular, portanto, provavelmente por esse motivo, os bisfosfonatos podem ter um impacto muito maior nos ossos gnáticos do que em outros ossos (KAIBUCHI et al., 2019; OH, KIM, 2017; TAKAOKA et al., 2015).

1.2.2 Prevalência

Fabbro et al. (2014) relatam em sua revisão sistemática que segundo a *American Association of Oral and Maxillofacial Surgery (AAOMS)* a incidência de BRONJ é dependente da dose e duração do tratamento, e varia de 0,8% a 12%, mostrando que a causa primária de sua ocorrência depende muitas vezes da cirurgia oral, particularmente a extração dentária, em 66% dos casos. Os 34% restantes dependem de trauma agudo ou crônico (por exemplo, causado por dentaduras mal ajustadas) ou infecção.

O risco de desenvolvimento de Osteonecrose em pacientes que recebem bisfosfonato endovenoso foi de aproximadamente 1%, enquanto nos pacientes que recebem bisfosfonato oral, essa taxa é de 0,1%, a qual aumenta para 0,21 % após mais de 4 anos de administração oral do bisfosfonato (RUGGIERO et al., 2004).

Howie et al (2015) relatam que há um envolvimento da mandíbula em 65% dos casos de osteonecrose, 26% da maxila e ambos em 9%. Porém, Ruggiero et al. (2014) citam 73% para mandíbula, 22,5% para maxila e 4.5% para ambos os ossos.

Exodontia parece ser o fator de maior risco para o desenvolvimento de Osteonecrose em pacientes que recebem bisfosfonatos (HOKUGO et al., 2010).

A melhor estimativa para o risco de BRONJ em pacientes expostos a bisfosfonato oral após a extração dentária é de 0,5%. Estimativas para o desenvolvimento do BRONJ após a extração dentária em pacientes com câncer expostos à medicação intravenosas variam de 1,6 a 14,8% (RUGGIERO et al., 2014).

O risco de desenvolver BRONJ em pacientes que foram expostos a medicamentos antirreabsortivos para outros procedimentos dentoalveolares, como colocação de implantes dentários e procedimentos endodônticos ou periodontais, é desconhecido. Na ausência de dados, considera-se o risco para a BRONJ após a instalação de implantes dentários e procedimentos endodônticos ou periodontais, que exigem a exposição e a manipulação do osso, comparáveis ao risco associado à extração dentária (RUGGIERO et al., 2014; KYRGIDIS; VAHTSEVANOS; KOLOUTSOS, 2008; SAAD; BROWN; VAN POZNAK, 2012).

Corticóides e agentes antiangiogênicos associados a medicações antirreabsortivas são correlacionados a um risco aumentado de osteonecrose, assim como comorbidades (diabete e anemia) e alguns tipos de câncer. Há um aumento da prevalência no gênero feminino, provavelmente devido ao perfil da população para o

qual a medicação está sendo prescrita (BROWN; RAMALINGAM; ZACHARIN, 2008; MARTINS, 2012).

1.2.3 Prevenção e modalidades de tratamento

O comitê especial da AAOMS na MRONJ apóia uma abordagem multidisciplinar para o tratamento de pacientes que se beneficiam com agentes antirreabsortivos ou antiangiogênicos. Essa abordagem inclui consulta com cirurgião-dentista adequado quando é determinado que um paciente necessitaria de drogas dessa classe. Considerações durante as avaliações clínicas e radiográficas incluem a motivação do paciente, educação do paciente em relação ao atendimento odontológico, aplicação de flúor, bochechos de clorexidina, mobilidade dentária, doença periodontal, presença de restos radiculares, cárie, patologia periapical, edentulismo e estabilidade da prótese (RUGGIERO et al., 2014).

A estratégia de cessação do tratamento com antirreabsortivos para realização de procedimentos dentários inadiáveis tem sido controversia. Para o uso de bisfosfonatos orais, tem sido considerada a possibilidade de “Drug Holiday” para pacientes com mais de 4 anos de uso ou fatores de risco associados, no qual recomenda-se a cessação da droga três meses antes e o retorno três meses depois. Para pacientes oncológicos que fazem uso de antirreabsortivo endovenoso, não há dados para apoiar ou refutar a cessação da terapia antiangiogênica na prevenção ou manejo da BRONJ. Os dados são escassos em relação ao efeito da descontinuação de bisfosfonato EV antes de tratamentos dentários invasivos, caso estes sejam necessários. No entanto, se a BRONJ se desenvolver, o oncologista pode considerar a interrupção da terapia antirreabsortiva até que ocorra o fechamento do tecido mole, dependendo do estado da doença (GUARNERI et al., 2010).

Embora um pequeno percentual de pacientes que recebem antirreabsortivos orais desenvolva osteonecrose espontaneamente, a maioria desenvolve após cirurgia alveolodentária. Portanto, se a condição sistêmica permitir, o tratamento deveria ser retardado até que a condição de saúde bucal seja otimizada e exista uma adequada cicatrização óssea (GUARNERI et al., 2010).

A profilaxia antibiótica antes da cirurgia oral é relatada como importante fator para evitar a osteonecrose e promover a cicatrização adequada, já que a exposição

do osso na cavidade bucal leva à colonização bacteriana do local após a extração dentária (OH, KIM, 2017).

No estudo realizado por Atalay et al. (2011), foram avaliados os efeitos do nível sérico do C-telopectídeo terminal (CTX sérico), que é um marcador bioquímico de turnover ósseo que se modifica por tratamento antirreabsortivo, no prognóstico dos pacientes com BRONJ e, embora tenha-se observado que os pacientes com valores de CTX mais elevados revelaram melhor cicatrização, não houve correlação significativa entre os níveis séricos de CTX e a cicatrização.

Weber et al. (2016) sugerem que à luz dos achados de sua revisão sistemática, os pacientes que passarão por tratamento com N-BP devem ser informados e avisados sobre o risco potencial da BRONJ. Isso é particularmente importante em pacientes com câncer, que apresentam maior risco de desenvolver essa condição. Além disso, seria aconselhável que os profissionais responsáveis encaminhassem os pacientes para um checkup odontológico antes do início do tratamento, de modo a permitir o acompanhamento dos mesmos por uma equipe multidisciplinar.

O manejo de pacientes com BRONJ permanece controverso, e não há um padrão definitivo de tratamento para essa doença. O objetivo deve ser eliminar a dor e controlar a progressão da infecção e necrose óssea, a fim de preservar a qualidade de vida dos pacientes. Qualquer tratamento médico ou cirúrgico de BRONJ precisa ser balanceado com a terapia oncológica de pacientes com metástases osteolíticas e o risco de fratura em pacientes com osteoporose (FABBRO; GALLESIO; MOZZATI, 2014).

Os objetivos do tratamento para pacientes com diagnóstico estabelecido de osteonecrose são, controle da dor, controle de infecção de tecido mole e duro e minimizar a progressão ou ocorrência de novos focos de necrose. A literatura científica traz relatos de sucesso em tratamentos invasivos e conservadores. Porém, parece claro que, exceto nos casos mais avançados de estágio 3 da doença, ou nos casos com sequestro ósseo bem definido, seria mais prudente considerar terapias operatórias apenas nos casos onde estratégias não operatórias tenham falhado (KADEMANI; KOKA; LACY, 2006).

Independentemente do estágio da doença, áreas de osso necrótico que são uma constante fonte de irritação dos tecidos moles e seqüestro ósseo frouxo devem ser removidos ou recontornadas para que a cicatrização do tecido mole possa ser

otimizada. A extração de dentes sintomáticos dentro do osso necrótico exposto deve ser considerado, porque parece improvável que a extração exacerbará o processo necrótico já estabelecido (KADEMANI; KOKA; LACY, 2006).

Procedimentos odontológicos preventivos são atualmente aceitos como padrão-ouro no tratamento de BRONJ juntamente com a modificação do tratamento com bisfosfonatos. O diagnóstico precoce é extremamente importante para o sucesso do tratamento. O desbridamento cirúrgico do osso necrótico é considerado um tratamento relativamente conservador nos estágios II e III, pois à medida que a doença progride, ressecções que diminuem a qualidade de vida do paciente podem ser necessárias. No entanto, o desbridamento cirúrgico não é um procedimento fácil devido à insuficiência de técnicas de imagem na visualização das bordas da necrose. A ressecção óssea guiada por fluorescência parece ser uma técnica promissora no tratamento cirúrgico. Avaliar os resultados do tratamento de BRONJ é difícil, especialmente por duas razões. A primeira razão é que não existe uma definição universalmente aceita de sucesso no tratamento do BRONJ, e o segundo motivo é a falta de ensaios clínicos controlados sobre o assunto (BEDOGNI; BLANDAMURA; LOKMIC, 2008; VESCOVI; MANFREDI; MERIGO; MELETI, 2008; SPANOU et al., 2015).

Até que dados de ensaios clínicos randomizados estejam disponíveis, o planejamento de um tratamento "ideal" deve ser individualizado com base em sinais de infecção aguda, estágio da BRONJ e expectativa de vida do paciente (SPANOU et al., 2015). Portanto, atualmente, há estratégias de tratamento propostas para cada estágio da doença: (RUGGIERO et al., 2004)

Tabela 1- Tratamento proposto para cada fase de estadiamento da doença.

ESTADIAMENTO DA BRONJ	ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO
Com risco - pacientes em terapia farmacológica (oral ou endovenosa), sem evidência clínica de necrose óssea.	Sem indicação de tratamento. Orientações ao paciente.
Estágio 0 – sem evidência clínica de necrose óssea, porém com, sintomatologia clínica e achados imaginológicos inespecíficos.	Farmacoterapia sistêmica incluindo analgésicos e antimicrobianos.
Estágio 1 – Necrose e exposição óssea ou fístula local, porém sem sintomatologia clínica nem evidência de infecção ativa.	Prescrição de antisséptico oral. Acompanhamento trimestral do paciente e orientações. Avaliação, com o médico assistente, a real necessidade do uso do fármaco.
Estágio 2 – Necrose e exposição óssea, ou fístula local, com sintomatologia dolorosa e eritema na área de exposição, associada com infecção, com ou sem supuração.	Tratamento sintomático com antisséptico oral, terapia antimicrobiana (via oral) e analgesia. Desbridamento local para controle de infecção e adequação dos tecidos moles.
Estágio 3 - Necrose e exposição óssea, ou fístula local, com sintomatologia dolorosa, infecção e pelo menos mais uma das seguintes apresentações: necrose e exposição óssea além dos limites alveolares (borda inferior e/ou ramo mandibular, seio maxilar, região zigomática) culminando em fratura patológica, fístula extraoral, fístula buco-sinusal ou buco-nasal ou osteólise da borda inferior da mandíbula ou assoalho do seio.	Tratamento com antisséptico oral, terapia antimicrobiana e analgesia. Desbridamento cirúrgico ou ressecção.

Em adição, outros métodos terapêuticos, têm sido investigados, dentre eles, laser de baixa potência, oxigenoterapia hiperbárica, PRF aplicado localmente, hormônio paratireóideo e proteína morfogênica óssea (SILVEIRA; ETGES; CORREA; VASCONCELOS, 2016).

O uso de oxigenoterapia hiperbárica não pode ser suportado como uma modalidade de tratamento para a BRONJ neste momento (RUGGIERO et al., 2004).

1.2.3.1 Laser

Laser de baixa potência (LLLT) tem sido um tratamento adjunto promissor para BRONJ, devido a sua habilidade para modular o metabolismo celular, melhorando a

cicatrização das feridas e diminuindo a dor. O efeito bioestimulante se expande até a matriz óssea e aumenta o índice mitótico dos osteoblastos, estimulando sua proliferação e diferenciação. Isso aumenta o número de células osteoblásticas diferenciadas e aumenta sua atividade, assim como acelera a formação óssea. Em adição, LLLT é um método não invasivo com efeito antibacteriano e bioestimulante em tecido mole e ósseo e é proangiogênico (WEBER et al., 2016).

A luz laser de baixa energia tem sido sugerida como sendo absorvida pelas moléculas celulares e seu efeito fotoestimulatório parece resultar em um aumento na produção de enzimas mitocondriais, porfirinas, flavinas e citocromos (LUOMANEN; ALALUUSUA, 2012; ASAKA et al., 2016).

Weber et al. (2016) afirmam que tratamento combinado de antibiótico, cirurgia minimamente invasiva e LLLT nos estágios precoces da doença deveriam ser considerados o padrão ouro no manejo da BRONJ, embora o mesmo admita que existem controvérsias quanto ao efeito bioestimulante. A falta de relatos consistentes de variáveis físicas e biológicas como tipo de laser, frequência, fluência, duração de aplicação, distância entre o laser e o tecido e diferença histológica entre os tecidos tratados, dificultam a padronização de protocolos e reprodução dos estudos na área.

1.2.3.2 L-prf

A fibrina rica em plaquetas (PRF) foi desenvolvida na França por Choukroun et al (2001), é uma segunda geração de concentrado de plaqueta usado para acelerar a cicatrização de tecido mole e ósseo. Mais tarde foi renomeada de L-PRF pelo conteúdo adicional de leucócitos. Trata-se de uma matriz de fibrina autóloga contendo uma grande quantidade de plaquetas e citocinas leucocitárias.

Suas vantagens sobre outros aglutinados de plaquetas conhecidos (como o plasma rico em plaquetas-PRP) incluem facilidade de preparação/aplicação, custo mínimo e falta de modificação bioquímica (não é necessária trombina bovina ou anticoagulante) (HAMDAN et al., 2009; TOFFLER et al., 2009; ABDULLAH, 2016).

O sangue periférico é coletado em tubos específicos e imediatamente processado em centrifugação única. Esse processo ativa a cascata de coagulação e gera um coágulo tridimensional de fibrina. Após a centrifugação, o sangue é separado numa fração celular vermelha e no coágulo de L-PRF, que tem que ser delicadamente

isolado. Além disso a liberação dos fatores de crescimento na L-PRF tem sido descrita como lenta e contínua, durando cerca de 10 dias. O corpo do coágulo como rede de fibrina está enriquecido com plaquetas e concentrado com uma variedade de leucócitos, que existem fisiologicamente no sangue periférico (CHOUKROUN; MIRON, 2018).

