

Andréia Maria Rocha Moreira

Caracterização Histopatológica da Osteonecrose Induzida por
Bisfosfonatos em Modelo Animal

Brasília
2015

Andréia Maria Rocha Moreira

Caracterização Histopatológica da Osteonecrose Induzida por
Bisfosfonatos em Modelo Animal

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. André Ferreira Leite

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo

Brasília
2015

Dedico este trabalho à minha querida mãe, Maria do Carmo. Ao meu pai e amigo, Fernando. Aos meus irmãos Fernandinho e Letícia. Às minhas avós Lourdinha e Lourdes e meus avôs Alípio (*in memoriam*) e Bernardo (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo. Sem Ele nada seria possível. Agradeço pela minha vida e pela minha família. Por me conceder força nos momentos difíceis, por guiar meus caminhos e pela graça do estudo.

À minha querida mãe, Maria do Carmo, que sempre me incentivou a estudar, desde a minha infância. Obrigada por tanta dedicação a mim e meus irmãos. Pela entrega e doação incondicional. Pela educação alicerçada em valores tão nobres para que sejamos pessoas de bem. Por ser minha melhor amiga, por me ajudar. Por nos dar sempre um bom exemplo. Espero um dia poder retribuir e corresponder a tudo isso.

Ao meu querido pai, Fernando, que acredita tanto em mim. Obrigada por todo o auxílio ao longo deste curso de graduação e em minha vida. Agradeço por me ajudar a ser uma pessoa melhor, por ser meu grande amigo, por sempre me aconselhar a seguir o bom caminho, pelo carinho, pelas palavras sábias e pelas de conforto nos momentos difíceis. Obrigada por tudo.

Ao meu irmão Fernandinho, a quem admiro tanto, meu amigo, grande exemplo e incentivador e à minha irmã Letícia, minha companheirinha, que tantas vezes foi tão generosa comigo, mesmo quando ainda era criança, agradeço por tudo o que fazem por mim e por tornarem a minha vida muito mais alegre. Agradeço a toda a minha família, meus avós, tios e primos, que são tão importantes para mim e sempre me forneceram o apoio necessário para que tudo isso se tornasse possível.

À equipe de professores que me ajudou neste trabalho de conclusão de curso e em minha graduação. Agradeço a paciência que tiveram comigo, a confiança, o incentivo, por abrirem as portas e por me concederem tantas oportunidades. Agradeço:

Ao Professor André Leite, meu orientador e amigo, um exemplo de profissional e de simplicidade, que acompanhou minha trajetória na universidade e contribuiu não só para a minha formação acadêmica, mas também para meu crescimento pessoal. Sou grata por tudo o que me ensinou e por toda a ajuda, incentivo, consideração e pela oportunidade que me deu ao me inserir neste projeto.

Ao Professor Paulo Tadeu, sempre tão presente ao longo da minha graduação, a quem admiro a dedicação aos pacientes e por fazer um trabalho tão nobre e diferenciado. Obrigada por tudo o que fez por mim e pela contribuição e influência tão significativas para a minha formação. Agradeço os ensinamentos tão especiais e importantes que o senhor me passou durante todos esses anos de convivência e aprendizado.

À Professora Ana Carolina, por me apresentar os caminhos da pesquisa, por confiar em mim e por estimular o meu desenvolvimento nas atividades do laboratório. Agradeço por acrescentar tanto ao compartilhar seu conhecimento e experiência, pela compreensão, pelo incentivo intenso e constante, e por não ter medido esforços ao dedicar tanto tempo a me ensinar e me ajudar na execução deste trabalho.

À Professora Nilce, agradeço a contribuição tão relevante para a construção deste trabalho. Obrigada por me auxiliar na interpretação dos resultados desta pesquisa. Por me ensinar, às vezes de forma tão diferente, ao me inspirar a buscar respostas mais concretas por meio da dúvida e do questionamento. Pela presença ao longo do meu curso e pelas vezes em que me instigou o desejo de buscar ser melhor e crescer.

À Professora Eliete, por me incentivar a estudar, inclusive através do seu exemplo, agradeço pelas vezes em que esclareceu nossas dúvidas e por colocar-se disponível a nos ajudar.

À Professora Bruna Amorim, pelas vezes que me auxiliou e por compartilhar suas experiências comigo, me

estimulando a ter coragem para enfrentar os desafios inerentes à profissão.

Aos senhores, toda a minha gratidão e admiração!

À Glorinha, por ter se disponibilizado a me ensinar as técnicas histológicas necessárias para a execução deste trabalho. Obrigada pela paciência, gentileza e por compartilhar seus conhecimentos comigo. Ao Gabriel Guillen, cuja contribuição foi fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada pelo auxílio tão importante durante o trabalho laboratorial. Agradeço à Pollyana e a todos os meus colegas e amigos do laboratório, por me incentivarem, e por todas as vezes que me ajudaram e colaboraram comigo.

A todos os professores, agradeço por todo o conhecimento transmitido, por contribuírem para a minha formação e por me ensinarem uma profissão. Não há palavras que descrevam a minha gratidão a esses profissionais. Aos funcionários agradeço a disponibilidade e por fornecerem condições para que o espaço de ensino seja concreto. Aos pacientes, agradeço a paciência, incentivo e por colaborarem para o nosso processo de aprendizado. A todos os meus colegas de curso, pelo companheirismo e cumplicidade.

À minha amiga e dupla Raiza, que esteve comigo durante toda a minha graduação e com quem aprendi tantas coisas boas, agradeço por todo o apoio e amizade. A sua contribuição somou muito ao meu processo de formação. À minha amiga Helora, minha primeira dupla, agradeço o seu companheirismo e por participar de uma forma tão positiva desta importante etapa da minha vida.

Por fim, agradeço a todas as pessoas boas que Deus foi colocando em minha vida e que apesar de não contribuírem diretamente com este trabalho, estenderam as mãos e me ajudaram a chegar até aqui. Dentre tantas, deixo o meu carinho especial à minha madrinha tia Denise e à minha avó Lourdinha.

“Alocução a meninos

(...) Pensem que todas as maravilhas, objetos de seus estudos, são a obra de muitas gerações, uma obra coletiva que exige de todos um esforço entusiasta e um labor difícil e impreterível. Tudo isto, nas mãos de vocês, se torna uma herança. Vocês a recebem, respeitam-na, aumentam-na e, mais tarde, irão transmiti-la fielmente à sua descendência. Deste modo somos mortais imortais porque criamos juntos obras que nos sobrevivem. Se refletirem seriamente sobre isto, encontrarão um sentido para a vida e para seu progresso. E o julgamento que fizerem sobre os outros homens e as outras épocas será mais verdadeiro”.

Albert Einstein

RESUMO

MOREIRA, Andréia Maria Rocha. Caracterização Histopatológica da Osteonecrose Induzida por Bisfosfonatos em Modelo Animal. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Objetivo: Caracterizar as alterações histopatológicas de mandíbulas de animais tratados com bisfosfonatos e submetidos à extração dentária.

Metodologia: Dezesete hemimandíbulas de ratas Wistar foram avaliadas. Seis animais experimentais e seis controles receberam zolendronato intraperitoneal 66 µg/kg ou soro fisiológico, três vezes por semana, durante seis/oito semanas. Após 21 dias, três ratas do grupo experimental e duas do grupo controle foram submetidas à extração dentária do primeiro molar inferior esquerdo. Noventa dias depois do início do tratamento as ratas foram eutanasiadas, as mandíbulas dissecadas, fixadas por imersão em formol tamponado 10%, desidratadas e incluídas em parafina. Cortes de 17 hemimandíbulas com 5µm foram corados com hematoxilina-eosina e analisados microscopicamente.

Resultados: Nos animais tratados com bisfosfonatos e submetidos à extração dentária houve reação periosteal, necrose óssea e colonização bacteriana. Em um animal sem medicação, submetido à extração dentária, os achados microscópicos foram compatíveis com osteomielite. Nos animais medicados, sem extração, e nos animais sem intervenção medicamentosa e cirúrgica, não houve alterações microscópicas.

Conclusão: As principais alterações histopatológicas foram compatíveis com as descritas na literatura. Estas alterações, presentes nos animais submetidos à extração e sob efeito da medicação, evidenciam o papel do trauma e do biofilme na etiopatogenia da osteonecrose induzida por bifosfonatos.

ABSTRACT

MOREIRA, Andréia Maria Rocha. Histopathological Characterization of Bisphosphonate-induced Osteonecrosis in Animal Model. 2015. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília.

Objective: To characterize histopathological changes of animal jaws treated with bisphosphonates that underwent tooth extraction.

Methods: Seventeen hemimandibles of Wistar rats were evaluated. Six animals from the group tested and six from the control group received intraperitoneal zoledronate 66 µg/kg or saline solution three times a week for six/eight weeks. After 21 days, three rats in the experimental group and two in the control group underwent dental extraction of the first lower left molar. Ninety days after starting treatment, the rats were euthanized, the jaws were dissected and fixed by immersion in 10% buffered formalin, dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 17 hemimandibles with 5µm were stained with hematoxylin-eosin and examined microscopically.

Results: In animals treated with bisphosphonates with tooth extraction, there were periosteal reaction, bone necrosis, and bacterial colonization. In one animal without medication, but with tooth extraction, the microscopic findings were consistent with osteomyelitis. In animals medicated without tooth extraction, and in animals without intervention, no microscopic changes were found.

Conclusion: The histopathological changes are consistent with the literature. These changes, present in animals submitted to extraction and under medication effect, highlight the role of trauma and biofilm in the pathogenesis of osteonecrosis induced by bisphosphonates.

SUMÁRIO

Artigo Científico	19
Folha de Título	21
Resumo	22
Abstract	24
Introdução.....	26
Metodologia.....	29
Resultados.....	34
Discussão.....	46
Conclusão.....	50
Referências	51
Anexos.....	55
Normas da Revista.....	55

ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico:

MOREIRA, Andréia Maria Rocha; GUILLEN, Gabriel Albuquerque; FIGUEIREDO, Paulo Tadeu de Souza; POPPE, Ana Carolina Acevedo; MELO, Nilce Santos de, LEITE, André Ferreira. Caracterização Histopatológica da Osteonecrose Induzida por Bisfosfonatos em Modelo Animal.

Apresentado sob as normas de publicação da Revista ORAL SURGERY ORAL MEDICINE ORAL PATHOLOGY ORAL RADIOLOGY AND ENDODONTOLOGY.

FOLHA DE TÍTULO

Caracterização Histopatológica da Osteonecrose Induzida por Bisfosfonatos em Modelo Animal

Histopathological Characterization of Bisphosphonate-induced Osteonecrosis in Animal Model

Andréia Maria Rocha Moreira¹

Gabriel Albuquerque Guillen¹

Paulo Tadeu de Souza Figueiredo²

Ana Carolina Acevedo Poppe²

Nilce Santos de Melo²

André Ferreira Leite²

¹ Aluno de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília.

² Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB).

Correspondência: Prof. Dr. André Ferreira Leite
Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 - Asa Norte - Brasília - DF
E-mail: andreleite@unb.br / Telefone: (61) 31071849

RESUMO

Caracterização Histopatológica da Osteonecrose Induzida por Bisfosfonatos em Modelo Animal

Resumo

Objetivo: Caracterizar as alterações histopatológicas de mandíbulas de animais tratados com bisfosfonatos e submetidos à extração dentária.

Metodologia: Dezessete hemimandíbulas de ratas Wistar foram avaliadas. Seis animais experimentais e seis controles receberam zolendronato intraperitoneal 66 µg/kg ou soro fisiológico, três vezes por semana, durante seis/oito semanas. Após 21 dias, três ratas do grupo experimental e duas do grupo controle foram submetidas à extração dentária do primeiro molar inferior esquerdo. Noventa dias depois do início do tratamento as ratas foram eutanasiadas, as mandíbulas dissecadas, fixadas por imersão em formol tamponado 10%, desidratadas e incluídas em parafina. Cortes de 17 hemimandíbulas com 5µm foram corados com hematoxilina-eosina e analisados microscopicamente.

Resultados: Nos animais tratados com bisfosfonatos e submetidos à extração dentária houve reação periosteal, necrose óssea e colonização bacteriana. Em um animal sem medicação, submetido à extração dentária, os achados microscópicos foram compatíveis com osteomielite. Nos animais medicados, sem extração, e nos animais sem intervenção medicamentosa e cirúrgica, não houve alterações microscópicas.

Conclusão: As principais alterações histopatológicas foram compatíveis com as descritas na literatura. Estas alterações, presentes nos animais submetidos à extração e sob efeito da medicação, evidenciam o papel do trauma e do biofilme na etiopatogenia da osteonecrose induzida por bifosfonatos.

Palavras-chave

Modelo animal; Histologia; Osteonecrose relacionada à medicação.

Relevância Clínica

A osteonecrose dos maxilares relacionada à medicação (MRONJ) é considerada um efeito adverso da administração de bisfosfonatos e outras drogas. A MRONJ é uma condição de alta morbidade com grande impacto clínico e de difícil tratamento. O crescente uso destas medicações pode vir a elevar o número de pacientes afetados por esta condição, cuja fisiopatologia ainda não está completamente esclarecida. Modelos animais de indução de MRONJ com consequente análise histológica podem auxiliar na compreensão da etiopatogenia da doença.

ABSTRACT

Histopathological Characterization of Bisphosphonate-induced Osteonecrosis in Animal Model.

Abstract

Objective: To characterize histopathological changes of animal jaws treated with bisphosphonates that underwent tooth extraction.

Methods: Seventeen hemimandibles of Wistar rats were evaluated. Six animals from the group tested and six from the control group received intraperitoneal zoledronate 66 µg/kg or saline solution three times a week for six/eight weeks. After 21 days, three rats in the experimental group and two in the control group underwent dental extraction of the first lower left molar. Ninety days after starting treatment, the rats were euthanized, the jaws were dissected and fixed by immersion in 10% buffered formalin, dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 17 hemimandibles with 5µm were stained with hematoxylin-eosin and examined microscopically.

Results: In animals treated with bisphosphonates with tooth extraction, there were periosteal reaction, bone necrosis, and bacterial colonization. In one animal without medication, but with tooth extraction, the microscopic findings were consistent with osteomyelitis. In animals medicated without tooth extraction, and in animals without intervention, no microscopic changes were found.

Conclusion: The histopathological changes are consistent with the literature. These changes, present in animals submitted to extraction and under medication effect, highlight the role of trauma and biofilm in the pathogenesis of osteonecrosis induced by bisphosphonates.

Keywords

Animal Model; Histology; Medication-Related Osteonecrosis.

INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos são uma classe de medicamentos que atuam sobre o processo de remodelação óssea, promovendo aumento da densidade óssea mineral. São indicados para o tratamento de doenças que causam reabsorção óssea, como osteoporose e metástases ósseas líticas associadas ao câncer de mama e outros tumores sólidos e também lesões osteolíticas vinculadas ao mieloma múltiplo. Também são utilizados no tratamento da hipercalcemia associada à malignidade, osteogênese imperfeita e doença de Paget.¹

Estes medicamentos têm estrutura química análoga a do pirofosfato, caracterizado pela ligação P-O-P. Entretanto, nos bisfosfonatos, a ligação P-O-P foi substituída por uma ligação P-C-P, na qual o átomo de carbono é o átomo geminal na cadeia, o que fornece maior resistência à hidrólise. Duas cadeias covalentes secundárias (R1 e R2) estão ligadas ao átomo de carbono. Por meio da cadeia R1, o bisfosfonato liga-se ao cálcio presente nas apatitas do sistema esquelético, permitindo assim a ligação do bisfosfonato ao tecido ósseo. A estrutura da cadeia R2 afeta a inibição da reabsorção óssea e de acordo com a estrutura molecular desta cadeia, os bisfosfonatos podem ser nitrogenados ou não-nitrogenados. A inserção de nitrogênio à cadeia R2 aumenta a afinidade do bisfosfonato por tecido ósseo e a sua capacidade antirreabsorção.² O zolendronato e o pamidronato, por exemplo, são bisfosfonatos contendo nitrogênio.³

O mecanismo de inibição da reabsorção óssea dos bisfosfonatos ocorre principalmente através da redução da atividade osteoclástica. Os bisfosfonatos ligam-se à hidroxiapatita do tecido ósseo. Ao reabsorver o tecido impregnado de bisfosfonatos, os osteoclastos apresentam prejuízo na capacidade de aderência óssea, formação da borda em escova e produção de prótons. Além disso, os bisfosfonatos

também atuam através da indução de osteoclastos à apoptose e reduzem o recrutamento de novos osteoclastos.⁴

Um dos efeitos adversos que pode ocorrer devido ao uso destas medicações é a osteonecrose, atualmente denominada osteonecrose dos maxilares relacionada à medicação. Ao ser descrita pela primeira vez, esta osteonecrose recebeu o nome de osteonecrose por bisfosfonatos.³ Atualmente, como se verificou que outros medicamentos antiangiogênicos e antirreabsortivos também podem causar osteonecrose, a American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, recomenda o nome de osteonecrose dos maxilares relacionada à medicação (MRONJ). Em coerência com a literatura, neste trabalho será empregado termo MRONJ, embora tenha sido usado o bisfosfonato como medicamento indutor de osteonecrose nos animais.⁵

Para o diagnóstico desta condição, três critérios são necessários: tratamento atual ou anterior com agentes antirreabsortivos ou antiangiogênicos; osso exposto ou que pode ser sondado através de fistula intraoral ou extraoral na região maxilofacial que não cura em até oito semanas; e ausência de histórico de radioterapia na região de cabeça e pescoço.⁵ A maioria dos casos de MRONJ ocorre devido à extração dentária anterior, porém há relatos de desenvolvimento espontâneo. A mandíbula tem sido mais afetada que a maxila. Há mais casos de MRONJ devido à administração de bisfosfonatos intravenosos, principalmente o Zolendronato, quando comparado aos bisfosfonatos administrados via oral.⁶

Apesar das várias hipóteses descritas na literatura que buscam elucidar a etiopatogenia da MRONJ, a patogênese da doença ainda não está completamente esclarecida.^{5,7-12} A hipótese que visa explicar o desenvolvimento da MRONJ baseia-se na supressão da remodelação óssea, através da atividade antiosteoclástica promovida pelos bisfosfonatos. Os bisfosfonatos alteram o equilíbrio fisiológico da interação entre osteoclastos e osteoblastos,² causando prejuízo na função

osteoclástica e alterando o processo de remodelação óssea fisiológica. Assim, o organismo pode não ser capaz de reparar as microfraturas que ocorrem devido à exposição a cargas mecânicas normais ou a danos maiores, como a extração dentária¹³. Além disso, o Zolendronato parece afetar o tecido da mucosa oral por meio da indução de apoptose das células epiteliais ou fibroblastos. Desta forma, lesões aos tecidos moles podem levar ao desenvolvimento da MRONJ ou potencializá-la¹⁴. O efeito antiangiogênico promovido pelo zolendronato, que atrasa a cicatrização de feridas pós-exodontias, e o aumento a predisposição à infecção bacteriana proporcionada por este bisfosfonato também estão descritos na literatura.¹¹

A avaliação histopatológica da MRONJ é essencial visto que a MRONJ apresenta características clínicas e radiográficas semelhantes a outras doenças, como osteomielite e osteorradionecrose.^{15,16,17} Além disso, este tipo de análise em modelo animal pode auxiliar na compreensão da etiopatogênese da MRONJ, ainda incerta.^{18,19}

Em animais, as características histopatológicas da MRONJ são descritas como a presença de áreas de necrose óssea com lacunas osteocíticas (osteoplastos) vazias, ou seja, com ausência ou escassa quantidade de osteócitos; biofilme microbiano, muitas vezes composto por colônias de bactérias compatíveis com *Actinomyces* spp; infiltrado inflamatório próximo às áreas de sequestro ósseo ou infecção; redução da vascularização óssea; entre outras.^{7,9,10,19,20}

Na análise histopatológica de espécimes de pacientes portadores de MRONJ foram descritos, entre outros achados, áreas de reação periosteal e bordas ósseas com padrão irregular sugerindo interrupção das lacunas de Howship.^{8,16} A reação periosteal também é visualizada nos exames de imagem. No entanto, parece paradoxal, que diante da alteração da remodelação óssea, haja a formação periosteal.