A contagem plaquetária (trombócitos) na L-PRF é três a sete vezes maior que a concentração normal no sangue. Fatores de crescimento obtidos de L-PRF incluem fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador (TGF) e fator de crescimento semelhante à insulina (ABDULLAH, 2016).

A L-PRF atende aos três critérios importantes de regeneração tecidual, incluindo: 1) Servir como arcabouço tridimensional de fibrina, (2) Incluir células autólogas, como leucócitos, macrófagos, neutrófilos e plaquetas, (3) Servir como reservatório de fatores de crescimento naturais que podem ser liberados ao longo de 10-14 dias (CHOUKROUN; MIRON, 2018; HONDA et al., 2012; TAYŞI, ATALAY, ÇANKAYA, YILDIRIM, 2017).

A aplicação de L-PRF como biocatalizador dentro da região comprometida pode acelerar a cicatrização das feridas fornecendo as células necessárias imediatamente na lesão e assim, menor recrutamento celular será necessário (CHOUKROUN; MIRON, 2018).

Dican et al. (2014) relatam que os efeitos biológicos adicionais da L-PRF podem contribuir para a melhora do desfecho clínico em BRONJ recorrente. Até onde se sabe, o L-PRF funciona através da degranulação dos grânulos alfa nas plaquetas, que contêm os fatores de crescimento sintetizados e pré-embalados. Os fatores de crescimento secretados se ligam aos seus receptores transmembrana nas células-tronco mesenquimais adultas, osteoblastos e células endoteliais e, em seguida, causam a formação da matriz e a produção de osteóide através da transformação celular (DINCĂN et al., 2014).

Canan-Durán et al. (2017), relatam que é possível avaliar que as abordagens conservadoras com L-PRF são bastante eficazes, mas que, quando a doença está mais avançada, é necessária uma intervenção mais ativa para impedir seu progresso. Os autores em sua revisão de literatura, concluem que a eficácia do uso de L-PRF na osteonecrose pode ser considerada como uma alternativa real no tratamento dessa

entidade. No entanto, mais estudos clínicos são necessários para realmente avaliar essa nova terapia.

Entre essas novas terapias disponíveis para o tratamento e/ou prevenção da Osteonecrose induzida por medicação, a L-PRF têm sido sugerida, sendo descoberto que fatores de crescimento específicos melhoram a angiogênese, estimulam a produção de colágeno, produzem agentes antiinflamatórios, iniciam o crescimento interno vascular, induzem a diferenciação celular, controlam as respostas inflamatórias locais e ajudam a curar lesões teciduais, levando à redução da dor e da tumefação (PARK et al., 2016; BARBA-RECREO et al., 2014).

Lopez-Jornet et al. citado por Barba-Recreo (2014) em sua revisão sistemática, afirmam que não há dados científicos publicados para apoiar qualquer protocolo de tratamento específico, incluindo o uso de concentrado autólogo de plaquetas, juntamente com o desbridamento cirúrgico, para o manejo do osteonecrose de mandíbula induzida por medicação. Reafirmam que são necessários ensaios clínicos controlados e randomizados sobre seu uso (BARBA-RECREO et al., 2014).

Fabbro et al. (2012), em uma revisão sistemática destacam que, em pacientes sob terapia com bisfosfonatos, o uso de concentrados de plaquetas sempre deve estar associado a qualquer tratamento de cirurgia oral, a fim de melhorar a cicatrização tecidual.

Asaka et al. (2016) realizaram um ensaio clínico controlado, no qual 102 pacientes recebiam terapia com bisfosfonato e necessitavam de exodontias. Os pacientes foram divididos em grupo experimental (membrana L-PRF) e controle, com intensão de investigar a L-PRF como fator protetor/preventivo de Osteonecrose. Os resultados deste estudo mostraram inicialmente que a L-PRF pode diminuir o risco de fechamento tardio da ferida após a extração dentária em pacientes submetidos à terapia com N-BP oral. A epitelização precoce foi confirmada em todos os pacientes com L-PRF incluindo pacientes recebendo esteróides e imunossupressores. Assim, a L-PRF pode reduzir o risco de recuperação tardia em pacientes com necessidade de exodontias e que são submetidos à terapia oral com bisfosfonatos (ASAKA et al., 2016). Além disso, a L-PRF pode ser útil na prevenção da BRONJ em pacientes que recebem BP oral (Rupel; Ottaviani; Gobbo; 2014; Kuhl; Walter; Acham; 2012; Mozzati; Arata; Gallesio, 2012; Nørholt; Hartlev, 2016).

Tem sido citado na literatura, um protocolo com pentoxifilina, tocoferol e antibiótico, para tratamento de osteonecrose, o qual já tem sido usado na osteoradionecrose, conceituada como necrose asséptica do osso, desenvolvida após radioterapia em pacientes com tumor em região de cabeça e pescoço, porém vale ressaltar a diferença fisiopatogênica das duas patologias. Na presente revisão, não foram encontrados trabalhos prospectivos randomizados controlados que investigassem os benefícios desses agentes, mas sim relatos e séries de casos, com resultados que encorajam o seu uso (LYONS; BRENNAN, 2017; BREIK et al., 2019; MAGREMANNE; REYCHLER, 2014; OWOSHO et al., 2016).

Posto o presente, o trabalho teve por objetivo avaliar o padrão de reparo mucoso e ósseo após o uso de L-PRF pós exodontia de elementos dentários de roedores submetidos à terapia com ácido zolendrônico, avaliando seu potencial como fator de prevenção da Osteonecrose e comparando-o com o laser de baixa potência.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o padrão de reparo mucoso e ósseo após o uso de L-PRF pós exodontia de elementos dentários de roedores submetidos à terapia com ácido zolendrônico, avaliando seu potencial como fator de prevenção da Osteonecrose e comparando-o com o laser de baixa potência

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, do ponto de vista clínico, imaginológico e histológico, o grau de reparo tecidual mandibular (mucoso e ósseo) de ratos em uso de ácido zolendrônico submetidos à cirurgia para exodontia de elemento dentário (molar);
- Avaliar, do ponto de vista clínico, imaginológico e histológico, o grau de reparo tecidual mandibular (mucoso e ósseo) de ratos em uso de ácido zolendrônico submetidos à cirurgia para exodontia de elemento dentário (molar), associado ao uso de L-PRF transoperatório;
- Avaliar, do ponto de vista clínico, imaginológico e histológico, o grau de reparo tecidual mandibular (mucoso e ósseo) de ratos submetidos à cirurgia para exodontia de elemento dentário (molar) associado ao uso de Laser de baixa potência transoperatório;
- Comparar, do ponto de vista clínico, imaginológico e histológico, o grau de reparo tecidual mandibular (mucoso e ósseo) de ratos submetidos à cirurgia para exodontia de elemento dentário (molar) submetidos e não submetidos à terapia com ácido zolendrônico
- Comparar, do ponto de vista clínico, imaginológico e histológico, o grau de reparo tecidual mandibular (mucoso e ósseo) de ratos submetidos à cirurgia para exodontia de elemento dentário (molar) submetidos à terapia com ácido zolendrônico, fazendo uso de laser ou L-PRF como fator preventivo.

2.3 HIPÓTESES

Ho- A L-PRF não tem efeito sobre a cicatrização de tecidos moles e duros, sendo inerte ao processo de reparação em pacientes submetidos a exodontia em uso de bisfosfonatos.

H1- A L-PRF melhora a cicatrização de tecidos moles e duros, sendo participativa no processo de reparação em pacientes submetidos a exodontia em uso de bisfosfonatos.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO

Estudo do tipo experimental de laboratório, do tipo prospectivo, analítico de amostras independentes, cego. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (processo:003/2015) (Anexo C)

3.2 LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados 31 animais Wistar (*rattus norvegicus albinus*), fêmeas (visto que o sexo não exerce influência sobre o experimento, ratos fêmeas estão disponíveis mais rapidamente), adultas, com mais de 60 dias de vida, pesando entre 300 a 400 g de massa corporal, selecionados aleatoriamente no Biotério José Paulino do departamento de Nutrição da UFPE. Os animais foram nascidos e criados no local.

A fase experimental foi realizada no Biotério de Medicina Experimental da Universidade Federal de Pernambuco (, onde os animais foram mantidos sob condições de luz, temperatura e alimentação padrões utilizadas no biotério. Os mesmos foram acondicionados em gaiolas de polipropileno grande com 45x30x12cm de dimensão, forrada com maravalha, contendo 4 animais cada. Receberam água e ração sólida peletizada (Labina, Purina Nutrimentos, São Paulo, Brasil), com alto teor de proteína (20 a 27%) *ad libitum* e estiveram sempre sob controle de temperatura de 22 ± 2 °C, com um ciclo claro/escuro de 12 horas.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL E DE EXPERIMENTAÇÃO

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos, com 8 animais cada, e marcados em diferentes patas (DD- pata dianteira direita/ DE- pata dianteira esquerda/ TD- pata traseira direita/ TE- pata traseira esquerda) para facilitar a identificação dos grupos, de acordo com a tabela 2. Vieram a óbito 3 animais, 1 de cada grupo G1, G2 e G3, por isso a diferença da quantidade de animais para o grupo G4. Dois animais foram utilizados como doadores para preparação do L-PRF.

Tabela 2. Divisão dos grupos e modalidades de intervenções

Semana Grupo (G)	G1 (controle negativo) 7 animais	G2 (Controle positivo) 7 animais	G3 (Laser) 7 animais	G4 (PRF) 8 animais
0	Solução salina 0,9%	ZOMETETA	ZOMETETA	ZOMETETA
4	Solução salina 0,9%	Zometa	ZOMETETA	Zometa
8	Solução salina 0,9% + Cirurgia	Zometa+ cirurgia	Zometa+ Cirurgia +Laser	Zometa+ Cirurgia +PRF
12	EUTANÁSIA	EUTANÁSIA	EUTANÁSIA	EUTANÁSIA

3.4 PROTOCOLO DE MEDICAÇÃO

Os animais dos grupos G2, G3 e G4 foram submetidos a injeções intraperitoniais do bisfosfonato (Ácido Zolendrônico, Eurofarma, São Paulo, Brasil) na dosagem de 0,15 mg/Kg/semana (Pacheco et al. 2015). O grupo G1 (controles negativos) recebeu injeções, também intraperitoniais, de 0,1ml de solução salina. Desta forma, todos os roedores foram submetidos à administração de ácido zolendrônico ou solução salina uma vez por semana, durante 8 semanas consecutivas. Os ratos eram imobilizados por profissional capacitado enquanto um colaborador do estudo realizava as injeções na região intraperitoneal com seringa estéril de calibre 30G, após pesagem e cálculo da dosagem do mesmo. As injeções eram feitas em horários semelhantes do dia.

3.5 TÉCNICA ANESTÉSICA

Antes de cada procedimento cirúrgico, os roedores foram pesados e anestesiados com cloridrato de quetamina 1mg/kg associado a xilazina 0,5mg/kg, por via intramuscular, conforme normas e diretrizes éticas para pesquisa com animais da Resolução 879 de 15 de fevereiro de 2008, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

3.6 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Todos os animais foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para exodontia dos primeiro e segundo molares inferiores esquerdos. Os experimentos foram realizados no centro cirúrgico do Biotério de Medicina Experimental da Universidade

Federal de Pernambuco (NCE-Núcleo de cirurgia experimental). Foi desenvolvido um dispositivo para a acomodação do animal durante a realização das exodontias com tábua de cozinha, alo metálico e liga elástica para que o mesmo se mantivesse com uma boa abertura bucal durante a realização do procedimento (Fig. 1).

Após posicionamento do animal no dispositivo desenvolvido, coberto por campo estéril, foi realizada assepsia/antisepsia intra e extraoral com clorexidina 0,12% e 2% respectivamente, infiltração local em mucosa alveolar vestibular mandibular esquerda com cloridrato de articaína 4% e adrenalina 1:100.000 (aproximadamente 0,1ml), sindesmotomia com agulha hipodérmica descartável 40x12mm, além de sonda exploradora, luxação dentária com espátula dupla 7 ou sindesmótomo (Duflex-SS White, Rio de Janeiro, Brasil), remoção dos fragmentos dentário com pinça halstead mosquito curva 12,5cm (Quinelato, São Paulo, Brasil) e sutura do alvéolo com fio absorvível vicryl 5-0 (Ethicon, São Paulo, Brasil)(Fig. 2 e 3). Foi utilizada lupa com fotóforo para otimização dos procedimentos. Todos os procedimentos foram realizados por um único operador treinado.

3.7 PROTOCOLO LASER

Ao final de cada procedimento (após sutura), os animais do grupo G3 receberam aplicação imediata de laser de baixa intensidade (PHOTON LASE III- 808 nm / 100mW de potência; Dose-2.2 J/cm², durante 22 seg. contínuos em único ponto com área de 1cm²), com ponteira protegida com dispositivo descartável, trocado a cada animal.

3.8 OBTENÇÃO DO L-PRF

Antes do início da pesquisa, foi realizado um estudo piloto para avaliar a viabilidade dos protocolos disponíveis para a aquisição da membrana de L-PRF, com 5 ratos. Foram testados os protocolos presentes na literatura.^(40,42,42,67,72,79,87)

Não foi possível utilizar sangue autólogo, pois a quantidade necessária para fabricação da membrana e manutenção do animal vivo, não eram compatíveis.

Enquanto os animais do grupo G4 estavam anestesiados para os procedimentos de exodontia, o animal doador foi preparado para coleta de sangue e preparação da L-PRF. O mesmo foi submetido a anestesia profunda e posicionado

em decúbito dorsal para coleta intracardíaca de 6mls de sangue, por um profissional habilitado. O sangue do doador foi transferido para tubo Falcon, sem anti-coagulante ou trombina, e rapidamente centrifugado, somente uma vez, a 3000 rpm (400g), durante 10 minutos, conforme protocolo citado por Dülgeroglu (2017) para evitar o início das cascatas de coagulação antes da centrifugação, e para permitir a transformação natural da matriz de fibrina durante a centrifugação. O tubo com sangue doador foi colocado na centrífuga em posição contra balanceada com tubo com água na mesma quantidade em posição oposta. Após a centrifugação, os glóbulos vermelhos no fundo do tubo e o plasma acelular no topo foram descartados, o L-PRF foi transportado para estojo apropriado para confecção de membrana e posteriormente recortado em pequenos pedaços (aprox. 2x2mm) e aplicados nos alvéolos logo após as exodontias. A sutura foi iniciada durante a preparação do L-PRF, que foi colocado diretamente sobre o osso. O retalho mucoperiosteal foi então fechado primariamente, realizando-se incisões adicionais no periósteo para garantir uma ausência de tensão.