Desta forma, o principal objetivo deste estudo é caracterizar as alterações histopatológicas de mandíbulas, em animais submetidos à extração dentária e em uso de bisfosfonatos intravenosos.

METODOLOGIA

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética de Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (CEUA) em 12 de janeiro de 2012 sob o protocolo UnBDOC número 41597/2010.

O material biológico usado para a presente análise histopatológica foi coletado e processado previamente durante o projeto de mestrado da aluna Fernanda Ogata Luz denominado “Análise por microtomografia da maxila e mandíbula de ratos em tratamento com bisfosfonatos”. Na dissertação de mestrado, o objetivo foi analisar tomograficamente os maxilares de ratas submetidas a tratamento medicamentoso com Zolendronato associado ou não à extração dentária. A metodologia da pesquisa envolveu a adaptação dos animais no biotério, tratamento medicamentoso e cirúrgico, realização dos exames de microtomografia no início e no fim do tratamento e eutanásia dos animais.²¹ A divisão dos grupos experimentais e controles assim como os tratamentos realizados serão descritos a seguir. Trinta e seis ratas Wistar, com peso aproximado de 300g (90 dias de idade) foram divididas em dois grupos (Figura 1):

Grupo 1: Grupo Zolendronato, composto por 24 ratas que receberam Zolendronato 66 µg/kg, via intraperitoneal, três vezes por semana, durante seis ou oito semanas.

Grupo 2: Grupo Controle, composto por 12 ratas que receberam soro fisiológico via intraperitoneal, três vezes por semana, durante seis ou oito semanas.

Após 21 dias, de forma aleatória, procedeu-se à exodontia do primeiro molar inferior esquerdo em, aproximadamente, um terço dos animais de cada grupo; do primeiro molar superior esquerdo em, aproximadamente, um terço dos animais de cada grupo e o restante não sofreu extração dentária. Noventa dias depois do início do tratamento, as ratas foram eutanasiadas com gás carbônico e decapitadas. Posteriormente à extração dentária do primeiro molar inferior esquerdo, oito animais (dois controles e seis experimentais) morreram ²¹ (Figura 1).

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

1. GRUPOS DE ESTUDO:

Para esse trabalho foram realizadas preparações histológicas a partir de 12 animais, distribuídos em dois grupos, experimental e controle, conforme detalhado na figura 1. Dos 12 animais foram preparadas 17 hemimandíbulas, também distribuídas em dois grupos, de acordo com o desenho experimental.

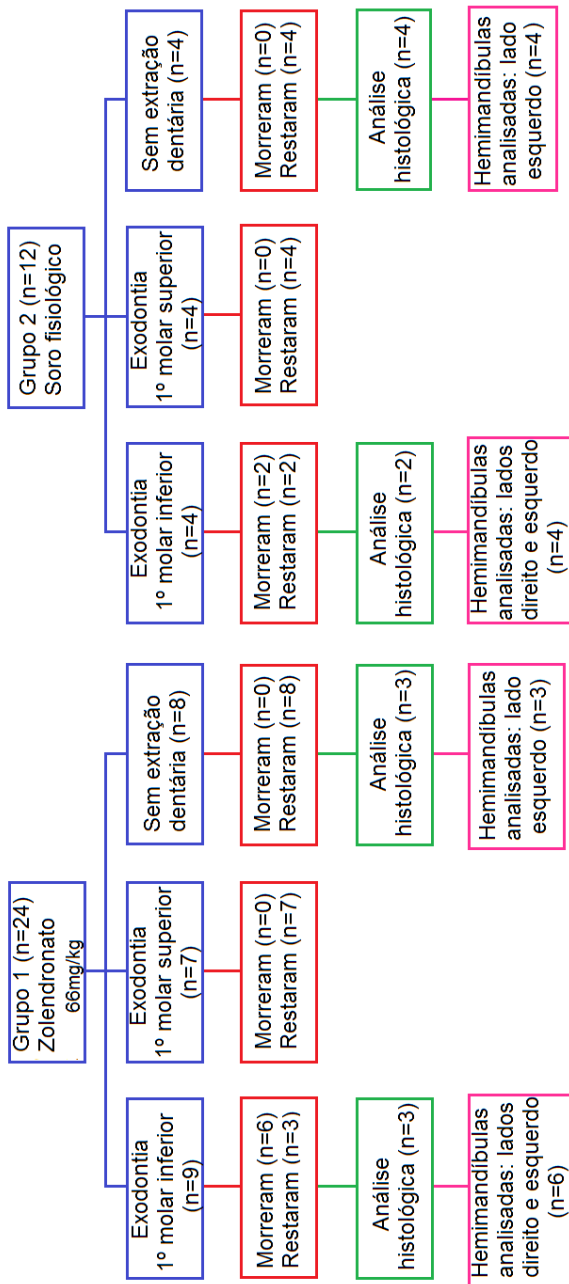


Figura 1: Em azul, distribuição dos animais na primeira etapa do projeto, desenvolvida durante o mestrado da aluna Fernanda Ogata Luz (n=número de ratas). Em vermelho, distribuição dos animais que morreram após a exodontia (n=número de ratas). Em verde, distribuição dos grupos de animais selecionados para análise histológica (n=número de ratas). Em rosa, distribuição das peças anatômicas (hemimandíbulas) submetidas à análise histopatológica(n=número de hemimandíbulas) .

2. PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA:

Após eutanásia, as cabeças dos animais foram fixadas por imersão em formol tamponado 10% durante 24 horas e armazenadas em tampão fosfato (0,1M, 7,0-7,2 pH). Em seguida, foram descalcificadas em solução de EDTA 4.13% durante um período de três meses, com trocas a cada 72 horas. A maxila e a mandíbula de cada animal foram removidas, seccionadas sagitalmente e o excesso de tecidos moles dissecado. As hemimaxilas e hemimandíbulas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 80%, 95%, 100%), as amostras impregnadas no tolueno e incluídas em parafina Paraplast®.

Foram realizados cortes axiais seriados de 5 µm em micrótomo Leica RM 2125RT, dos quais a cada dez cortes desprezados, um corte foi aproveitado. Os cortes foram realizados da região da base da mandíbula em direção às raízes e coroas dentárias de acordo com a Figura 2. Foram confeccionadas aproximadamente 665 lâminas e destas 220 foram selecionadas e coradas por meio da coloração hematoxilina-eosina. Após coloração, as lâminas foram montadas com Entellan®

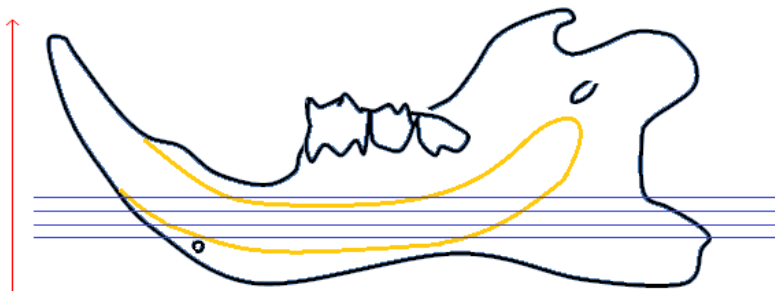


Figura 2: Hemimandíbula. As linhas azuis indicam a direção dos cortes (axial) e a seta vermelha mostra que foram cortados a partir da base mandibular em direção às raízes e coroas dentárias. No desenho, é possível observar a coroa dos molares e incisivo (seguindo o contorno ósseo em preto) e em amarelo a raiz do incisivo inferior.

3. OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA:

Um total de 17 hemimandíbulas de animais experimentais e controles submetidos ou não a extrações dentárias foram observadas no microscópio de luz Axioplan, Zeiss. A distribuição do tipo de tratamento, assim como presença e ausência de extração dentária estão resumidas na figura 1. Nos animais submetidos à extração do primeiro molar esquerdo, ambas hemimandíbulas foram analisadas. Entretanto, nos animais sem extração, apenas a hemimandíbula esquerda foi analisada.

A observação dos cortes foi focada na região do primeiro molar inferior, compreendida entre as porções anterior e posterior do incisivo mandibular, como descrito na figura 3.

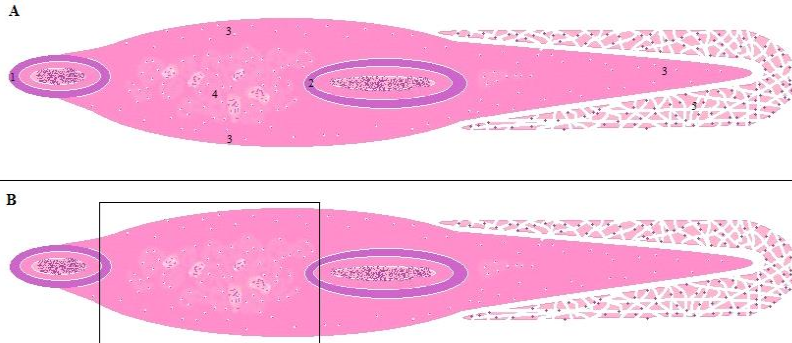


Figura 3: A. Esquema representativo do corte histológico: 1: Região anterior do incisivo. 2: Região posterior do incisivo. 3. Osso cortical. 4. Osso esponjoso. 5. Músculo. B. A área delimitada pelo quadrado representa a principal região da hemimandíbula analisada neste estudo.

As lâminas foram analisadas quanto à presença de necrose óssea. Ademais, a presença de inflamação, necrose celular, biofilme e reação periosteal também foram parâmetros avaliados.

RESULTADOS

Os achados histopatológicos evidenciaram diferenças entre as hemimandíbulas dos grupos controle e experimental. Os principais resultados estão sintetizados na Tabela 1.

GRUPO EXPERIMENTAL - ZOLENDRONATO E EXTRAÇÃO DENTÁRIA:

As hemimandíbulas dos animais do grupo experimental submetidos à extração dentária apresentaram intensa necrose óssea, caracterizada por grandes áreas com ausência de osteócitos nos osteoplastos nas áreas de osso esponjoso e de osso cortical e ausência de vascularização (Figura 4). Essas

Tabela 1: Síntese dos principais achados histopatológicos observados em cada hemimandíbula

Rata	Hemimandíbula	Grupo	Extração dentária	Necrose óssea	Inflamação	Necrose Celular	Biofilme	Reação Periosteal
1	Esquerda	Controle	Não	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
2	Esquerda	Controle	Não	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	Esquerda	Controle	Não	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
4	Esquerda	Controle	Não	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
5	Esquerda	Zolendronato	Não	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
6	Esquerda	Zolendronato	Não	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
7	Esquerda	Zolendronato	Não	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
8	Esquerda	Zolendronato	Sim	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
8	Direita	Zolendronato	Não	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
9	Esquerda	Zolendronato	Sim	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
9	Direita	Zolendronato	Não	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
10	Esquerda	Zolendronato	Sim	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
10	Direita	Zolendronato	Não	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
11	Esquerda	Controle	Sim	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
11	Direita	Controle	Não	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
12	Esquerda	Controle	Sim	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
12	Direita	Controle	Não	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

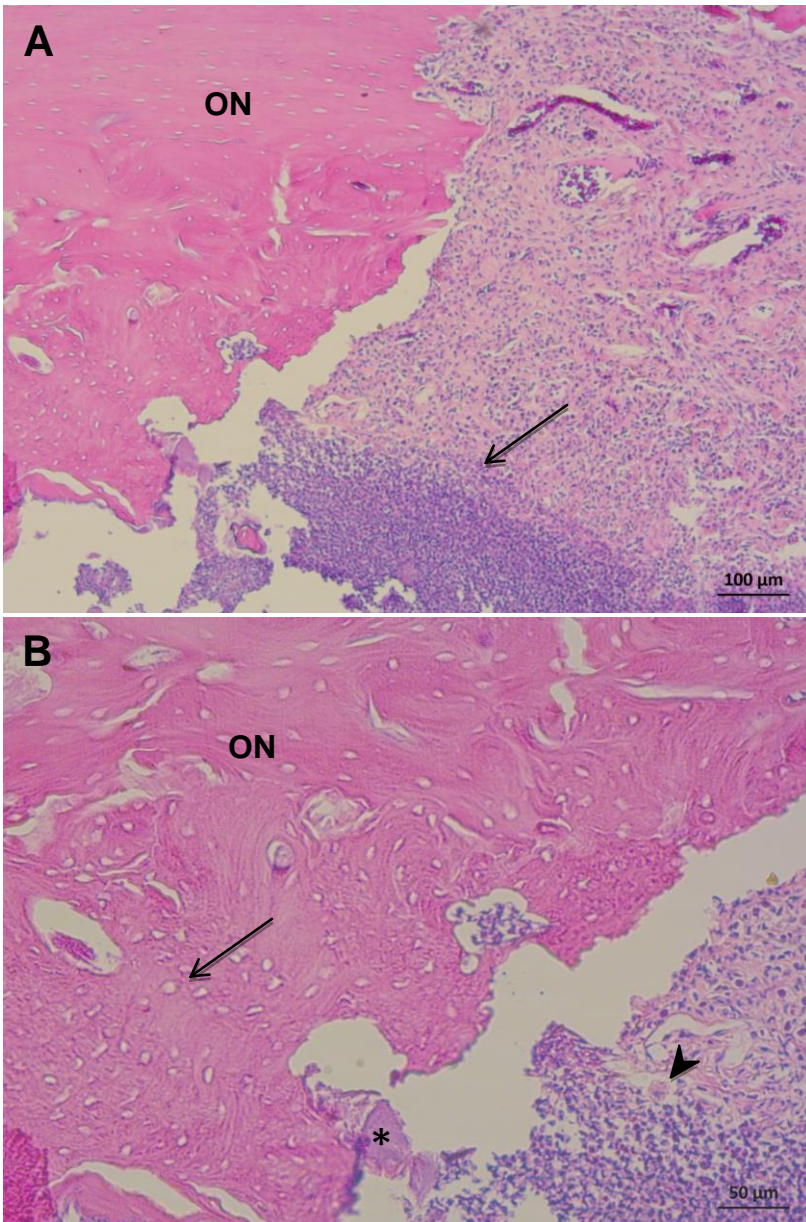


Figura 4. Grupo experimental com extração dentária. HE. A: Osso necrótico (ON) e inflamação (seta). B: Osteoplastos vazios (seta), biofilme (asterisco) e inflamação (ponta da seta).

características foram observadas desde a base mandibular, antes mesmo de serem observadas as raízes dentárias. Principalmente próximo às zonas de necrose óssea e biofilmes, havia focos de infiltrado inflamatório (Figura 4). Foram observadas várias áreas de biofilmes, principalmente sobre as corticais ósseas e osso esponjoso, muitas vezes compatíveis com colônias de *Actinomyces* spp, que se apresentam como uma massa basofílica com estruturas semelhantes a raios, em formato de roseta radiante (Figura 5). Um dos achados histopatológicos mais característicos desta análise foi a extensa formação de osso reacional periosteal sobre as corticais interna e externa das hemimandíbulas, em áreas de osso vital ou não (Figura 6). Nas hemimandíbulas contralaterais que não foram submetidas à extração dentária destes animais, não foram observadas alterações histopatológicas. Estas características são essenciais para o diagnóstico de osteonecrose associada à bisfosfonatos.

GRUPO EXPERIMENTAL - ZOLENDRONATO SEM EXTRAÇÃO DENTÁRIA:

As hemimandíbulas dos animais do grupo experimental que receberam a medicação, mas não foram submetidos à extração dentária, não apresentaram alterações histopatológicas significativas que pudessem indicar a presença de MRONJ. O quadro encontrado foi compatível com normalidade tecidual, tanto óssea quanto dos tecidos moles (Figura 7)

GRUPO CONTROLE NÃO SUBMETIDO À EXTRAÇÃO:

Nas hemimandíbulas dos animais do grupo controle não submetidos à extração dentária, o tecido ósseo apresentou-se bem vascularizado, com presença de osteócitos viáveis nos

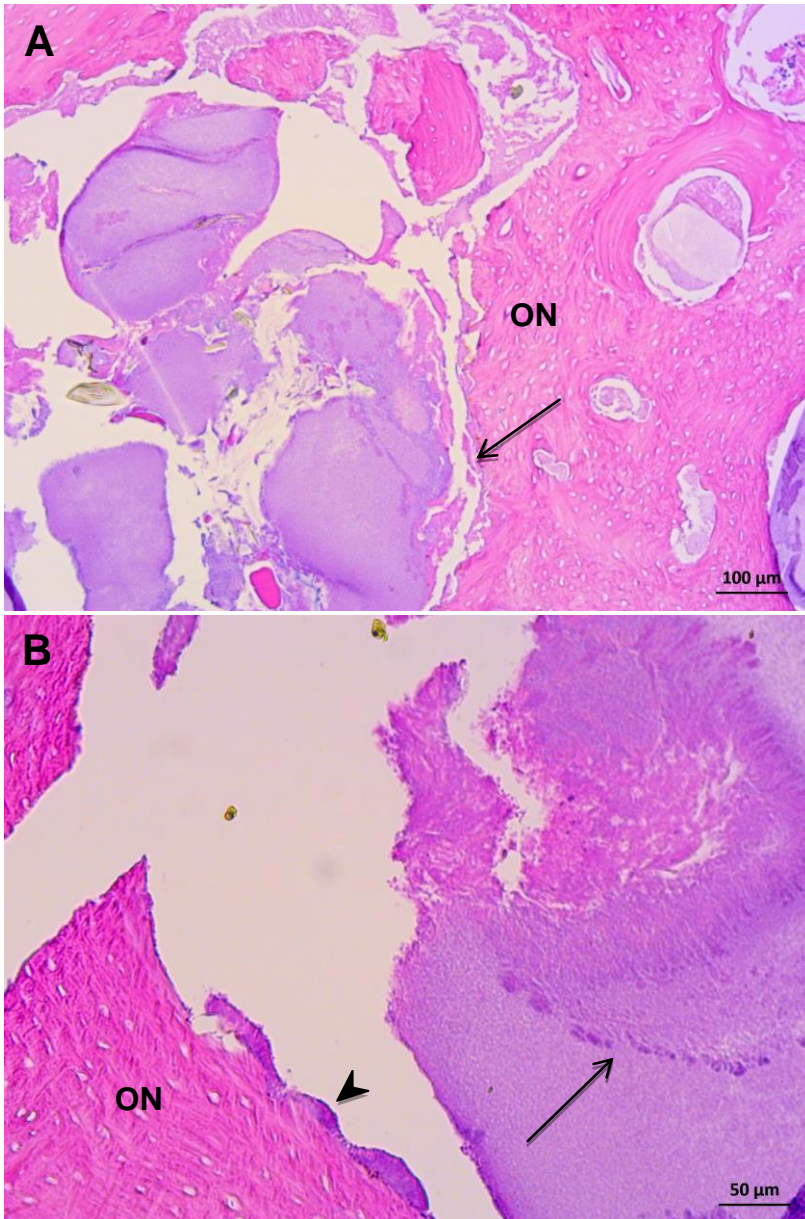


Figura 5. Grupo experimental com extração dentária. HE. A: Osteonecrose (ON) do osso alveolar e biofilme (seta). B: osso alveolar necrótico (ON), com biofilme aderido às paredes (ponta da seta). No interior do alvéolo há colônias sugestivas de *Actinomyces israeli* (seta).