Após os procedimentos, os animais permaneceram no centro cirúrgico sob condições apropriadas de temperatura e recebendo oxigênio a 100% por catéter até a completa recuperação da anestesia. Todos receberam analgésico para evitar dor pós-operatória imediata. Os animais foram mantidos em caixas individuais por 24 horas para que não houvesse interferência no tratamento por contato entre eles. Os animais foram monitorados diariamente. A higienização das caixas, manutenção da alimentação e troca da água foram realizadas, regularmente, por profissional habilitado. Os animais permaneceram por mais 4 semanas no biotérios sob os devidos cuidados. Não foi utilizado antibiótico para que não houvesse interferência na fisiopatogênese da osteonecrose.

A centrífuga utilizada foi da marca KASV, modelo K14-0815C (Teknika Diagnósticos, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.9 EUTANÁSIA

Os animais foram anestesiados, conforme protocolo descrito anteriormente, e submetidos à eutanásia com sobredose dos mesmos medicamentos, por via intracardíaca. Foi realizada a inspeção do animal extra e intrabucal para a detecção de abscessos ou sinais flogísticos característicos de sinais extra bucais de

osteonecrose, na sequencia, a dissecação da hemimandíbula esquerda com tecido mole onde foi realizada a fotografia para a posterior análise clínica e a mesma foi embebida em formol a 10%.

3.10 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Após eutanásia, foi realizada a dissecação dos espécimes, realizando a desarticulação da hemimandíbula na articulação temporo-mandibular e na sínfise, preservando a região de tecido mole peri-lesional. A peça foi posicionada com ajuda de pinça hemostática e fotografada para captura de detalhes e avaliação clínica. Os seguintes itens foram analisados por pesquisador cego para os grupos (através das fotos sem identificação), com o objetivo de quantificar e diferenciar os grupos quanto aos tratamentos:

Parâmetros de avaliação clínica:

1- Exposição óssea: Onde se observou a presença de solução de continuidade e estrutura óssea propriamente dita

2- Aspecto da cicatrização: Onde as peças foram enquadradas em:

* Cicatrizada: Completo recobrimento epitelial

*Granulação: Sugerindo fase intermediária de cicatrização, com proliferação tecidual abundante e sangrante.

*Ferida aberta: Sugerindo fase inicial de cicatrização, sem progresso para o completo recobrimento epitelial.

3- Secreção: A presença ou não de secreção purulenta, apontando infecção.

4- Aspecto da mucosa: Dividido em lisa, rugosa ou ulcerada. Sugerindo a densidade celular e remodelação das fibras no processo final de cicatrização

5- Espessura da mucosa: Fina ou espessa. Refletindo a reorganização das fibras, dando maior ou menor resistência ao tecido.

3.11 AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA

As imagens dos espécimes foram obtidas através de tomógrafo de terceira geração Nikon XT H 225, operando a 80 kV e 222 μ A, sem filtro, utilizando protocolo com tamanho de voxel de 12 microns (μ) e tempo de exposição de 25 minutos. As amostras foram fixadas em bloco de isopor, com o incisivo imerso no mesmo.

Posteriormente, as imagens foram reconstruídas utilizando-se o software CTPro (Nikon). As mesmas foram analisadas nas reconstruções multiplanares (axial, sagital e coronal), através do software VGStudioMax 2.2, onde foi aplicado o filtro de Gaus para minimizar ruídos e feita a mudança da escala do tomógrafo para a de hounsfield.

Análise qualitativa:

Cada imagem foi analisada através do software ImageJ nos três cortes (axial, coronal e sagital), no perímetro perialveolar dos elementos dentários extraídos, preenchendo os seguintes critérios de avaliação: 1- Presença de sequestro ósseo; 2- quantidade de neoformação óssea; 3- alteração estrutural das trabéculas óssea; 4- erosão da cortical óssea.

Análise quantitativa:

As imagens foram processadas no software ImageJ, para avaliação de padrão de trabeculado ósseo e cálculo de densidade. Todas as imagens (ImageStack) foram transformadas em 32 bit (para avaliação da densidade), diminuídas em seu valor em 1000 HU (visando a transformação da escala para área médica). Nos cortes sagitais foram avaliadas a densidade de ROIs (regiões de interesse) de 40X80 pixels de área, posicionados logo abaixo da parede apical ao longo do defeito ósseo. Para confecção do histograma, foram selecionados cortes do início ao fim da região de defeito ósseo (aproximadamente 200 cortes).

3.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras foram encaminhadas para o processamento histológico convencional, constando de descalcificação com EDTA a 5%, desidratação com álcool e diafanização em xilol. A mesmas foram emblocadas em parafina.

Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo, com cortes de 5 micrômetros de espessura no sentido coronal, bucolingualmente, na região de exodontias dos elementos dentários, entre o primeiro e segundo molares, de forma que se pudesse avaliar as tábuas vestibular/lingual e submetidos à coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). Foram selecionados 6 cortes por lâmina, sendo confeccionadas 2 lâminas por espécime.

Para melhor análise das lâminas, as mesmas foram digitalizadas usando o scanner automático de lâminas Aperio XT e o software Aperio ImageScope Versão 10 (Aperio Technologies, Inc., Vista, CA, EUA).

As análises foram realizadas em dois cortes aleatórios. A área analisada se restringiu a todo tecido localizado 0,15 mm acima do canal mandibular, representando todo tecido peri-alveolar.

No exame histológico, avaliou-se:

- 1- Osso necrótico: Presença de 8 lacunas contíguas vazias (sem osteócitos).
- 2- Quantificação da Osteonecrose: De acordo com a quantidade de osso necrótico no corte. Classificados como "leve" 1-30%, "média" 31 a 60%, "grave" quando ocupa 61 a 100% do corte
- 3- Neoformação óssea: Imagem acidofílica (rosea), de fibras colágenas associadas à fileira de osteoblastos. Caso seja vista no corte, foi classificada como "sim", caso contrário, "não".
- 4- Inflamação: Quantidade de células inflamatórias nos tecidos moles contidos nos cortes (graduada por uma escala visual de - a +++ , onde '-' = ausência, += 1 a 30%; ++ = 31 a 60%; +++: mais de 60% da área da superfície em relação a essa área nos controles positivo e negativo).
- 5- Fibrose: Foi avaliada a região perialveolar da mandíbula e graduada por uma escala visual de - a +++ (onde: - = ausência de fibrose no corte; += 1 a 30% de fibrose; ++ = 31 a 60%; +++: mais de 60% da área da superfície em relação a essa área nos controles).

6- Vascularização: Quantidade de neo vascularização nos tecidos moles contidos nos cortes (graduada por uma escala visual de - a +++ , onde '-' = ausência; += 1 a 30%; ++ = 31 a 60%; +++: mais de 60% da área da superfície em relação a essa área nos controles positivo e negativo).

Figuras 1- Posicionamento do animal na mesa cirúrgica



Figuras 2 e 3- Visão intra bucal de área operatória



4 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

- Foram utilizados os Softwares SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows e o Excel 2010;
- Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança;
- Os resultados estão apresentados em forma de tabela com suas respectivas frequências absoluta e relativa;
- As variáveis numéricas estão representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão;
- Verificar a existência de associação: Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas;
- Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk para variáveis quantitativas ($n < 30$);
- Comparação com mais de 2 grupos: Kruskal Wallis com comparação múltipla de Dunn's (Não Normal);

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO

Artigo a ser enviado ao periódico Oral Disease (Qualis A1 Internacional)

AVALIAÇÃO DO USO DE L-PRF COMPARADO AO LASER DE BAIXA POTÊNCIA, COMO FATOR PREVENTIVO PARA AS LESÕES DE OSTEONECROSE INDUZIDAS POR BISFOSFONATO

RESUMO

OBJETIVO: Este estudo tem como objetivo avaliar o L-PRF como fator preventivo para lesões de Osteonecrose induzidas por bisfosfonatos em ratos após procedimento cirúrgico, sob aspectos clínicos, histológicos e imaginológicos, melhorando a compreensão de sua ação na fisiopatologia da doença com base nos seus efeitos biológicos. **METODOLOGIA:** Foram utilizados 31 ratos, divididos em 4 grupos. Todos os animais receberam injeções intraperitoneais durante 8 semanas (G1- solução salina/ G2, G3 e G4- ácido zolendrônico 0,15mg/kg, 2 ratos foram utilizados como doadores de sangue para confecção da membrana de L-PRF), após as quais os mesmos foram submetidos à cirurgia para exodontia dos primeiros e segundos molares inferiores esquerdos. No momento da cirurgia o grupo G3, recebeu aplicação de dose de laser (PHOTON LASE III- 808 nm/ 100mW 2.2 J 22 seg. cont.) e o grupo G4, membrana de L-PRF. Após 4 semanas, todos os animais foram eutanasiados e submetidos a análises clínica, imaginológica e histológica. Foram utilizados: Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas; Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk para variáveis quantitativas ($n < 30$); Comparação com mais de 2 grupos: Kruskal Wallis com comparação múltipla de Dunn's (Não Normal); **RESULTADO:** O grupo G2 mostrou alta incidência de osteonecrose, com desorganização de trabeculado ósseo e presença de intensa área de necrose ao exame histológico. Os grupos G3 e G4 mostraram resultados mais favoráveis em relação ao grupo G2, com ligeira predominância do grupo G4, porém, não houve diferença significativa em vários parâmetros entre os grupos G3 e G4. **CONCLUSÃO:** A L-PRF foi ligeiramente superior

em alguns parâmetros porém não há evidencia que ele pode ser um fator fundamental para a prevenção da osteonecrose.

Palavras-chave: Osteonecrose de mandíbula por bisfosfonato. L-PRF. Fibrina rica em plaquetas e leucócitos.

INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos são análogos endógenos estáveis do pirofosfato inorgânico e são divididos nas duas classes seguintes, de acordo com suas estruturas químicas e mecanismos de ação: bisfosfonatos não nitrogenados, e bifosfonatos nitrogenados.^{1;2}

Os bisfosfonatos nitrogenados suprimem potencialmente a reabsorção óssea, portanto reduzindo a ocorrência de eventos indesejáveis no esqueleto, como fraturas patológicas e dor associada com doenças malignas ósseas.

Embora o uso de bisfosfonato seja benéfico para o tratamento de câncer e doenças do esqueleto, tem sido relatada Osteonecrose em mandíbula decorrente do seu uso, principalmente em pacientes que foram submetidos a intervenções cirúrgicas dentais, doença periodontal e que receberam corticóide cronicamente.³

A Osteonecrose de mandíbula pode ser descrita tipicamente como a falência da cicatrização de ferida na cavidade oral, ou como severa inflamação periodontal não resolvida, levando à exposição de osso necrótico.⁴

Sugere-se que a etiopatogenia da osteonecrose esteja relacionada a fatores ligados ao funcionamento dos osteoclastos. Os mesmos e seus precursores participam da resolução da inflamação no osso e ao redor dele. Eles também estão envolvidos na angiogênese, expressando fatores angiogênicos nos locais de modelagem e remodelação. A reabsorção óssea osteoclástica é seguida por angiogênese na matriz óssea. A supressão de osteoclastos diminui a angiogênese, enquanto a osteoclastogênese aumenta.⁵

Considerando o papel multifuncional dos osteoclastos, os mesmos suprimidos cronicamente pelos N-BPs teriam ampla influência sobre o ambiente celular no osso. No entanto, os efeitos dessa inibição a longo prazo no ambiente ósseo não foram totalmente esclarecidos.⁵

Howie et al. (2015)⁶ relatam que há um envolvimento da mandíbula em 65% dos casos de osteonecrose, 26% da maxila e ambos em 9%.

Extração dentária parece ser o fator de maior risco para o desenvolvimento de Osteonecrose em pacientes que recebem bisfosfonatos.⁴

Organizações como a AAOMS (associação americana de cirurgiões orais e maxilofaciais) e a Sociedade Americana para Pesquisa de Osso e Mineral (ASBMR) recomendaram abordagens conservadoras para o tratamento de osteonecrose de mandíbula por bisfosfonatos (BRONJ). Essas abordagens incluem o uso de antibióticos, enxaguatórios bucais, antimicrobianos orais e manipulação mínima das lesões, se necessário. Entretanto, a terapia cirúrgica é hoje uma atitude controversa, pois nem sempre é eficaz e resulta em um método invasivo que, em alguns casos, devido a trauma na área tratada, pode agravar a condição necrótica. Por isso, surgiram novas alternativas terapêuticas, como o uso do hormônio teriparatide, laserterapia, uso de oxigênio hiperbárico, ozonioterapia e concentrados de plaquetas.⁷

A fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) foi desenvolvida na França por Choukroun et al (2001), é uma segunda geração de concentrado de plaqueta usado para acelerar a cicatrização de tecido mole e ósseo. Trata-se de uma Matrix de fibrina autóloga contendo uma grande quantidade de plaquetas e citocinas leucocitárias.

A L-PRF não requer nenhum agente gelificante, porque o sangue natural é centrifugado sem adição de produtos químicos. Sua polimerização lenta e natural produz uma arquitetura fibrinosa fisiologicamente favorável com junções equidimensionais e permite a incorporação de plaquetas, leucócitos, citocinas e células-tronco circulantes na rede de fibrina. Isso funciona como uma matriz de cura biológica. As propriedades biológicas são aspectos importantes da L-PRF no controle de seu potencial terapêutico que é relativamente estável. O baixo custo e a facilidade comparativa do procedimento também fazem do L-PRF o mais adequado dos concentrados de plaquetas para uso generalizado.⁸

O presente estudo teve como propósito avaliar o L-PRF como fator preventivo no momento de estabelecimento do trauma (exodontia) em modelo animal, desta forma, avaliar sua ação no equilíbrio do metabolismo ósseo, comparando-o com tratamento de laser já sugerido na literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo do tipo experimental controlado com cegamento *in vivo*. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de

Pernambuco (processo:003/2015). Foram utilizados 31 animais Wistar (*rattus norvegicus albinus*), fêmeas, adultas, com mais de 60 dias de vida, pesando entre 300 a 400 g de massa corporal. Os animais foram mantidos sob condições de luz, temperatura (22 ± 2 °C) e alimentação padrões utilizadas no biotério, com um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos, com 8 animais cada. Vieram a óbito 3 animais, 1 de cada grupo G1, G2 e G3. Dois animais foram utilizados como doadores para preparação do L-PRF.

Tabela 1. Divisão dos grupos e modalidades de intervenções

Semana Grupo (G)	G1 (controle negativo) 7 animais	G2 (Controle positivo) 7 animais	G3 (Laser) 7 animais	G4 (PRF) 8 animais
0	Solução salina 0,9%	ZOMETA	ZOMETA	ZOMETA
4	Solução salina 0,9%	Zometa	ZOMETA	Zometa
8	Solução salina 0,9% + Cirurgia	Zometa+ cirurgia	Zometa+ Cirurgia +Laser	Zometa+ Cirurgia +PRF
12	EUTANÁSIA	EUTANÁSIA	EUTANÁSIA	EUTANÁSIA

Os animais dos grupos G2, G3 e G4 foram submetidos à injeções intraperitoniais do bisfosfonato (Ácido Zolendrônico, Eurofarma, São Paulo, Brasil) na dosagem de 0,15 mg/Kg/semana (Pacheco et al. 2015). O grupo G1 (controles negativos) recebeu injeções, também intraperitoniais, de 0,1ml de solução salina. Desta forma, todos os roedores foram submetidos à administração de ácido zolendrônico ou solução salina uma vez por semana, durante 8 semanas consecutivas (tabela1).

Antes de cada procedimento cirúrgico, os roedores foram pesados e anestesiados com cloridrato de quetamina 1mg/kg associado a xilazina 0,5mg/kg, por via intramuscular. Foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para exodontia dos primeiro e segundo molares inferiores esquerdos, com sindesmótomo (Duflex–SS White, Rio de Janeiro, Brasil), remoção dos fragmentos dentário com pinça halstead mosquito curva 12,5cm (Quinelato, São Paulo, Brasil) e sutura do alvéolo com fio absorvível vicryl 5-0 (Ethicon, São Paulo, Brasil). Todos as cirurgias foram realizadas por um único operador.

Ao final de cada procedimento, os animais do grupo G3 receberam aplicação imediata de laser de baixa intensidade (PHOTON LASE III- 808 nm / 100mW de potência; Dose-2.2 J/cm², durante 22 seg. contínuos em único ponto com área de 1cm²), com ponteira protegida com dispositivo descartável, trocado a cada animal.

Ao final de cada procedimento, os animais do grupo G4 receberam membrana de L-PRF, preparada a partir da punção cardíaca de 6 mls de sangue do animal doador. O material foi colocado em tubo plano e imediatamente centrifugado em 3000rpm por 10 minutos (centrífuga KASV, modelo K14-0815C).

Os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose de anestésico, por via intracardíaca.

Avaliação clínica

Após eutanásia, foi realizada a dissecação dos espécimes, realizando a desarticulação da hemimandíbula na articulação temporo-mandibular e na sínfise, preservando a região de tecido mole perilesional. A peça foi posicionada com ajuda de pinça hemostática e fotografada para captura de detalhes e avaliação clínica.

Os seguintes itens foram analisados por pesquisador cego para os grupos (através das fotos sem identificação), com o objetivo de quantificar e diferenciar os grupos quanto aos tratamentos:

1- Exposição óssea: Presença de solução de continuidade e estrutura óssea propriamente dita

2- Aspecto da cicatrização:

* Cicatrizada: Completo recobrimento epitelial

*Granulação: Sugerindo fase intermediária de cicatrização, com proliferação tecidual abundante e sangrante.

*Ferida aberta: Sugerindo fase inicial de cicatrização, sem progresso para o completo recobrimento epitelial.

3- Secreção: A presença ou não de secreção purulenta, sugerindo infecção

4- Aspecto da mucosa: Dividido em lisa, rugosa ou ulcerada. Sugerindo a densidade celular e remodelação das fibras no processo final de cicatrização

5- Espessura da mucosa: Fina ou espessa. Refletindo a reorganização das fibras, dando maior ou menor resistência ao tecido.

Avaliação de imagem

As imagens dos espécimes foram obtidas através de tomógrafo de terceira geração Nikon XT H 225, operando a 80 kV e 222 μ A, sem filtro, utilizando protocolo com tamanho de voxel de 12 microns (μ) e tempo de exposição de 25 minutos. Posteriormente, as imagens foram reconstruídas utilizando-se o software CTPro (Nikon). As mesmas foram analisadas nas reconstruções multiplanares (axial, sagital e coronal), através do software VGStudioMax 2.2.

Análise qualitativa:

Cada imagem foi analisada através do software ImageJ nos três cortes (axial, coronal e sagital), no perímetro perialveolar dos elementos dentários extraídos, preenchendo os seguintes critérios de avaliação: Presença de sequestro ósseo, quantidade de neoformação óssea, alteração estrutural das trabéculas óssea e erosão da cortical óssea.

Análise quantitativa:

As imagens foram processadas no software ImageJ, para avaliação de padrão de trabeculado ósseo e cálculo de densidade. Todas as imagens (ImageStack) foram transformadas em 32 bit (para avaliação da densidade), diminuídas em seu valor em 1000 HU (visando a transformação da escala para área médica). Nos cortes sagitais foram avaliadas a densidade de ROIs (regiões de interesse) de 40X80 pixels de área, posicionados logo abaixo da parede apical ao longo do defeito ósseo (figura 2). Para confecção do histograma, foram selecionados cortes do início ao fim da região de defeito ósseo (aproximadamente 200 cortes).

Análise histológica

As peças foram processadas para confecção de lâminas histológicas com cortes de 5 micrômetros, para coloração em hematoxilina e eosina. Para melhor análise das lâminas, as mesmas foram digitalizadas usando o scanner automático de lâminas Aperio XT e o software Aperio ImageScope Versão 10 (Aperio Technologies, Inc., Vista, CA, EUA) As análises foram realizadas em dois cortes aleatórios. A área analisada se restringiu à todo tecido localizado 0,15 mm acima do canal mandibular, representando todo tecido peri-alveolar. Todas as lâminas foram analisadas pelo mesmo operador cego seguindo os seguintes critérios:

- 1- Osso necrótico: Presença de e 8 lacunas contíguas vazias (sem osteócitos).
- 2- Quantificação da Osteonecrose: Classificados como "leve" 1-30%, "média" 31 a 60%, "grave" quando ocupa 61 a 100% do corte
- 3- Neoformação óssea: Imagem acidofílica (rosea), de fibras colágenas associadas à fileira de osteoblastos. Caso seja vista no corte, foi classificada como "sim", caso contrário, "não".
- 4- Inflamação: Quantidade de células inflamatórias nos tecidos moles contidos nos cortes (graduada por uma escala visual de - a +++ , onde '-' = ausência, += 1 a 30%; ++ = 31 a 60%; +++: mais de 60% da área da superfície em relação a essa área nos controles positivo e negativo).
- 5- Fibrose: Foi avaliada a região peri-alveolar da mandíbula e graduada por uma escala visual de - a +++ (onde:- = ausência de fibrose no corte; += 1 a 30% de fibrose; ++ = 31 a 60%; +++: mais de 60% da área da superfície em relação a essa área nos controles).
- 6- Vascularização: Graduada por uma escala visual de - a +++ , onde '-' = ausência; += 1 a 30%; ++ = 31 a 60%; +++: mais de 60% da área da superfície em relação a essa área nos controles positivo e negativo.

Análise estatística

- Foram utilizados os Softwares SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows e o Excel 2010;
- Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança;

- Os resultados estão apresentados em forma de tabela com suas respectivas frequências absoluta e relativa;
- As variáveis numéricas estão representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão;
- Verificar a existência de associação: Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas;
- Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk para variáveis quantitativas ($n < 30$);
- Comparação com mais de 2 grupos: Kruskal Wallis com comparação múltipla de Dunn's (Não Normal);

RESULTADOS

Em geral, os animais toleraram bem o procedimento e demonstraram boa hemostasia e recuperação rápida da anestesia. Exceto três animais que vieram a óbito, sendo 1 de cada grupo G1, G2 e G3, após procedimento cirúrgico, provavelmente por complicações anestésicas.

Análise clínica:

Os grupos G2 e G3 apresentaram exposição óssea clinicamente detectável, respectivamente em 85,7% e 28,6% da amostra, contra nenhuma exposição nos grupos G1 e G4. Houve diferença significativa entre os grupos G1 e G2 e entre os grupos G2 e G4. No que diz respeito ao aspecto da cicatrização, os grupos G1 e G4 apresentaram melhores resultados, tendo a ferida classificada como “cicatrizada” em respectivamente 85,7% e 87,5% da amostra e o grupo G2 com piores resultados, apresentando “ferida aberta” em 85,7% dos casos. Assim como no que diz respeito a “espessura da mucosa” com os grupos G1 e G4 apresentando-se com mucosa “espessa” e firme em 85,7% e 75% (respectivamente) e os grupos G2 e G3 com mucosa “fina” e friável em 85,7% e 71,4% da amostra respectivamente. A maioria da amostra do grupo G1(57,1%) teve o aspecto da mucosa classificado como “liso”, enquanto do grupo G2, a maioria (71,4%) classificado como “ulcerada”. Apenas 1 animal apresentou abscesso extra bucal, sendo este do grupo G2 (Figuras 1, 2, 3 e 4) (Tabela 2).

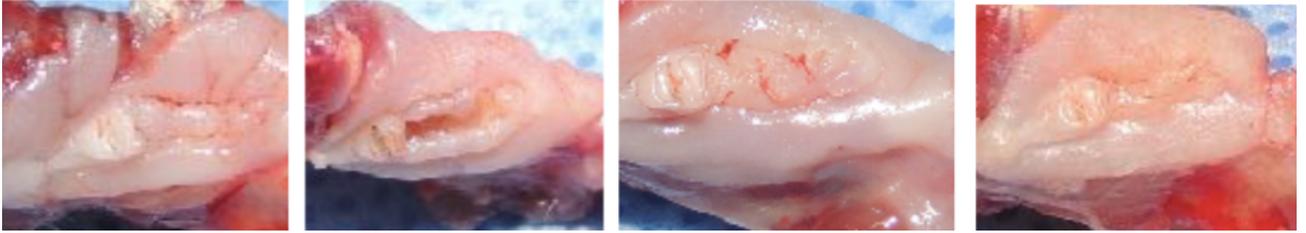
Análise de imagens:

O grupo G2 apresentou imagem compatível com sequestro ósseo em 100% da amostra, além de alteração estrutural das trabéculas, sendo em sua maioria uma alteração intensa (57,1%) e moderada (42,9%). Houve diferença significativa entre os grupos G1 e G2, G2 e G3 e G2 e G4. Do grupo G4, apenas 12,5% da amostra apresentou alteração, sendo considerada leve. Os demais grupos não apresentaram sequestro ósseo ou alteração do trabeculado. Apenas o grupo G2 apresentou imagem compatível com erosão da cortical óssea (71,4%) (Figuras 5, 6,7 e 8) (Tabela 3). Foram observadas alterações de radiodensidades, com valores menores nos animais com lesões compatíveis com osteonecrose (Tabela 3).

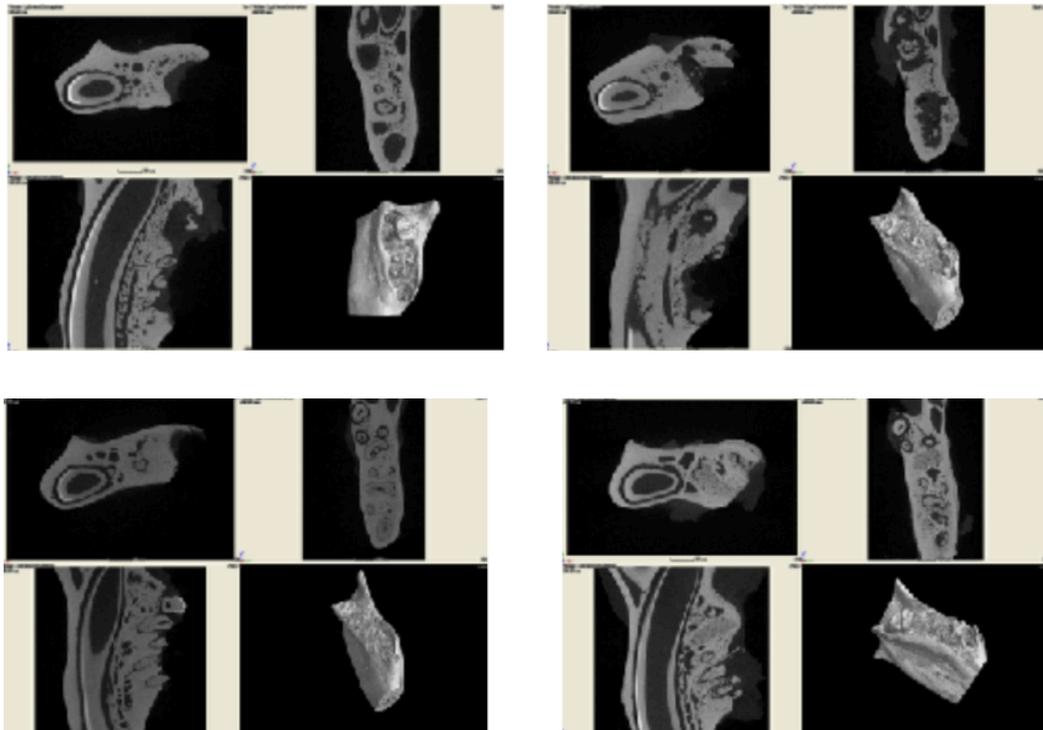
Análise histológica:

Todos os grupos apresentaram imagens compatíveis com neoformação óssea, sendo esta encontrada em 100% das amostras dos grupos G1 e G4, 85,7% do grupo G3 e 14,3% do grupo G2. Houve diferença significativa entre os grupos G1 e G2 e G2 e G4. O grupo G2 apresentou 100% de osso necrótico detectável histologicamente, sendo 42,9% classificado como leve, 42,9% como intenso e 14,3% como moderado. Houve diferença significativa entre os grupos G1 e G2, G2 e G3 e G2 e G4. Com relação a neo -vascularização, foi considerada mais intensa em 75% do grupo G4, mais moderada em 42,9% dos grupos G2 e mais leve em 57,1% dos grupos G1 e G3. O aspecto histológico de fibrose não foi encontrado em 57,1% do grupo G1, contra 0% nos demais grupos, onde a fibrose foi considerada intensa em 42,9% no grupo G2 e leve em 85,7% e 87,5% nos grupos G3 e G4 respectivamente. A reação inflamatória local foi considerada intensa em 57,1% do grupo G2 e leve em 85,7%, 75% e 71,4% nos grupos G1, G4 e G3, respectivamente (Tabela 4) (Figuras 9,10,11 e 12).