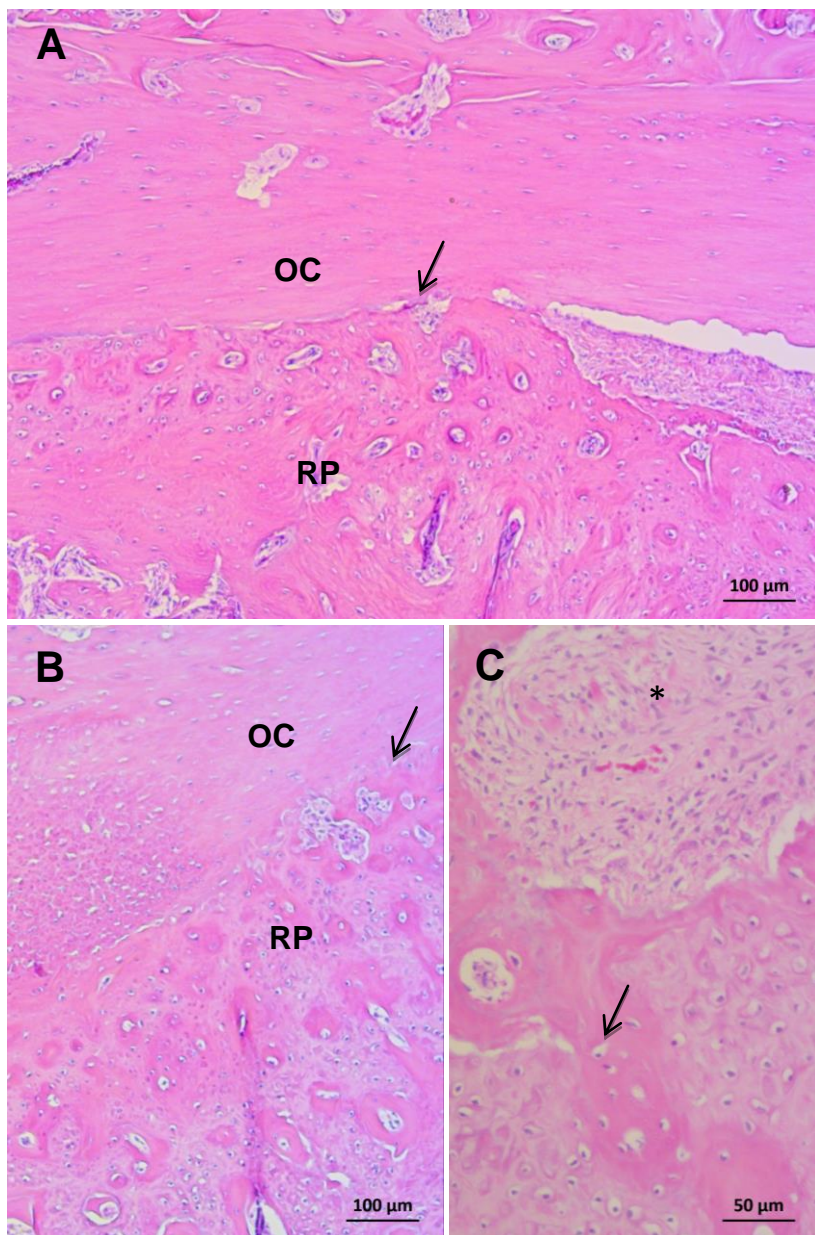


Figura 6. Grupo experimental com extração dentária. HE. A-B: Reação periosteal (RP) sobre o osso cortical (OC). A seta indica o limite entre ambos. C: Osteócito viáveis (seta) e tecido conjuntivo (asterisco) na reação periosteal.

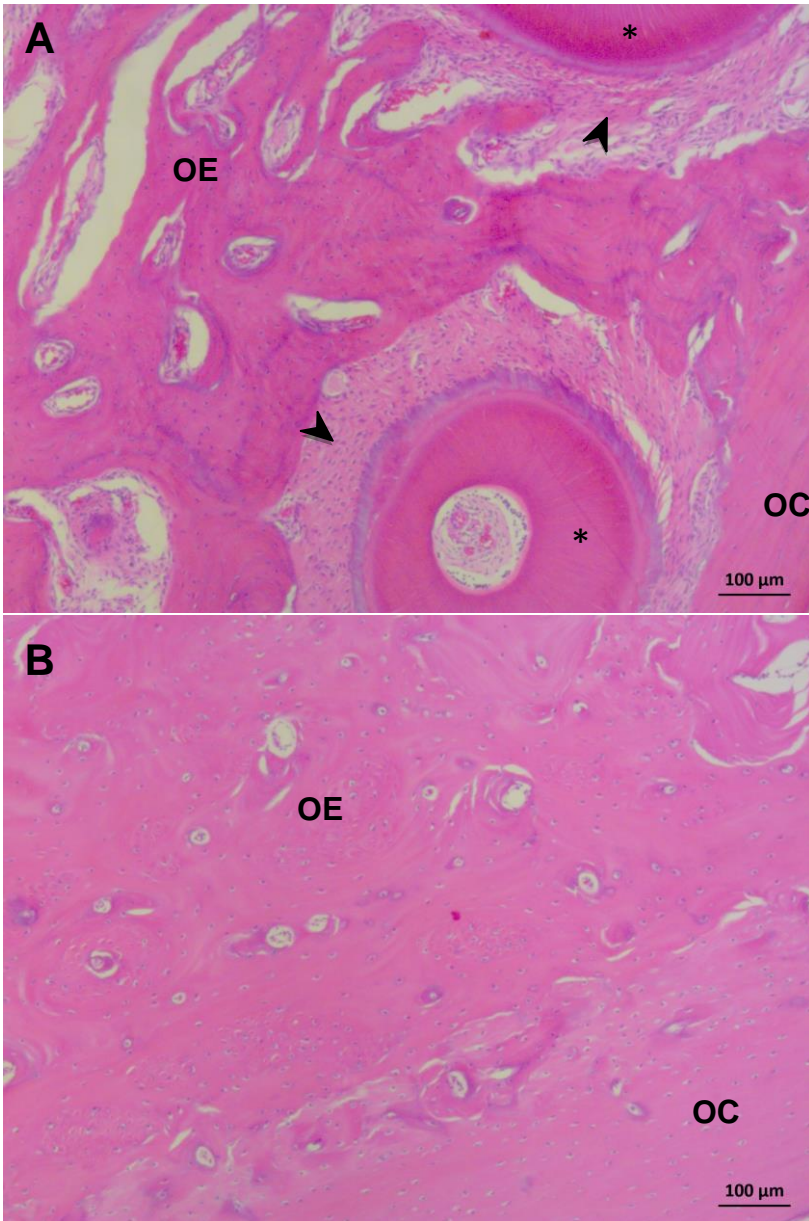


Figura 7. Grupo experimental sem extração. HE. A-B: Normalidade tecidual. HE. Osso cortical (OC), osso esponjoso (OP), ligamento periodontal (ponta da seta) e raízes dentárias (asteriscos).

osteoplastos, tanto no osso cortical quanto no osso esponjoso. O osso esponjoso estava mais vascularizado em relação ao osso cortical e, além disso, apresentava tecido hematopoiético e eventuais células gordurosas (Figura 8) Nos cortes mais superiores, foram observadas raízes dentárias, cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. Os osteoclastos estavam localizados em maior quantidade nas margens do osso alveolar, próximos ao ligamento periodontal. Todas essas características são descritores de normalidade tecidual.

GRUPO CONTROLE SUBMETIDO À EXTRAÇÃO:

No grupo controle submetido à extração dentária, um dos animais apresentou alterações microscópicas compatíveis com o quadro de osteomielite supurativa. A osteomielite, a MRONJ e osteorradionecrose têm como característica em comum, a necrose óssea, com canais de Volkmann e sistema Harvesiano vazios¹⁵. No entanto, para o diagnóstico de osteomielite supurativa dos maxilares deveria haver, no espaço medular, células inflamatórias. Nesse trabalho, essa não foi uma característica, mas sim, verificou-se a presença de abscesso, caracterizado por ampla área de necrose tecidual, circundada por tecido conjuntivo normal.

Em uma das hemimandíbulas, havia concomitante reacional periosteal, ou seja, neoformação óssea com padrão desorganizado sobre as corticais mandibulares e bastante tecido fibroso. Novamente, não se evidenciou, de forma significativa, o quadro inflamatório. Havia ainda, biofilme associado a uma raiz dentária (Figura 9).

Em outra peça, havia uma reação muito mais intensa, com substituição de grandes áreas de tecido ósseo por tecido conjuntivo, com algum infiltrado inflamatório crônico, linfoplasmocitário. Áreas de abscessos, envolvidos por cápsulas fibrosas, também foram observadas, bem como a presença de

extensas zonas de necrose óssea. Também estavam presentes, biofilmes compatíveis com colônias de *Actinomyces* spp, e significativa reação periosteal. As hemimandíbulas do lado contralateral a estas não apresentaram alterações histopatológicas (Figura 10).