Figura 1, 2, 3 e 4- Peça para análise clínica respectivamente- G 1,2,3 e 4



Figuras 5, 6, 7, 8- Imagens microtomográficas respectivamente G1, 2, 3 e 4



Figuras 9, 10, 11 e 12- Imagens histológicas respectivamente G1, 2, 3 e 4

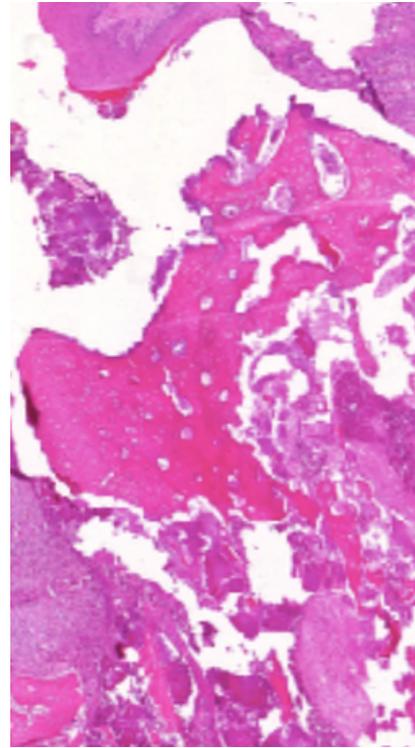
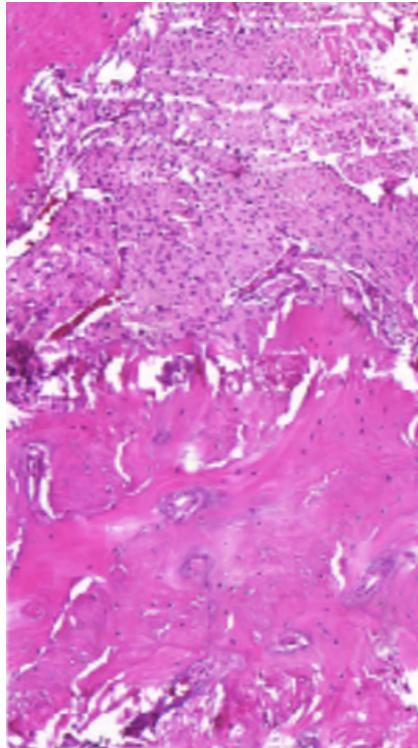
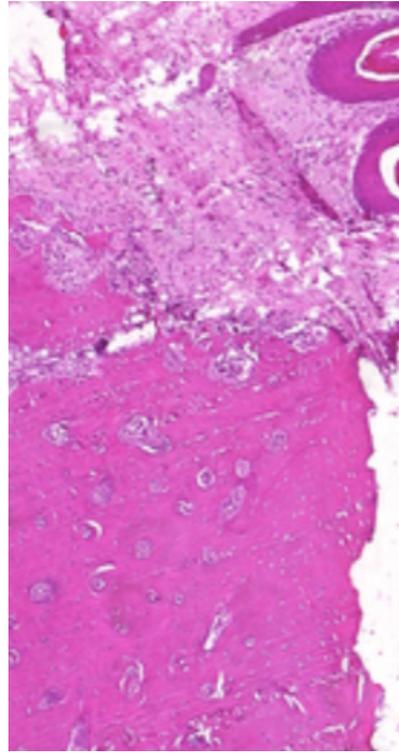
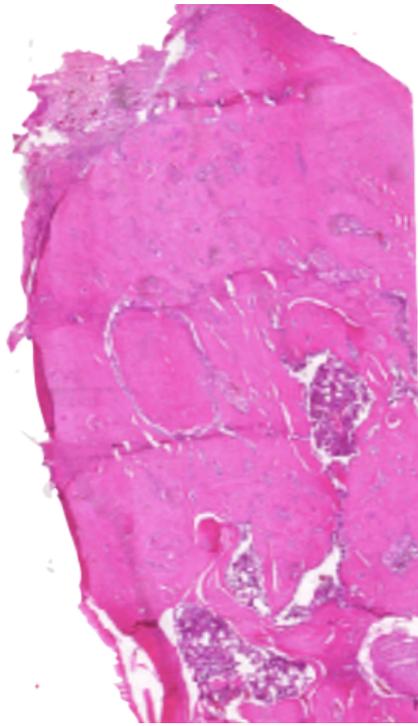


Tabela 2 – Análise de dados clínicos

Clínico	Grupos				p-valor *
	G1 n (%)	G2 n (%)	G3 n (%)	G4 n (%)	
Exposição óssea					
Sim	0 (0,0)	6 (85,7) ^A	2 (28,6)	0 (0,0) ^B	< 0,001
Não	7 (100,0)	1 (14,3)	5 (71,4)	8 (100,0)	
Aspecto da cicatrização					
Cictrizada	6 (85,7)	0 (0,0) ^A	3 (42,9) ^B	7 (87,5) ^B	< 0,001
Granulação	1 (14,3)	1 (14,3)	3 (42,9)	1 (12,5)	
Ferida aberta	0 (0,0)	6 (85,7)	1 (14,2)	0 (0,0)	
Secreção					
Sim	0 (0,0)	2 (28,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,155
Não	7 (100,0)	5 (71,4)	7 (100,0)	8 (100,0)	
Aspecto da mucosa					
Lisa	4 (57,1)	0 (0,0) ^A	1 (14,3) ^B	4 (50,0) ^B	0,002
Rugosa	3 (42,9)	2 (28,6)	6 (85,7)	4 (50,0)	
Ulcerada	0 (0,0)	5 (71,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Espessura da mucosa					
Espessa	6 (85,7)	1 (14,3) ^A	2 (28,6)	6 (75,0) ^B	0,020
Fina	1 (14,3)	6 (85,7)	5 (71,4)	2 (25,0)	

(*) Teste Exato de Fisher

(A) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 1

(B) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 2

Tabela 3 – Análise de dados tomográficos

Imagem	Grupos				p-valor *
	G1 n (%)	G2 n (%)	G3 n (%)	G4 n (%)	
Sequestro ósseo					
Sim	0 (0,0)	7 (100,0) ^A	0 (0,0) ^B	0 (0,0) ^B	< 0,001
Não	7 (100,0)	0 (0,0)	7 (100,0)	8 (100,0)	
Alteração estrutural das trabéculas					
Não	7 (100,0)	0 (0,0) ^A	7 (100,0) ^B	7 (85,7) ^B	< 0,001
Leve	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	
Moderada	0 (0,0)	3 (42,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Intensa	0 (0,0)	4 (57,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Erosão da cortical óssea					
Sim	0 (0,0)	5 (71,4) ^A	0 (0,0) ^B	0 (0,0) ^B	0,001
Não	7 (100,0)	2 (28,6)	7 (100,0)	8 (100,0)	

(*) Teste Exato de Fisher

(A) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 1

(B) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 2

Tabela 4 – Análise de dados histológicos

Histológico	Grupos				p-valor *
	G1 n (%)	G2 n (%)	G3 n (%)	G4 n (%)	
Neoformação óssea					
Sim	7 (100,0)	1 (14,3) ^A	6 (85,7) ^B	8 (100,0) ^B	< 0,001
Não	0 (0,0)	6 (85,7)	1 (14,3)	0 (0,0)	
Ossos necróticos					
Não	7 (100,0)	0 (0,0) ^A	6 (85,7) ^B	7 (87,5) ^B	< 0,001
Leve	0 (0,0)	3 (42,9)	1 (14,3)	0 (0,0)	
Moderada	0 (0,0)	1 (14,2)	0 (0,0)	1 (12,5)	
Intensa	0 (0,0)	3 (42,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Vascularização					
Leve	4 (57,1)	3 (42,9)	4 (57,1)	1 (12,5) ^A	0,060
Moderada	3 (42,9)	3 (42,9)	1 (14,3)	1 (12,5)	
Intensa	0 (0,0)	1 (14,2)	2 (28,6)	6 (75,0)	
Fibrose					
Sem alteração	4 (57,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0) ^{AB}	0,003
Leve	2 (28,6)	2 (28,6)	6 (85,7)	7 (87,5)	
Moderada	1 (14,3)	2 (28,6)	1 (14,3)	1 (12,5)	
Intensa	0 (0,0)	3 (42,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Inflamação					
Leve	6 (85,7)	3 (42,9)	5 (71,4)	6 (75,0)	0,090
Moderada	1 (14,3)	0 (0,0)	2 (28,6)	1 (12,5)	
Intensa	0 (0,0)	4 (57,1)	0 (0,0)	1 (12,5)	

(*) Teste Exato de Fisher

(A) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 1

(B) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 2

Tabela 5 – Análise de dados objetivos de imagem

Variáveis	Grupos			
	G1 Média ± DP	G2 Média ± DP	G3 Média ± DP	G4 Média ± DP
Radiodensidade	3845,43 ± 326,12	3158,43 ± 415,28 ^A	3777,86 ± 193,40 ^B	3798,50 ± 74,00
Espessura trabecular - TB, TH (mm)	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,10
Número de trabéculas - TB,N (1/mm)	0,51 ± 0,40	0,32 ± 0,32	0,03 ± 0,03 ^{AB}	0,24 ± 0,29
Separação entre as trabéculas- TB, SP (mm)	0,36 ± 0,07	0,47 ± 0,13	0,48 ± 0,02 ^A	0,33 ± 0,07

(*) Teste Kruskal-Wallis

(A) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 1

(B) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 2

(C) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 3

DISCUSSÃO

Avaliar os resultados do tratamento de BRONJ é difícil, especialmente por duas razões. A primeira razão é que não existe uma definição universalmente aceita de sucesso no tratamento do BRONJ, e o segundo motivo é a falta de ensaios clínicos controlados sobre o assunto.

Sabe-se que a osteonecrose por bisfosfonato uma vez instalada, é de difícil manejo, logo, a literatura enfatiza a necessidade de tratamento preventivo, como primeira estratégia para evitar a instalação do processo em pacientes em uso de bisfosfonato. O presente estudo fez uso da L-PRF, já citada na literatura, porém com uma abordagem preventiva, associada ao principal fator de risco para o desenvolvimento da osteonecrose, a exodontia, em estudo experimental, dando a possibilidade de análise dos aspectos clínico, imaginológico e histológico dos tecidos ósseo e mucoso e assim melhor entendimento da fisiopatogenia da doença.

O ácido zoledrônico é um bisfosfonato para uso intravenoso, com a maior potência relativa nesse grupo farmacológico e, portanto, um dos BPs mais associado ao desenvolvimento de osteonecrose e é também um dos mais usados em modelos experimentais animais, por este motivo optamos por utilizar este fármaco no nosso estudo.^{1;2;3;4;5;9;10;11;12;13;14;15;16;17;18;19}

O presente estudo optou pela utilização prévia (8 semanas) até o momento da cirurgia, seguido do cessamento da medicação a partir daí para todos os grupos, para entender se pacientes que fazem uso dessa medicação poderiam, na necessidade de procedimento cirúrgico, fazer uso de fator protetor, junto com a suspensão da droga. Pode-se considerar o protocolo utilizado neste estudo, para mimetizar uma situação de osteonecrose, eficaz, visto que, no que diz respeito à exposição óssea, principal fator diagnóstico clínico de osteonecrose, obteve-se na pesquisa 85,7% no grupo controle positivo (G2), contra 0% no grupo controle negativo (G1), diferença estatisticamente significativa.

No presente estudo, o aspecto da cicatrização da mucosa mostrou-se mais favorável nos grupos G1 e G4. Houve diferença estatisticamente significativa entre a cicatrização detectável clinicamente entre os grupos G1 e G2 e entre os grupos G2 e G4. Embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos G3 e G4,

conseguimos ver a resposta cicatricial mais favorável sob os tecidos moles no grupo G4, onde 87,5% do grupo teve a mucosa classificada como cicatrizada. Com relação ao aspecto da mucosa, vimos que o percentual do grupo G4 (50%), foi comparável ao do grupo G1(57,1%), sugerindo um processo mais organizado de cicatrização. Enquanto o grupo G2 apresentou o maior percentual de mucosa ulcerada (71,4%). Resultado comparável foi visto quanto à espessura da mucosa, estando os grupo G1 (85,7%) e G4 (75%) com percentuais comparáveis, apresentando a maioria de sua amostra classificada como firme e espessa.