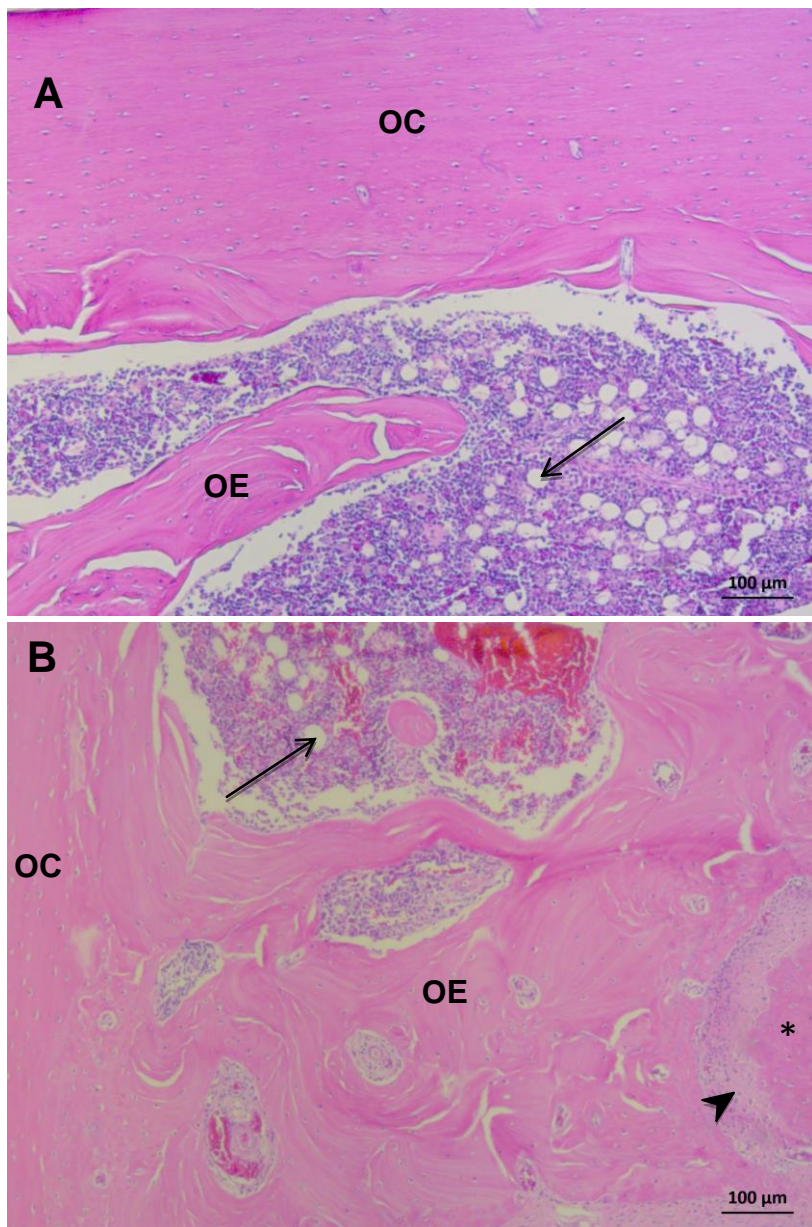


Figura 8. Grupo controle sem extração. HE. A-B: Normalidade tecidual. Osso cortical (OC) e esponjoso (OE), ligamento periodontal (ponta da seta), cimento (asterisco), e tecido hematopoiético com células gordurosas (seta).

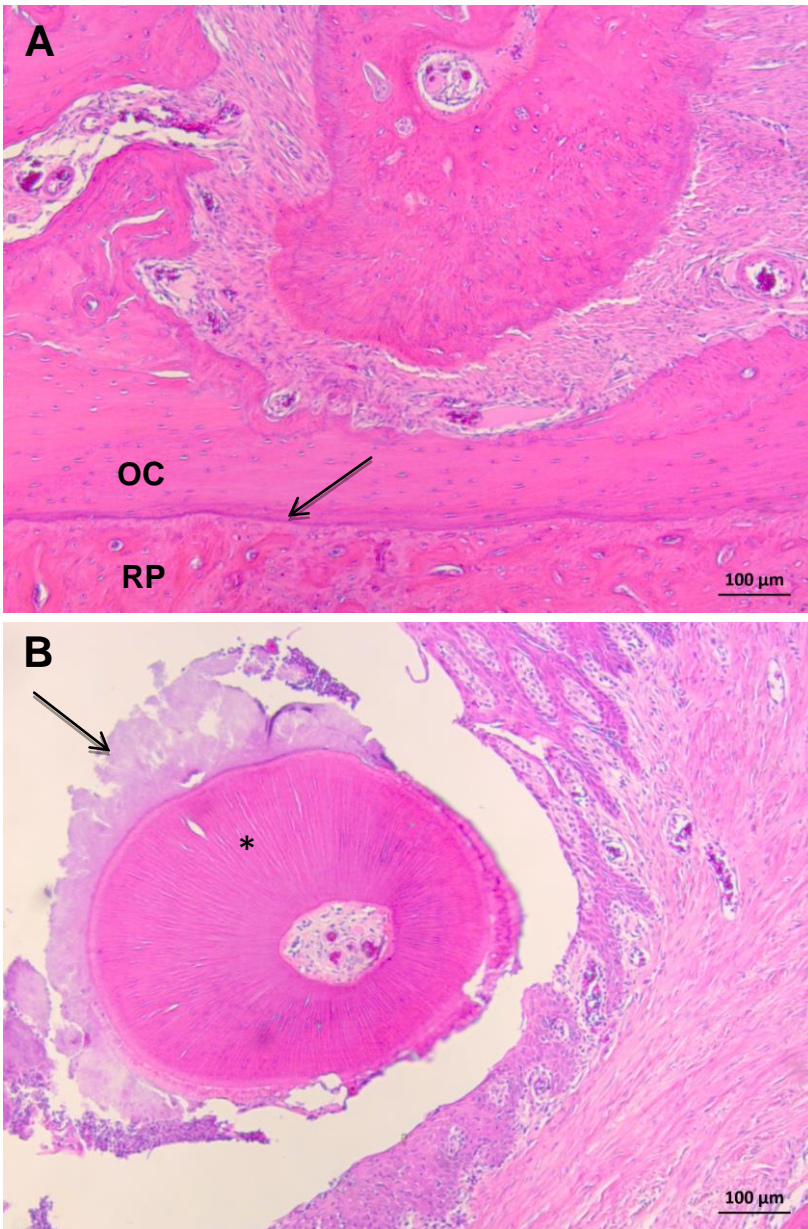


Figura 9. Grupo controle com extração dentária. HE. A: Sobre o osso cortical (OC), presença de reação periosteal (RP). A seta indica o limite ente ambos. B: Biofilme (seta) sobre raiz dentária (asterisco).

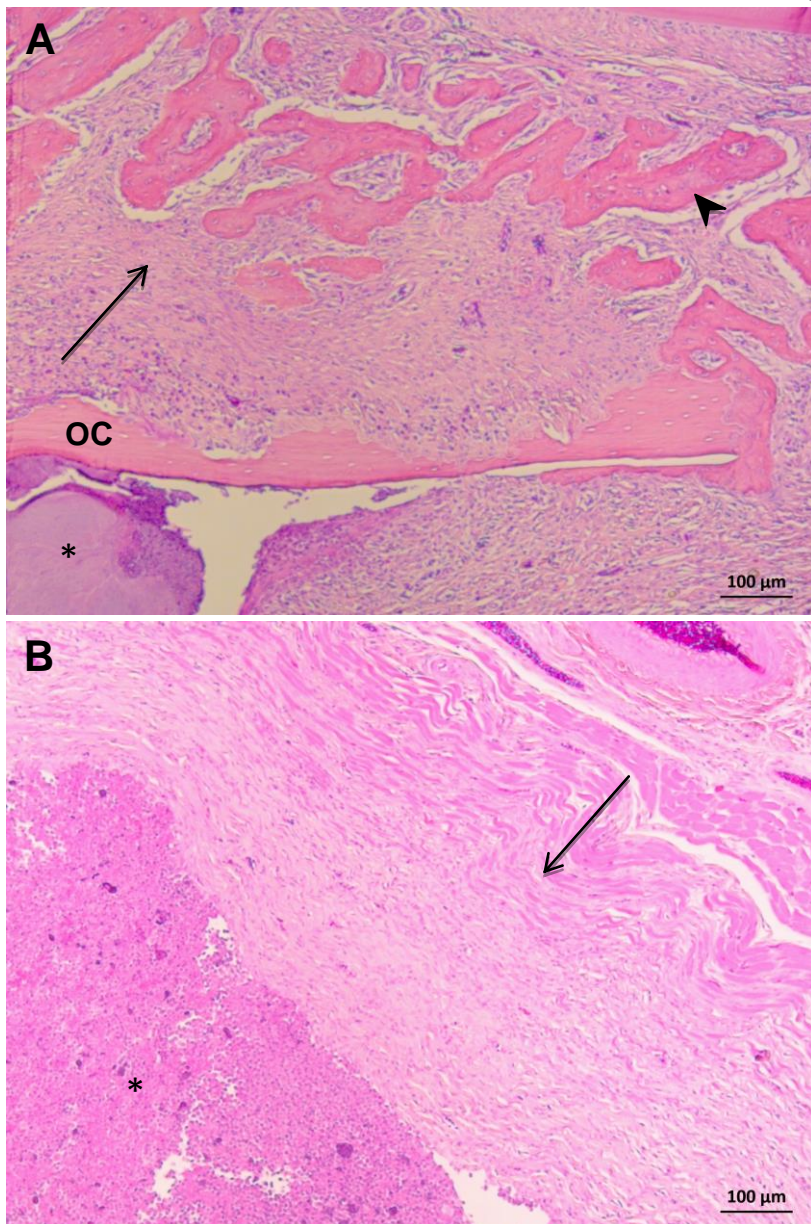


Figura 10. Grupo controle com extração dentária. Osteomielite supurativa. HE. A: Biofilme (asterisco) sobre osso cortical (OC) necrótico. Reabsorção óssea: osso esponjoso sendo reabsorvido (ponta da seta) e substituição por tecido conjuntivo (seta). B: Abscesso envilvido por cápsula fibrosa.