Bianchi et al. (2007)²⁰ estudaram a osteonecrose da mandíbula associada a bisfosfonatos em relação às características radiográficas, demográficas e clínicas. Enfatizam que tanto a reação periosteal, quanto a presença de sequestros podem ser relevantes, como características constantes em lesões mais extensas de osteonecrose. Nas análises de imagem do presente estudo, viu-se que o sequestro ósseo só foi detectado na microCT no grupo G2 (100%). Assim como foi relevante e com visível diferença do grupo G2 para demais grupos da alteração da estrutura trabecular (57,1% da amostra com alteração intensa) e da presença de erosão da cortical óssea (71,4%). Fica evidente a presença de osteonecrose neste grupo, sendo compatíveis os aspectos clínicos com os tomográficos. Nota-se que o grau de desorganização do trabeculado ósseo mostra-se intenso sendo compatível com o aspecto clínico. A intervenção cirúrgica realizada neste grupo, com doses máximas da medicação e sem nenhum fator protetor, provavelmente levaram a algum atraso nas fases iniciais do reparo ósseo. A diminuição do suprimento sanguíneo prejudicaram a migração de células endoteliais e levaram à angiogênese suprimida. A ausência de suprimento sanguíneo adequado dificulta a migração de células inflamatórias para o alvéolo, bem como o processo de coagulação e a construção de uma matriz que forneceria suporte ao processo de reparo ósseo. Esses fenômenos retardam a formação de uma nova matriz óssea e aumentam a suscetibilidade à infecção (apenas o grupo G2 apresentou secreção purulenta- 28,6%).^{18;21;22;23;24}

A imagem não invasiva representa uma ferramenta promissora para o diagnóstico precoce dessa condição, mas seu desenvolvimento é limitado pelo fato de que muito pouco se sabe sobre alterações de densidade associada à BRONJ. A própria literatura é divergente no que diz respeito ao aumento ou diminuição da densidade óssea, provavelmente frente a diversas possibilidades apresentadas nesta patologia no que diz respeito a áreas de reabsorção/ esclerose óssea. Embora a

presença de regiões de alta densidade seja um biomarcador ideal para imagens não invasivas e sendo considerada eficaz em alguns casos, Allen e Ruggiero (2014)²⁵ propõem que a diferença na densidade pode ser útil para sinalizar risco potencial para BRONJ, mas a ausência de tais mudanças não seria um meio confiável para excluir um paciente.²⁵

No presente trabalho, conseguiu-se destacar a média de radiodensidade maior no grupo G1 e menor no grupo G2, ficando os grupos G3 e G4, com valores intermediários e próximos. Sugere-se que isto se deve ao fato da osteonecrose se apresentar com um padrão bastante destrutivo do trabeculado ósseo e não serem vistas áreas de esclerose óssea neste estudo como sugerido por alguns trabalhos na literatura, talvez ao fato da esclerose óssea estar presente em fase determinada da osteonecrose, diferente da trabalhada pelo presente estudo e não determinada pela literatura.¹⁸ Outros parâmetros sugeridos foram destacados: Espessura das trabéculas com média maior no grupo G4, porém sem diferença significativa. Número de trabéculas e separação entre as trabéculas com diferenças significativas entre os grupos G3 e G4. Com resultados positivos para o grupo G4.

Pode-se observar a grande presença de osso necrótico em dados histológicos do grupo G2, sendo compatível com achados clínicos e microtomográficos. Porém notou-se a presença de osso necrótico em 14,3% da amostra do grupo G3 e em 12,5% da amostra do grupo G4, quando dados imaginológicos e clínicos não puderam comprovar sua presença. Em um estudo experimental de Zandi et al. (2015)²⁶, avaliando o efeito da interrupção do bisfosfonato quando da realização de procedimento cirúrgico na incidência e gravidade da BRONJ, foram observados muitos casos de osteonecrose histológica sem sinais clínicos de exposição óssea ou fístula, ou imagens compatíveis.

Maior frequência de vascularização intensa foi vista no grupo G4. A base racional para o emprego de L-PRF em pacientes afetados por BRONJ se baseia na suposição de que a alta concentração de fatores de crescimento, representa uma estimulação potente para a reparação óssea obtida através de moléculas do próprio paciente e imitando os processos fisiológicos.

Todos os grupos apresentaram sinais histológicos de fibrose, tendo os grupos G3 e G4 a maioria das suas amostras classificadas como com fibrose leve (85,7% e 87,5% respectivamente) e do grupo G2 como intensa (42,9%), sugerindo que a fibrose pode ser inversamente proporcional à neoformação óssea, uma vez que no grupo G2,

apresentou-se com apenas 14,3% de neoformação óssea. É provável que haja a invaginação do tecido sobre o alvéolo dentário e, conseqüentemente, diminuição de osso neoformado. No que diz respeito à presença de células inflamatórias, pode-se observar um padrão de células crônicas, sugerindo que essas amostras tenham sido avaliadas numa fase não tão próximas do reparo inicial. Presença de inflamação mais intensa foi encontrada no grupo G2, corroborando com os demais achados.

Investigações focadas no sistema RANK / RANKL / OPG na osteoclastogênese contribuíram muito para o conhecimento sobre os processos de renovação óssea. RANK, expresso em precursores de osteoclastos, liga-se ao ativador de receptores do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL), expresso na membrana dos osteoblastos e células estromais, e desempenha um papel importante na diferenciação e ativação dos osteoclastos. A osteoprotegerina (OPG) inibe esse processo ao se ligar ao RANKL. A superexpressão de RANK e / ou RANKL tem sido observada em várias doenças ósseas, como osteoporose, metástase esquelética e tumores odontogênicos^{11,12,13} e em condições com maior atividade osteolítica.

O presente estudo apresentou alguns pontos bastante relevantes, como a possibilidade de um modelo animal de osteonecrose reprodutível e eficaz, visto que o grupo controle positivo (G2) apresentou várias características compatíveis com processo de osteonecrose. Porém, há a necessidade de se citar a dificuldade de se trabalhar com modelo animal no que diz respeito à tamanho da amostra, repetição de procedimentos, perda de animais, dificuldade operacional de alguns procedimentos pouco usuais (coleta de sangue para produção do L-PRF/ exodontias- presença de raízes), além da falta de padronização da posologia do bisfosfonato para este grupo e do protocolo da centrífuga para preparo do L-PRF em ratos.

Conseguiu-se ver a superioridade de ambos os protocolos preventivos sobre o grupo controle positivo, com ligeira superioridade do grupo que fez uso do L-PRF sobre o laser porém com poucos resultados significativos entre grupos. Destaca-se também a dificuldade em encontrar parâmetros reprodutíveis e mais objetivos de análises de imagem e histológico. Fica evidente a melhora dos tecidos moles de recobrimento com o uso de fatores de proteção no momento da exodontia (fator precipitante), porém não há evidencia de que a ação tanto do laser como do L-PRF altere a fisiopatologia da doença, embora a literatura traga teorias a respeito.

É sabido que o laser de baixa potência tem sido um tratamento adjunto promissor para BRONJ, devido a sua habilidade para modular o metabolismo celular, melhorando a cicatrização das feridas e diminuindo a dor. O efeito bioestimulante se expandiria até a matriz óssea e aumentaria o índice mitótico dos osteoblastos, estimulando sua proliferação e diferenciação. Isso aumenta o número de células osteoblásticas diferenciadas e aumenta sua atividade assim como acelera a formação óssea. Em adição, LLLT é um método não invasivo com efeito antibacteriano e bioestimulante em tecido mole e ósseo e é pro-angiogênico.²⁷

Destaca-se também algumas características do L-PRF que se destacam sobre os demais métodos preventivos para osteonecrose presentes na literatura, dentre elas, fácil manejo da técnica, baixo custo, servir como membrana de recobrimento, visível ação sobre os tecidos moles. Logo, o fato do L-PRF agir em três etapas significativas de recuperação e maturação dos tecidos moles: angiogênese, controle imunológico e fechamento epitelial, faz com que ele atue na promoção de neoformação óssea, pelo ato de proteger a área anatômica da invasão de outros tecidos, como o tecido conjuntivo, e gerar novo tecido ósseo nessa área (ROG-regeneração óssea guiada).^{26;28;29;30}

Por fim Fabbro et al. (2012)³¹, em uma revisão sistemática destacam que, em pacientes sob bisfosfonatos, o uso de concentrados de plaquetas sempre deve estar associado a qualquer tratamento de cirurgia oral, a fim de melhorar a cicatrização tecidual e reduzir o risco de eventos adversos relacionados aos bisfosfonatos.

As exodontias dos primeiro e segundo molares inferiores esquerdos foi o fator escolhido como desencadeante da Osteonecrose, mas aqui destaca-se a dificuldade na realização do procedimento, tendo o presente estudo 100% de frequência de restos radiculares, vistos tanto no exame de imagem quanto no histológico. Pacheco et al. (2015)¹⁸ citam a limitação metodológica desse modelo envolvida com a característica anatômica dos molares desse animal. O qual é composto por 5 raízes divergentes. Os mesmos ainda relatam que a fratura de raízes ocorreu em todos os animais do grupo controle e de grupo experimental que se submeteram ao procedimento cirúrgico no seu estudo. Houve dificuldade também de se estabelecer os critérios clínicos, histológicos e de imagem, visto que usualmente estudos são desenvolvidos apenas com um desses parâmetros e com diversos critérios diferentes. Barba-recreo et al. (2014)¹² citam que a alta heterogeneidade dos critérios BRONJ utilizados entre os modelos animais torna difícil compará-los e dificulta a avaliação dos tratamentos

aplicados. Portanto, corrobora-se que um “critério mínimo de BRONJ” em animais, incluindo achados histológicos e de imagem, deve ser desenvolvido.

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que o L-PRF promoveu uma boa recuperação do tecido de recobrimento da ferida causada pelo fator de risco de osteonecrose, assim como obtivemos bons resultados relacionados a evolução da recuperação dos animais submetidos a procedimentos cirúrgicos, em uso de bisfosfonato, com vantagens sobre outro método já utilizado na prática clínica, porém não há como afirmar que este estudo traz evidencia científica que o uso do L-PRF seria um fator mandatório como protocolo preventivo. Podemos comprovar entretanto que não há malefícios de seu uso.

REFERÊNCIAS

- Abdullah WA. Evaluation of bone regenerative capacity in rats claverial bone defect using platelet rich fibrin with and without beta tri calcium phosphate bone graft material. *The Saudi Dental Journal*. 2016; 28,109–117.
- Aghaloo TL et al. Periodontal Disease and Bisphosphonates Induce Osteonecrosis of the Jaws in the Rat. *J Bone Miner Res*. 2011; 26(8):1871–1882.
- Aguirre JI et al. Oncologic Doses of Zoledronic Acid Induce Osteonecrosis of the Jaw-Like Lesions in Rice Rats (*Oryzomys Palustris*) with Periodontitis. *J Bone Miner Res*. 2012; 27(10): 2130–2143.
- Ali-Erdem M et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: Animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16 (7):879-83.
- Allen MR, Ruggiero SL. Higher Bone Matrix Density Exists in Only a Subset of Patients With Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67:1373-1377.
- Asaka T et al. Platelet-rich fibrin may reduce the risk of delayed recovery in tooth-extracted patients undergoing oral bisphosphonate therapy: a trial study. *Clin Oral Invest*. 2016.
- Atalay B et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis: laser-assisted surgical treatment or conventional surgery? *Lasers Med Sci*. 2011; 26:815–823.
- Barba-Recreo P et al. Zoledronic acid e Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2014; 42: 744-750.
- Bedogni A, Blandamura S, Lokmic Z: Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105: 358–364.
- Berenson JR, Hillner BE, Kyle RA, et al: American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines: The role of bisphosphonates in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 20:3719, 2002
- Bianchi SD et al. Computerized tomographic findings in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:249-58.

Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, et al: Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 350:1189, 2004

Breik O et al.: Is there a role for pentoxifylline and tocopherol in the management of advanced osteoradionecrosis of the jaws with pathological fractures? Case reports and review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2019; 48(8):1022-1027.

Brito LNS et al. Immunohistochemical Analysis of Galectins-1, -3, and -7 in Periapical Granulomas, Radicular Cysts, and Residual Radicular Cysts. *American Association of Endodontists*. 2018;1-6.

Brown JJ, Ramalingam L, Zacharin MR: Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Does it occur in children? *Clin Endocrinol (Oxf)* 68:863, 2008

Cano-Durán JA et al. The role of Leucocyte-rich and platelet-rich fibrin (L-PRF) in the treatment of the medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). *J Clin Exp Dent*. 2017;9(8):1051-9.

Chen YL et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells embedded in platelet-rich fibrin scaffolds promote angiogenesis, preserve heart function, and reduce left ventricular remodeling in rat acute myocardial infarction. *Am J Transl Res* 2015;7(5):781-803.

Choukroun J, Miron RJ. *Fibrina rica em plaquetas na odontologia e medicina regenerativa e estética*. São Paulo: quintessence editora, 2018.

Curi MM et al. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws—An Initial Case Series Report of Treatment Combining Partial Bone Resection and Autologous Platelet-Rich Plasma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69:2465-2472.

Curra C et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw. Introduction of a new modified experimental model. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2016;31(5):308-313.

Dietrich F et al. Platelet-Rich Fibrin Promotes an Accelerated Healing of Achilles Tendon When Compared to Platelet-Rich Plasma in Rat. *J Plast Surg*. 2015;4(2):101-109.

Dincăn O et al. Clinical and histopathological studies using fibrin-rich plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Rom J Morphol Embryol*. 2014;55(3):961–964.

Du J et al. Platelet-rich fibrin/aspirin complex promotes alveolar bone regeneration in periodontal defect in rats. *J Periodont Res*. 2017;1–10.

Dülgeroglu TC; MeTineren H. Evaluation of the Effect of Platelet-Rich Fibrin on Long Bone Healing: An Experimental Rat Model. *Orthopedics*. 2017;40(3):479-484.

Ensari N et al. The effect of platelet-rich fibrin membrane on the repair of perforated tympanic membrane: an experimental study *Acta Oto-Laryngologica*. 2017.

Ersan N et al. Teriparatide and the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a rat model. *Dentomaxillofacial Radiology*. 2014;43.

Fabbro MD; Gallesio G; Mozzati M. Autologous platelet concentrates for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw treatment and prevention. A systematic review of the literature. *Eur J Cancer*. 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2014.10.015>

Giraud E, Inoue M, Hanahan D: An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest* 114:623, 2004

Guarneri et al: Bevacizumab and osteonecrosis of the jaw: Incidence and association with bisphosphonate therapy in three large prospective trials in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 122:181, 2010

Haderslev et al: Alendronate increases lumbar spine bone mineral density in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 119:639, 2000 //19.

Hamdan et al. Platelet-poor plasma stimulates the proliferation but inhibits the differentiation of rat osteoblastic cells in vitro. *Clin. Oral Impl. Res*. 2009;20:616–623.

Hasan S, Weinberg M, Khatib O, Jazrawi L, Strauss E. J. The Effect of Platelet-rich Fibrin Matrix on Rotator Cuff Healing in a Rat Model. *Int J Sports Med*. 2016;37:36–42.

Hohnecker JA: Novartis "Dear Doctor" precautions added to label of Aredia and Zometa. September 24, 2004

Hokugo A et al. Increased Prevalence of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw with Vitamin D Deficiency in Rats. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010; 25(6):1337–1349.

Honda H et al. Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in *Rattus norvegicus* calvaria defect model. *J Artif Organs*. 2012.

Howie RN et al. A Model for Osteonecrosis of the Jaw with Zoledronate Treatment following Repeated Major Trauma. *PLoS ONE*. 2015;10(7).

[http://www.foa.unesp.br/include/arquivos/foa/dppc/files/Patologia%20Gera
l/reparacao-dos-tecidos-bucais.pdf](http://www.foa.unesp.br/include/arquivos/foa/dppc/files/Patologia%20Gera%20l/reparacao-dos-tecidos-bucais.pdf)

Kademani D, Koka S, Lacy MQ: Primary surgical therapy for osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy. *Mayo Clin Proc* 81:1100, 2006

Kaibuchi N et al. Multipotent mesenchymal stromal cell sheet therapy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a rat model. *Acta Biomaterialia* (2016) 42 400–410. g. 2019.

Kang et al. Periapical Disease and Bisphosphonates Induce Osteonecrosis of the Jaws in Mice. *J Bone Miner Res.* 2013;28(7):1631–1640.

Kim JW; Kim SJ; Kim MR. Leucocyte-rich and platelet-rich fibrin for the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a prospective feasibility study. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2014;52:854–859.

Kolpakova ME et al. Experimental model of osteonecrosis of the jaw in rats treated with zoledronic acid. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2017;55:156–159.

Kuhl S, Walter C, Acham S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws – a review. *Oral Oncol* 2012;48:938–47.

Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Koloutsos G,: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: A case-control study of risk factors in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 26: 4634, 2008

Li Q et al.: Lyophilized Platelet-Rich Fibrin (PRF) Promotes Craniofacial Bone Regeneration through Runx2. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:8509-8525.

Lichtenfels et al.: Effect Of Platelet Rich Plasma And Platelet Rich Fibrin On Sciatic Nerve Regeneration In A Rat Model. *Inc. Microsurgery.* 2013;33:383–390.

Luft L. *Perdas e ganhos.* 32 ed. Rio de Janeiro: Record, 2009.

Luomanen M; Alaluusua S. Treatment of bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws with Nd:YAG laser biostimulation. *Lasers Med Sci.* 2012;27:251–255.

Lyons AJ, Brennan PA: Pentoxifylline - a review of its use in osteoradionecrosis *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2017;55(3):230-23

Magremanne M, Reychler H: Pentoxifylline and tocopherol in the treatment of yearly zoledronic acid-related osteonecrosis of the jaw in a corticosteroid-induced osteoporosis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014: 72(2):334-7.

Maluf G et al. Surgery Combined with LPRF in Denosumab Osteonecrosis of the Jaw: Case Report. *Brazilian Dental Journal.* 2016;27(3):353-358.

Maluf G; Santos PSS; Caldas RJ. The use of leukocyte-and platelet-rich fibrin (LPRF) in the treatment of medication- related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2017.

Maluf G; Santos PSS. A Utilização Do Lprf (Fibrina Rico Em Plaquetas E Leucócitos) No Tratamento Da Osteonecrose Dos Maxilares Associada A

Medicamentos (Omam) Em Paciente Com Pancitopenia. Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2016

Martins MAT et al. Association of laser phototherapy with PRP improves healing of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in cancer patients: A preliminary study. *Oral Oncology*. 2012;48:79–84.

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

Molon RS et al. OPG-Fc but Not Zoledronic Acid Discontinuation Reverses Osteonecrosis of the Jaws (ONJ) in Mice. *J Bone Miner Res.*2015;30(9):1627–1640.

Molon RS et al. Spontaneous Osteonecrosis of the Jaws in the Maxilla of Mice on Antiresorptive Treatment: A Novel ONJ Mouse Model. *Bone*. 2014;68:11–19.

Montague R, Hart CA, George NJ: Differential inhibition of invasion and proliferation by bisphosphonates: Anti- metastatic potential of zoledronic acid in prostate cancer. *EurUrol* 46:389, 2004

Mozzati M, Arata V, Gallesio G. Tooth extraction in patients on zoledronic acid therapy. *Oral Oncol* 2012;48:817–21.

Nørholt SE; Hartlev J. Surgical treatment of osteonecrosis of the jaw with the use of platelet-rich fibrin: a prospective study of 15 patients. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2016.

Oh JS, Kim SG. Collagen sponge and rhBMP-2 improve socket healing in rats treated with zoledronic acid. *Braz. Oral Res.* 2017.

Oliveira MR, Silva AC, Ferreira S, Avelino CC, Garcia Jr IR, Mariano RC. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2014.

Otto Sven. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws. Germany: Springer, 2015.

Owosho AA, Estilo CL, Huryn JM3, Yom SK. Pentoxifylline and tocopherol in the management of cancer patients with medication-related osteonecrosis of the jaw: an observational retrospective study of initial case series. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;122(4):455-9.

Pacheco VN et al. Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in rats – a blind randomized controlled trial. *Int. J. Exp. Pathol*. 2015;96:255–260.

Park JH et al.: Does the addition of bone morphogenetic protein-2 to platelet-rich fibrin improve healing after treatment for medication-related osteonecrosis of the jaw? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2016.

Peixoto RF et al.: Immunohistochemical analysis of FoxP3⁺ cells in periapical granulomas and radicular cysts. *archives of oral biology*. 2012;57:1159–1164.

Ruggiero et al American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72:1938-1956.

Ruggiero ET AL Osteonecrosis of the Jaws Associated With the Use of Bisphosphonates: A Review of 63 Cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62:527-534.

Rupel K, Ottaviani G, Gobbo M, et al. A systematic review of therapeutical approaches in bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Oncol* [in press]. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.08.016.

Saad F, Brown JE, Van Poznak C, et al: Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: Integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol* 23:1341, 2012

Sarasquete ME, González M, San Miguel JF, García-Sanz R. Bisphosphonate-related osteonecrosis: genetic and acquired risk factors *Oral Dis* 2009;15:382–7.

Silva JSP et al. Genetic predisposition for medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*

Sarkarat F et al. Platelet-rich plasma in treatment of zoledronic acid-induced bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws. *Trauma Mon*. 2014;19(2):17196.

Senses F et al.: Effect of Platelet-Rich Fibrin on Peripheral Nerve Regeneration. *J Craniofac Surg* 2016;27:1759–1764.

Silveira FM, Etges A, Correa MB, Vasconcelos AC. Microscopic Evaluation of the Effect of Oral Microbiota on the Development of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws in Rats. *J Oral Maxillofac Res*. 2016;7(4).

Sindel et al. Histomorphometric Comparison of Bone Regeneration in Critical-Sized Bone Defects Using Demineralized Bone Matrix, Platelet-Rich Fibrin, and Hyaluronic Acid as Bone Substitutes. *J Craniofac Surg* 2017;00:00–00.

Soydan SS, Uckan S. Platelet-Rich Fibrin for Osteonecrosis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013.

Soyer T et al. The effect of platelet rich fibrin on growth factor levels in urethral repair. *Journal of Pediatric Surgery*. 2013;48,2545–2549.

Spanou A et al. Management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a literature review. *Oral Diseases*. 2015;21,927–936.

Sun CK et al. Direct implantation versus platelet-rich fibrin-embedded adipose-derived mesenchymal stem cells in treating rat acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*. 2014;410–423.

Suzuki S, Morimoto N, Ikada Y. Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. *Journal of Biomaterials Applications*. 2012.

Takaoka K et al. Establishment of an Animal Model of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws in Spontaneously Diabetic Torii Rats. *PLoS ONE*. 2015;10(12).

Tayşi M, Atalay B, Çankaya B, Yıldırım S. Effects of single- and double-layered resorbable membranes and platelet-rich fibrin on bone healing. *Clin Oral Invest*. 2017.

Toffler M et al. Introducing Choukroun's Platelet Rich Fibrin (PRF) to the Reconstructive Surgery Milieu. *The Journal of Implant & Advanced Clinical Dentistry*. 2009;1:6.

Vescovi P, Manfredi M, Merigo E, Meleti M (2008). Early surgical approach preferable to medical therapy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 66: 831–832.

Vidal-Gutiérrez X, Gómez-Clavel JF, Gaitán-Cepeda LA. Dental extraction following zoledronate, induces osteonecrosis in rat's jaw. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017;1;22 (2):177-84.

Weber JBB, Camilotti RS, Ponte ME. Efficacy of laser therapy in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): a systematic review. *Lasers Med Sci*. 2016;31:1261–1272.

Yamashita et al. Effect of Zoledronate on Oral Wound Healing in Rats. *Clin Cancer Res*. 2011;17(6):1405–1414.

Yanming Bi et al. Bisphosphonates Cause Osteonecrosis of the Jaw-Like Disease in Mice. *The American Journal of Pathology*, 2010; 177 (1): 280-290.

Zandi M et al. Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2016;44:271-278.

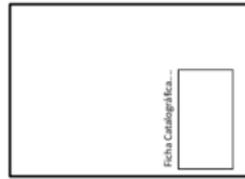
Zein CO, Jorgensen RA, Clarke B, et al: Alendronate improves bone mineral density in primary biliary cirrhosis: A randomized placebo-controlled trial. *Hepatology* 2005; 42:762.

ANEXOS A- NORMAS PARA DEFESA DE TESE- UFPE

FICHA CATALOGRÁFICA.

Deve conter os dados de catalogação-na-publicação, conforme o Código de Catalogação Anglo-Americano vigente. É elaborada pelo setor de processamento técnico da Biblioteca setorial – CCS. Deverá conter o crédito (nome e CRB) do bibliotecário responsável pela elaboração da ficha.

EXEMPLO:



ERRATA

A errata é um item opcional, deverá conter uma lista dos erros ocorridos no texto, seguidos das devidas correções. Deve ser inserida logo após a folha de rosto, constituída pela referência do trabalho e pelo texto da errata. Apresentada em papel avulso ou encartado, acrescida ao trabalho depois de impresso.

FOLHA DE APROVAÇÃO

É um elemento obrigatório. Deve ser inserida após a folha de rosto, constituída pelo nome do autor do trabalho, título do trabalho e substituído (se houver), natureza (tipo do trabalho, objetivo, nome da instituição a que é submetido, área de concentração) data de aprovação, nome, titulação e assinatura dos componentes da banca examinadora e instituições a que pertencem. A data de aprovação e as assinaturas dos membros componentes da banca examinadora devem ser colocadas após a aprovação do trabalho.

EXEMPLO:



FOLHA DE ROSTO

É definida como a folha que contém os elementos essenciais à identificação do trabalho. Deverá conter os seguintes elementos:

Contém os seguintes dados necessários à identificação:

Autor: o nome completo do autor deverá ser centrado no alto da folha de rosto, escrito com letras menores do que as utilizadas para o título.

Título do Trabalho: deve ser preciso e significativo, escrito com tamanho da letra maior do que o usado para o nome do autor, colocado no centro da página. O substituído, quando houver, deve ser graficamente diferenciado e separado do título por dois pontos (quando for explicativo) ou por ponto e vírgula (quando for complementar);

Nota da tese ou dissertação: deve conter a natureza do trabalho (dissertação ou tese), o nível (mestrado ou doutorado), a Unidade de defesa, a Universidade, o curso efetuado e a área de concentração.

Exemplo:

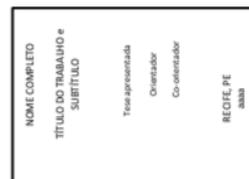
Tese/Dissertação Apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor/Mestre em Odontologia área de concentração em Clínica Integrada

Orientador: o nome do orientador do trabalho deve suceder à informação da área;

Co-orientador: o nome do Co-orientador do trabalho deve suceder a do orientador;

Notas tipográficas: compõem-se de local (cidade) e data (ano de depósito).

EXEMPLO:



Relação do Organograma Administrativo da UFPE

EXEMPLO:

Universidade Federal de Pernambuco
Reitor
Prof. Dr.
Vice-Reitor
Prof. Dr.
Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação
Prof. Dr.
Diretor do Centro Ciências da Saúde
Prof. Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Prof. Dr.
Colégio do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Membros do Corpo Permanente
Prof. Dr.
Prof. Dr.
Prof. Dr.
Prof. Dr.
Colaboradores
Prof. Dr.
Prof. Dr.
Secretária

Dedicatória (opcional)

Elemento opcional. Deve ser inserida após a folha de aprovação. O texto deverá ser curto, no qual o autor presta uma homenagem ou dedica o trabalho a alguém.

Agradecimentos (opcional)

Elemento opcional. Devem ser inseridos após a dedicatória. Página em que o autor manifesta agradecimento às pessoas e instituições que, de alguma forma, colaboraram para a execução do trabalho.

Epígrafe (opcional)

Elemento opcional. Elaborada conforme a ABNT NBR 10520. Deve ser inserida após os agradecimentos. Podem também constar epígrafes nas folhas ou páginas de abertura das seções primárias. Inclui citação escolhida pelo autor que, de certa forma, embasou a gênese da obra.

Resumo em Português (obrigatório)

Elemento obrigatório. Elaborado conforme a ABNT NBR 6028.

O resumo deverá ressaltar o objetivo do trabalho, a metodologia, os resultados principais e as conclusões.

Deverá ser composto por uma sequência de frases concisas, afirmativas e não de uma enumeração de tópicos. Deverá ser redigido em parágrafo único.

A primeira frase deverá ser significativa explicando o tema principal do trabalho.

O verbo deverá ser na voz ativa e na terceira pessoa do singular.

As Palavras-Chave deverão vir logo abaixo do resumo e precedido da expressão "Palavras-Chave:" separadas entre si por ponto e finalizada por ponto também.

Quanto a extensão deverá variar de 250 a 500 palavras.

No caso da apresentação sob a forma de artigo, o resumo deverá contemplar a síntese de todos os artigos resultantes do projeto de tese/dissertação.

Resumo em língua Inglesa (obrigatório)

Deverá ser a versão em inglês do resumo, respeitando-se as características linguísticas do idioma inglês.

Listas

Elemento opcional, que deve ser elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com cada item designado por seu título específico, acompanhado do respectivo número de página exceto para os casos de listas de abreviaturas, siglas e símbolos. Dependendo da necessidade podem ser feitas listas para cada item. As listas podem ser de:

Abreviaturas e siglas

Ilustrações

Símbolos

Lista de ilustrações (opcional)

Ilustração é a designação genérica de imagem, que ilustra ou elucida um texto. São consideradas ilustrações os desenhos, esquemas, fluxogramas, fotografias, gráfico, mapas, organogramas, plantas, quadros, tabelas, imagem que acompanha um texto, entre outros. As ilustrações (com exceção de tabelas) são designadas como Figuras.

A tabela é definida como a forma não discursiva de apresentar informações das quais o dado numérico se destaca como informação central.

É um elemento opcional. Elaborada de acordo com a ordem apresentada no texto, com cada item designado por seu nome específico, travesão, título e respectivo número da folha ou página. Quando necessário, recomenda-se a elaboração de lista própria para cada tipo de ilustração (desenhos, esquemas, fluxogramas, fotografias, gráficos, mapas, organogramas, plantas, quadros, retratos e outras).

Qualquer que seja o tipo de ilustração, sua identificação aparece na parte superior, precedida da palavra designativa (desenho, esquema, fluxograma, fotografia, gráfico, mapa, organograma, planta, quadro, retrato, figura, imagem, entre outros), seguida de seu número de ordem de ocorrência no texto, em algarismos arábicos, travessão e do respectivo título. Após a ilustração, na parte inferior, indicar a fonte consultada (elemento obrigatório, mesmo que seja produção do próprio autor), legenda, notas e outras informações necessárias à sua compreensão (se houver). A ilustração deve ser citada no texto e inserida o mais próximo possível do trecho a que se refere.

EXEMPLOS:

<p>Lista de Figuras</p> <p>Figura 1. Corte histológico 21</p>	<p>Lista de Tabelas</p> <p>Tabela 1. Percentual de óbitos 43</p> <p>...</p>
--	--

Lista de abreviaturas e siglas (opcional)

É a relação alfabética das abreviaturas e siglas utilizadas no texto, seguidas das palavras ou expressões correspondentes escritas por extenso. Não devem figurar abreviaturas e siglas comuns, como centímetro, milímetro, *et al.* etc.

Lista de símbolos (opcional)

Elemento opcional, que deve ser elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com o devido significado.

Sumário (obrigatório)

É um elemento obrigatório. Deverá ser elaborado conforme a ABNT NBR 6027. É a indicação do conteúdo do documento, refletindo as principais divisões e seções, na mesma ordem em que aparecem no texto. Cada parte é seguida pelo número da página em que se inicia. Usa-se o termo "sumário" (e não a palavra índice ou lista) para designar esta parte e é escrita em maiúsculas, centralizada na página, com o mesmo tipo e tamanho de fonte usado para as seções primárias.

O sumário deve incluir apenas as partes do trabalho que lhe sucedem, sendo assim não deve incluir os elementos pré-textuais e deve ser localizado:

- como último elemento pré-textual;
- quando houver mais de um volume, deve ser incluído o sumário de todo o trabalho, de forma que se tenha conhecimento do conteúdo, independente do volume consultado.

EXEMPLO:

SUMÁRIO	
1. Introdução	3
2. Metodologia	6
3. Resultados	20
4. Conclusões	24
5. Referências	28
6. Apêndice 1	30
7. Apêndice 2	35
8. Anexos	35

Elementos Textuais

Preambulo
Introdução
Metodologia
Resultados (Opcional)
Conclusão
Artigos Científicos

Preambulo

Nesse capítulo o autor deverá apresentar o seu trabalho na totalidade, abordando os seguintes tópicos:

- deverá estabelecer o assunto abordado de forma sucinta sem deixar dúvidas, evidenciando o período de abrangência da pesquisa realizada, com informações sobre a natureza e a importância do tema;
- descrever os objetivos, a finalidade e a justificativa para a realização do trabalho;

- deverá destacar os principais tópicos da pesquisa objetivando situar o tema da proposta apresentada;

- destacar a relevância e a contribuição para o enriquecimento do conhecimento atual.

Introdução

É o capítulo principal do texto, no qual deverá conter uma exposição ordenada e pormenorizada do assunto. Poderá ser dividido em seções e subseções, que

irão variar em função da abordagem do tema e do método. Deverá finalizar com a apresentação do objetivo geral e os objetivos específicos.

Metodologia

Nesse capítulo o autor deverá descrever de modo pormenorizado os materiais e o método utilizado para o desenvolvimento da pesquisa.

Resultados (Opcional)

Nesse capítulo o autor poderá apresentar todos os resultados da pesquisa. Podem ser utilizadas as ilustrações para facilitar o entendimento do texto.

Conclusões (Opcional)

É a parte final do texto, no qual o autor poderá fazer uma recapitulação sintética dos resultados e da discussão do trabalho apresentado correspondentes aos objetivos ou hipóteses tratados no trabalho. Pode conter a indicação de novos estudos.

Artigos Científicos

Nesse capítulo o autor deverá inserir o(s) artigo(s) científico(s) publicado(s) e/ou submetido(s) à publicação, resultantes do projeto de pesquisa da Tese/Dissertação, redigidos em sua forma original e a sua versão em língua portuguesa, de acordo com as normas do/dos periódico/períodos ao/aos qual/quais foi/foram publicados e/ou submetidos, a(s) qual(is) deverão vir logo após os manuscritos.

Elementos Pós-textuais

Referências
Apêndice (opcional)
Anexo (opcional)

Referências

É definida como o conjunto de elementos que permitem a identificação, no todo ou em parte, de documentos impressos ou registrados em diversos tipos de mídias. Nesse capítulo o autor deverá incluir todas as referências utilizadas para a realização da pesquisa e, essas deverão ser elaboradas de acordo com o estilo Vancouver.

Apêndice

É o texto ou documento elaborado pelo autor, a fim de complementar sua argumentação, sem prejuízo da unidade nuclear do trabalho. É um constituinte opcional. São identificados por letras maiúsculas, consecutivas, travessão e pelos respectivos títulos e devem ser apontados no Sumário.

Anexo

É um texto ou documento não elaborado pelo autor, que serve de fundamentação, comprovação e/ou ilustração, como leis, estatutos etc. Por trata-se de material complementar ao texto, deve ser incluído quando for imprescindível à compreensão

do trabalho. São identificados por letras maiúsculas, consecutivas, travessão e pelos respectivos títulos e devem ser apontados no Sumário.

APRESENTAÇÃO GRÁFICA

FORMATAÇÃO

A tese ou dissertação deve ser impressa em papel branco e tinta de cor preta, folha "A4", de dimensões 210 x 297mm, gramatura 90g/m². A fonte utilizada pode ser escolhida entre Times New Roman ou Arial, tamanho 12 para o texto, 16 em negrito para o título e cortinas.

Espacejamento:

Entre as linhas do texto: espaço 1,5;

Entre as linhas de referências, notas de rodapé e citações textuais longas: espaço simples.

Margens

Superior: 3,0 cm;

Esquerda: 3,0 cm;

Direita: 2,0 cm;

Inferior: 2,0 cm;

De parágrafos: 2,0 cm a partir da margem esquerda;

De citação longa: 4,0 cm a partir da margem esquerda.

Paginação

As páginas deverão ser enumeradas sequencialmente a partir do início do trabalho (Elementos Textuais-Introdução) algarismo arábico, no canto superior direito de cada página, exceto as cortinas e nas páginas chamativas entre um capítulo e outro.

Para efeito de catalogação sumária, todas as páginas deverão ser contadas a partir da introdução.

As páginas iniciais (Elementos Pré-textuais) poderão ser numeradas, porém se utilizando algarismos romanos em sua forma minúscula.

Número de Exemplares:

Trabalho Científico	Número de Exemplares	
	Qualificação	Defesa
Dissertação	4	6
Tese	4	10

ANEXO B- NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA: ORAL DISEASES

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance.

Relevant Documents: [Online Open Order Form](#), [Standard Release Form for photographic consent](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles Published in *Oral Diseases*](#), [Author Services](#), [Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

1. GENERAL

The editors encourage submissions of original articles, review articles, reports of meetings, book reviews and correspondence in the form of letters to the editor. *Oral Diseases* does not accept case reports.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Oral Diseases*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

Avoiding allegations of plagiarism

The journal to which you are submitting your manuscript employs text matching software (iThenticate) to ensure against plagiarism. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published work. Authors should consider whether their manuscript may raise concerns via iThenticate, which will signal whether a paper is likely in any way to be plagiarized in a formal sense. iThenticate will also, however, signal whether a paper may be plagiarized by repeating work of the submitting authors and thus be regarded as duplicate or redundant publication. Experience shows that, on occasion, large sections of submitted manuscripts can be close to verbatim in word choice from that seen in other papers from the authors' group. This has nothing to do with simple repetition of names/affiliations, but does involve common (not necessarily "standard") phrases that are more appropriately referenced instead of repeating. Alternatively, they can be rephrased differently. Previously published results, including numerical information and figures or images, should be labeled to make it clear where they were previously reported. Papers that present new analyses of results that have already been published (for example, subgroup analyses) should identify the primary data source, and include a full reference to the related primary publications. *Oral Diseases* will review and publish accepted manuscripts that report data included in conference proceedings in abstract form. In such cases, authors must be clear to readers that part of all of the manuscript's data have already been published in abstract form by so indicating using a footnote to the title that states the conference proceedings in which the relevant abstract was published. For full guidance on text matching and plagiarism, please refer to Section 3 ('Research Integrity') of Wiley's Ethics Guidelines at <https://authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html>.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 6 published pages, including title page, abstract, references, table/figure legends and tables and figures, are subject to a charge of GBP70 per additional page. As a

guide, one published page amounts approximately to 850 words, or two to four small tables/figures. Additional supplementary material (including text and figures), which does not fit within the page limits, can be published online only as supporting information.

5.2. Format

Language: Authors should write their manuscripts in British English using an easily readable style. Authors whose native language is not English should have a native English speaker read and correct their manuscript. Spelling and phraseology should conform to standard British usage and should be consistent throughout the paper. A list of independent suppliers of editing services can be found at

http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Presentation: Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. The background and hypotheses underlying the study as well as its main conclusions should be clearly explained. Titles and abstracts especially should be written in language that will be readily intelligible to any scientist.

Technical jargon: should be avoided as much as possible and clearly explained where its use is unavoidable.

Abbreviations: *Oral Diseases* adheres to the conventions outlined in *Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors*. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used.

5.3. Structure: All papers submitted to *Oral Diseases* should include:

- Title Page
- Structured Abstract
- Main text
- References
- (Figures)
- (Figure Legends)
- (Tables)

Title Page: should be part of the manuscript uploaded for review and include:

- A title of no more than 100 characters including spaces
- A running title of no more than 50 characters
- 3-6 keywords
- Complete names and institutions for each author
- Corresponding author's name, address, email address and fax number
- Date of submission (and revision/resubmission)

Abstract: is limited to 200 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form set out under:

- Objective(s),
- Subject(s) (or Materials) and Methods,
- Results,
- Conclusions(s).

The Main Text of Original Research Articles should be organised as follows

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are inappropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation.

Materials and Methods must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves. Other

supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) Clinical trials: As noted above, these should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A **CONSORT checklist** should also be included in the submission material. Clinical trials can be registered in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. As stated in an editorial published in *Oral Diseases* (12:217-218), 2006), all manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website. The clinical trial registration number and name of the trial register will be published with the paper.

(ii) Experimental subjects: As noted above, experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association **Declaration of Helsinki** (version 2002) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used. When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

(iii) Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations.

Discussion: may usually start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results sections should be avoided. The section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Acknowledgements: Should be used to provide information on sources of funding for the research, any potential conflict of interest and to acknowledge contributors to the study that do not qualify as authors. All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. Where people are acknowledged, a covering letter demonstrating their consent must be provided.

5.4. References

References should be prepared according to the *Publication Manual of the American Psychological Association* (6th edition). This means in-text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). For references with three to five authors, all authors should be listed only on the first occurrence of the in-text citation, and in subsequent in-text occurrences only the first author should be listed followed by '*et al.*'. The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper. A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the [APA website](http://www.apa.org). Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

Journal article

Example of reference with 2 to 7 authors

Beers, S. R., & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, *159*, 483–486. doi: 10.1176/appi.ajp.159.3.483

Ramus, F., Rosen, S., Dakin, S. C., Day, B. L., Castellote, J. M., White, S., & Frith, U. (2003). Theories of developmental dyslexia: Insights from a multiple case study of dyslexic adults. *Brain*, *126*(4), 841–865. doi: 10.1093/brain/awg076

Example of reference with more than 7 authors

Rutter, M., Caspi, A., Fergusson, D., Horwood, L. J., Goodman, R., Maughan, B., ... Carroll, J. (2004). Sex differences in developmental reading disability: New findings from 4 epidemiological studies. *Journal of the American Medical Association*, *291*(16), 2007–2012. doi: 10.1001/jama.291.16.2007

Book edition

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Figures: All figures and artwork must be provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS) and bitmap files (e.g. half-tones) or clinical or in vitro pictures in Tagged Image Format (TIFF).

Detailed information on our digital illustration standards can be found at

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it:

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same type size as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and unit, and follow SI nomenclature common to a particular field.

Unusual units and abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc).

Color figures

Color figures may be published online free of charge; however, the journal charges for publishing figures in colour in print. If the author supplies colour figures at Early View publication, they will be invited to complete a colour charge agreement in RightsLink for Author Services. The author will have the option of paying immediately with a credit or debit card, or they can request an invoice. If the author chooses not to purchase color printing, the figures will be converted to black and white for the print issue of the journal.

Guidelines for Cover Submissions

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please [follow these general guidelines](#).

Video Abstracts

Bring your research to life by creating a video abstract for your article! Wiley partners with Research Square to offer a service of professionally produced video abstracts. Learn more about video abstracts at www.wileyauthors.com/videoabstracts and purchase on for your article at <https://www.researchsquare.com/wiley/> or through your Author Services Dashboard. If you have any questions, please direct them to videoabstracts@wiley.com.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

Proof Corrections

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following website:

www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html . This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within **three days** of receipt.

As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

Early View (Publication Prior to Print)

Oral Diseases is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

ANEXO C- CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 23 de novembro de 2016.

Ofício nº 111/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.º Luiz Alcino Monteiro Gueiros**
Departamento de Odontologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 003/2015

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do reparo mucoso e ósseo mandibular de retos submentidos á instalação de implantes osseointegráveis associado ao uso de bisfosfanatos**”, registrada com o nº **003/2015**, sob a responsabilidade de Prof.º **Luiz Alcino Monteiro Gueiros** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 23/11/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 01/02/2016 a 01/05/2017
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus albinus
Nº de animais	54
Peso/Idade	250- 400g
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério

Atenciosamente,