DISCUSSÃO

A MRONJ é uma doença recentemente descrita. O primeiro relato de um paciente com MRONJ foi publicado em 2003.³ Desde então, mais de duas mil publicações sobre osteonecrose por bisfosfonatos estão disponíveis na literatura. A MRONJ em pacientes com osteoporose submetidos ao tratamento com bisfosfonatos intravenosos tem prevalência em torno de 0,005%, podendo variar entre 0% a 0,348%. A incidência de osteonecrose nesses pacientes é de até 90/100.000 pacientes, por ano. Já a prevalência e a incidência da MRONJ em pacientes oncológicos submetidos ao tratamento com bisfosfonatos intravenosos tendem a ser maiores, com valores variando entre 0% a 0,186% e até 12,222 casos por 100.000 pacientes por ano, respectivamente.²²

Embora, a patofisiologia da MRONJ ainda não esteja completamente elucidada, modelos animais podem auxiliar a compreendê-la, uma vez que nestes a análise histopatológica pode ser feita de forma muito mais completa e não restrita apenas a áreas de sequestro ósseo como geralmente ocorre com amostras de pacientes⁹. No entanto, persiste a necessidade de modelos animais melhor caracterizados que possibilitem uma aproximação da condição de osteonecrose encontrada em pacientes²². Grande parte dos modelos animais descritos na literatura apresentam metodologias diferentes e na maioria das vezes associam a administração de bisfosfonatos a outros fatores de risco, terapias e/ou comorbidades. Isso dificulta a comparação entre estudos. Além disso, reduz a confiabilidade do modelo e a reprodução da condição clínica mais comum, que é a MRONJ associada à extração dentária.^{7,10}

Neste trabalho, a administração do zolendronato foi feita em animais associando-se apenas a exodontia como fator de risco, a fim de avaliar os efeitos desta medicação na fisiologia óssea e para verificar o papel do trauma no desenvolvimento da

osteonecrose. Não houve casos de osteonecrose espontânea. No entanto, no grupo dos animais submetidos à exodontia, todos apresentaram quadros morfológicos compatíveis com o descrito para MRONJ. Em todas as lâminas examinadas havia necrose óssea, caracterizada pela presença de lacunas osteocíticas vazias (os chamados osteoplastos), em grande extensão, presença de biofilme, a maioria com formato compatível com colônias de *Actinomyces*. De forma significativa, encontrou-se reação periosteal intensa, em quadro semelhante com o visto em pacientes. A reação periosteal e o tecido fibroso entremeado nas trabéculas ósseas, a presença de osteoclastos, tal como encontrada em nosso trabalho, foram descritos também em outros estudos.^{8,16} Esse fato corrobora os relatos da literatura, que apontam o trauma como um fator de risco importante para o desenvolvimento da MRONJ.^{7,12,23} Diante disso, reforça-se a importância da extração dentária como fator desencadeador de MRONJ em modelos animais.

Em nosso estudo, no grupo experimental submetido à exodontia, verificou-se a presença de inflamação em pontos focais, principalmente em áreas próximas à necrose óssea e biofilme bacteriano. Desta forma, a inflamação não parece ter sido evento significativamente importante na patogênese da doença. Esses dados são diversos dos relatados, mas podem ser creditados ao tamanho da amostra. A presença do biofilme foi, ao contrário, significativa e relevante. Em todas as lâminas examinadas, havia nítidas coleções bacterianas, com morfologia compatível com *Actinomyces* spp. Os biofilmes estavam dispostos na interface óssea, sobre a cortical, próximo às raízes, nos espaços medulares e nos alvéolos pós-extração. Esses dados reforçam o papel do biofilme na etiopatogênese da MRONJ, assim como a extração dentária. Em termos gerais, os achados desse estudo mostraram semelhança com os descritos na literatura.^{7,9,10,19,20}

Na hemimandíbula de um dos animais do grupo experimental que recebeu a medicação e foi submetido à extração dentária, foi observada intensa necrose tecidual, inclusive da polpa dentária do incisivo e dos molares e do tecido conjuntivo presente no tecido ósseo. Este rato foi o único do grupo experimental que recebeu medicação durante oito semanas e foi submetido à extração dentária. São necessárias mais investigações para concluir se esta necrose ocorreu devido a alguma eventual falha no processo de preparo da amostra, danificando-a, ou se o tempo de administração do bisfosfonato é um fator importante para o desenvolvimento desta doença, bem como a sua intensidade.

Os animais do grupo experimental que receberam a medicação, sem a etapa da extração dentária, não apresentaram alterações histopatológicas, caracterizando um quadro de normalidade tecidual. Em um estudo utilizando um modelo animal de indução de MRONJ em ratos que receberam Zolendronato e Pamidronato mas não foram submetidos à extração dentária, os autores encontraram discreto infiltrado inflamatório, necrose de tecidos moles além de alterações ósseas relacionadas à medicação. Os autores encontraram lacunas osteocíticas vazias e infiltrado inflamatório misto invadindo o epitélio em 40% da amostra. Dois animais, nesse estudo, preencheram os critérios de osteonecrose.²⁴ Esses resultados são divergentes dos encontrados em nosso estudo, possivelmente devido a diferenças na dosagem utilizada ou ao reduzido tamanho da nossa amostra. Esse tópico alerta para a necessidade de padronização das metodologias, para facilitar a comparação.

Em um animal do grupo controle, sem medicação e com exodontia, alguns abscessos foram visualizados, variando em extensão. Dois destes abscessos estavam localizados próximo a glândula salivar, com perda de tecido acinar e persistência ductal. As alterações verificadas nas hemimandíbulas das ratas

deste grupo submetidas à extração dentária podem ter ocorrido devido à fratura de raízes durante o procedimento cirúrgico e/ou infecção secundária. A incerteza da origem do processo inflamatório é um fator limitante, inclusive descrita em outro estudo.²⁴ A presença de abscesso em grupos controles semelhantes foi descrita em outro estudo.⁷ De forma significativa, encontrou-se reação periosteal, focos de necrose óssea e áreas de remodelação óssea nos ratos do grupo controle, embora escassa. Além disso, em um dos ratos do grupo controle, a formação de tecido fibroso foi intensa. Esse quadro sugere o diagnóstico de osteomielite, conforme descrito na literatura.¹⁵ A presença de reação periosteal nesse grupo não encontra justificativa a não ser a inferência que o trauma atuou como indutor do desenvolvimento de respostas teciduais frente a estímulos de baixa intensidade. As características morfológicas dos animais do grupo controle sem exodontia foram compatíveis com os padrões de normalidade.

A reação periosteal é uma reação do osso cortical frente a determinados estímulos. A apresentação bilateral desta condição normalmente está associada a algum estímulo de natureza sistêmica. Já uma manifestação unilateral, geralmente está associada a estímulos locais, como trauma e infecção.²⁵ A presença da reação periosteal nas hemimandíbulas de ratas dos grupos experimental e controle submetidas à exodontia pode ser justificada por fatores como trauma e infecção que estiveram presentes em ambos os grupos e as hemimandíbulas contralaterais não apresentaram este tipo de reação. Isso demonstra que neste presente estudo, a reação periosteal aparentemente está mais associada a estímulos locais do que com a administração da medicação. Entretanto, não podemos ainda afirmar que o uso do bisfosfonato não foi importante para o desenvolvimento da reação periosteal.²⁵

A principal região analisada microscopicamente, conforme demonstrado na figura 4, foi escolhida por englobar a

área dos molares. Além disso, nesta área há osso esponjoso, cortical e medula óssea ou raízes dentárias, osso alveolar e ligamento, a depender da posição do corte. Essa escolha se deu pela riqueza anatômica e por permitirem a analogia com as imagens microtomográficas. As hemimandíbulas analisadas neste trabalho foram submetidas ao escaneamento microtomográfico. Na análise microtomográfica, as hemimandíbulas dos animais controles não apresentaram alterações, à semelhança dos achados microscópicos. Nos animais do grupo experimental submetidos à extração dentária, havia lesão osteolítica, com ou sem rompimento da cortical óssea e reação periosteal, o que foi confirmado em nossos achados histopatológicos.²¹

Esse estudo apresentou limitações. Inicialmente tentou-se preparar todas as amostras disponíveis, porém, por questões de disponibilidade técnica, dificuldades laboratoriais, nem toda a amostra foi processada. Assim, as maxilas não fizeram parte dessa análise. Esse fato, embora seja limitante, representa a maioria das situações descritas em pacientes, nos quais a MRONJ é mais comum na mandíbula. A perda de alguns animais contribuiu para esse quadro, mas a literatura evidencia as dificuldades técnicas envolvidas no desenrolar de trabalhos com animais e apresenta amostras com quantitativo semelhante.

CONCLUSÃO

As alterações histopatológicas observadas nesse estudo foram compatíveis com alterações características da MRONJ descritas em outros trabalhos presentes na literatura. Os principais achados histopatológicos foram observados nas hemimandíbulas em que houve a extração do primeiro molar inferior e a administração de medicação zolendronato. Estes resultados demonstram o impacto que a extração dentária possui

no desenvolvimento da MRON. Além disso, o biofilme também foi um fator importante na etiopatogenia da doença. Neste estudo não foram observadas alterações histopatológicas significativas nas hemimandíbulas sem extração dentária.

Uma vez que a criação de modelos animais de indução da MRONJ e a conseqüente análise histopatológica podem auxiliar na compreensão da patogênese da doença, sugere-se que mais estudos sejam desenvolvidos.

REFERÊNCIAS

1. Russel RG. Bisphosphonate: the first 40 years. *Bone* 2011; 49:2-19.
2. Badel T, Pavicin IS, Carek AJ, Rosin-Grget K, Grbesa D. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate. *Coll Antropol.* 2013;37:645-51
3. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61:1115-7.
4. Rosen HN. Pharmacology of Bisphosphonates. UptoDate. 2015. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/pharmacology-of-bisphosphonates>> Acesso em: 16 jul. 2015
5. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O'Ryan F. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72:1938-56.
6. Fliefel R, Tröltzsch M, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-

related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 44:568-85.

7. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014;42:744-50.
8. Bedogni A, Blandamura S, Lokmic Z, Palumbo C, Ragazzo M, Ferrari F, Tregnaghi A, Pietrogrande F, Procopio O, Saia G, Ferretti M, Bedogni G, Chiarini L, Ferronato G, Ninfo V, Lo Russo L, Lo Muzio L, Nocini PF. Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105:358-64.
9. Biasotto M, Chiandussi S, Zacchigna S, Moimas S, Dore F, Pozzato G, Cavalli F, Zanconati F, Contardo L, Giacca M, Di Lenarda R. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med.* 2010;39:390-6.
10. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, S Bastos A, Guimarães M, Marcantonio E Jr. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol.* 2013;94:65-73.
11. Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, Yatani H, Yoneda T. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab.* 2010;28:165-75.
12. Ağaçayak KS, Yuksel H, Atilgan S, Koparal M, Uçan MC, Özgöz M, Yaman F, Atalay Y, Acikan I. Experimental investigation of

- relationship between trauma and bisphosphonate-related osteonecrosis. *Niger J Clin Pract.* 2014;17:559-64
13. Ruggiero SL. Guidelines for the diagnosis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2007;4:37-42.
 14. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol.* 2009;144:667-76.
 15. Marx RE, Tursun R. Suppurative osteomyelitis, bisphosphonate induced osteonecrosis, osteoradionecrosis: a blinded histopathologic comparison and its implications for the mechanism of each disease. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41:283-9
 16. Franco-Pretto E, Pacheco M, Moreno A, Messa O, Gnecco J. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: clinical, imaging, and histopathology findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;118:408-17.
 17. Hansen T, Kunkel M, Weber A, James Kirkpatrick C. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. *J Oral Pathol Med.* 2006;35:155-60.
 18. Biasotto M, Chiandussi S, Zacchigna S, Moimas S, Dore F, Pozzato G, Cavalli F, Zanconati F, Contardo L, Giacca M, Di Lenarda R. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med.* 2010;39:390-6.
 19. Marino KL, Zakhary I, Abdelsayed RA, Carter JA, O'Neill JC, Khashaba RM, Elsalanty M, Stevens MR, Borke JL. Development of a rat model of bisphosphonate-related

- osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *J Oral Implantol.* 2012;38:511-8.
20. Maahs MP, Azambuja AA, Campos MM, Salum FG, Cherubini K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head Neck.* 2011;33:199-207
 21. Luz, FO. Modelo Animal de Indução de Osteonecrose por Uso de Bisfosfonatos em Ratos com Análise Microtomográfica. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília. Brasília 2013
 22. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res.* 2015 ;30:3-23. (Até 6)
 23. Yang H, Pan H, Yu F, Chen K, Shang G, Xu Y A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:5161-7.
 24. Senel FC, Kadioglu Duman M, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S, Gunhan O. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109:385-91.
 25. Rana RS, Wu JS, Eisenberg RL. Periosteal reaction. *AJR Am J Roentgenol.* 2009;193:W259-72.

NORMAS DA REVISTA

Section Scope Statements

The *Oral and Maxillofacial Surgery Section* aims to publish an extensive range of original articles that advances patient care through enhanced understanding of diagnosis, surgical and adjunctive treatment of diseases, and injuries and defects involving both the functional and esthetic aspects of the hard and soft tissues of the oral and maxillofacial regions. The section also seeks research regarding both the basic science of and management of persons with oral and maxillofacial conditions. Articles presenting ethical, original, well-documented, and reproducible research are given preference.

The *Oral Medicine Section* aims to publish a broad range of original articles that help clinicians understand more thoroughly the pathobiology, etiology, diagnosis, prevention, and management of oral conditions related to underlying medical conditions, including diseases of the head, neck, and oral mucosal structures, orofacial pain conditions, salivary gland disorders, and taste disorders. The section also seeks research regarding the dental management of persons with medical problems and/or complicated medical conditions. The published findings must contribute substantively to the body of oral medicine literature and should lead to improved clinical decision-making and enhanced care of medically-related disorders or conditions affecting the oral and maxillofacial region. Articles presenting original, well-documented, and reproducible research are preferred.

The *Oral and Maxillofacial Pathology Section* encourages the

submission of original articles of high scientific quality that investigate the pathogenesis, diagnosis, and management of diseases affecting the oral and maxillofacial region. Submitted manuscripts may summarize findings from clinical, translational, or basic research in the broad field of oral and maxillofacial pathology but must contribute substantively to the body of knowledge in this field and should be of obvious clinical and/or diagnostic significance to the practicing oral and maxillofacial pathologist. Areas of focus may include the investigation of disease pathogenesis, the diagnosis of disease using microscopic, clinical, radiographic, biochemical, molecular, or other methods as well as the natural history and management of patients with various conditions of the head, neck, and oral mucosal structures. Diagnostic accuracy studies should conform to the principles of the STARD document ☞ <http://www.stard-statement.org>. Articles presenting novel and reproducible research that introduce new knowledge and observations are especially encouraged. This section also welcomes the submission of topical review papers on relevant subjects.

The *Oral and Maxillofacial Radiology Section* publishes original peer-reviewed contributions to the advancement of diagnostic clinical oral and maxillofacial radiology and related imaging sciences. The section considers original clinical and experimental research papers, technological developments, extensive systematic reviews of the literature, comprehensive pictorial reviews, special reports, and invited papers on subjects that will appeal to clinicians involved in the diagnostic imaging of hard and soft tissue maxillofacial pathology, selection criteria, computer-assisted diagnosis, craniofacial analysis, image-guided surgical navigation, image processing, dosimetry, radiation physics, biology, and safety.

The section also seeks extensive case series representing various expressions of particular conditions, descriptions of

innovative imaging technique applications to these series, and description of novel imaging features to assist imaging specialists develop clinical protocols and interpretive knowledge based on multiple observations. Only papers contributing substantively to the body of knowledge in oral and maxillofacial imaging and performed with scientific rigor will be considered. These papers should assist clinicians in developing evidence-based practice and provide improved clinical decision-making regarding the performance of specific techniques and interpretation of resulting images affecting the oral and maxillofacial region. Diagnostic accuracy studies should conform to the principles of the STARD document (☞ <http://www.stard-statement.org>).

Types of Papers

1. Original Research Article. Reports of original research (preclinical, clinical, or translational) that are well-documented, novel, and significant. Original research manuscripts will be organized into six parts: (1) Abstract; (2) Introduction; (3) Materials and Methods; (4) Results; (5) Discussion; (6) References.
2. Review article. Manuscripts that review the current status of a given topic, diagnosis, or treatment. These manuscripts should not be an exhaustive review of the literature but rather should be a review of contemporary thought with respect to the topic. Systematic reviews and meta-analyses manuscripts should follow PRISMA (☞ <http://www.prisma-statement.org>) and the Institute of Medicines' guidelines (☞ <http://www.iom.edu/Reports/2011/Finding-What-Works-in-Health-Care-Standards-for-Systematic-Reviews/Standards.aspx>).
3. Clinicopathologic Conference (CPC). Manuscripts that document interesting, challenging, or unusual cases that present

unexpected or interesting diagnostic challenges. The presentation should simulate clinical work-up, including the formulation of a detailed and well thought out differential diagnosis. The complete diagnostic evaluation, management, and follow-up must be included. CPC articles must be organized into six parts: (1) Title: Provide a descriptive clinical title that does not reveal the final diagnosis. (2) Clinical presentation: Describe the clinical and imaging characteristics of the lesion. Use clinical photographs and radiographs as appropriate. (3) Differential diagnosis: List and discuss lesions to be considered as reasonable diagnostic possibilities. The authors are reminded that the most important part of the CPC manuscript is the clinical differential diagnosis, where the authors guide the readership through their own diagnostic thought process. This will require the formulation of a list of the most probable diagnostic possibilities (ideally at least 5-6 entities) based on the clinical presentation, medical history, and/or radiographic studies. (4) Diagnosis: Histopathologic findings illustrated with appropriate photomicrographs. (5) Management: Describe the treatment of the patient and response to treatment. (6) Discussion: Concentrate on the most interesting aspect(s) of the case. No abstract is needed for CPC manuscripts.

4. Medical Management and Pharmacology Update (MMPU). This section is intended to provide concise, current reviews of medical problems and how they relate to dentistry. Manuscripts should include a good review of the clinical aspects of the disease, stressing the impact of the disease on the dental management and dental treatment of the patient. Emphasis should be placed on new developments, new research, or new approaches to therapy or management. Manuscripts should not be an exhaustive review of the literature but rather a review of contemporary thought with respect to the topic. Likewise, the bibliography need not be all inclusive but rather should include

only seminal, contemporary references deemed by the author to be most pertinent. The desired format for manuscripts submitted for the MMPU section includes: (1) abstract; (2) topic introduction/overview; (3) epidemiology/demographics; (4) etiology and pathogenesis; (5) clinical presentation/physical findings; (6) diagnosis (laboratory tests, diagnostic imaging, etc.); (7) medical management and treatment; (8) complications; (9) prognosis; oral manifestations/dental implications and significance; and (10) dental management (of patients with the disease). Manuscripts should not exceed 12 pages in 12-point, double-spaced Times New Roman (tables and figures count toward the 12-page limit).

5. Pharmacology Update is a component of the MMPU section that offers the reader the opportunity to obtain concise information regarding drugs used in the practice of medicine, clinical dentistry, and dental specialties. Manuscripts should present clearly and concisely the background information regarding the disease or condition that is managed, the indications, rationale for and approved uses of the specific drugs or class of drugs, the advantages and benefits of the drug or drug class over previous drugs, mechanism of action, criteria for selection, usual dosage, pharmacokinetics, adverse effects, drug interactions, and oral health and dental management considerations. Emphasis should be placed on new developments, effectiveness in clinical trials, therapeutic outcomes, and safety. Manuscripts should reflect contemporary thought with respect to the topic. Use of figures to illustrate the mechanism of action and tables to present therapeutic outcomes, drug interactions, and adverse effects are encouraged. Manuscripts should utilize the MMPU categories for formatting the paper. Text should not exceed 3,000 words. Font should be 12-point, double-spaced Times New Roman. A maximum of 50 references is recommended.

6. Case Reports. These types of publications often add little to the scientific knowledge base. However, excellent case reports may be published as online only papers if they meet certain criteria, such as: (1) rare or unusual lesions/conditions that need documentation, (2) well-documented cases showing unusual or "atypical" clinical or microscopic features or behavior, or (3) cases showing good long-term follow-up information, particularly in areas in which good statistics on results of treatment are needed. A case report should either present unique features of the condition or lesion, novel treatment regimens, or provide the basis for a new plausible medical theory about the pathogenesis of a particular disease or condition so clinicians can provide better care regarding patients with chronic and painful conditions relevant to medical disorders and/or medical therapy.

General inquiries and communications regarding editorial management should be addressed to Alice M. Landwehr, Managing Editor: tripleOjournal@gmail.com.

General correspondence to the Editor-in-Chief, Mark W. Lingen, DDS, PhD: Mark.Lingen@uchospitals.edu

Publisher-specific inquiries should be addressed to: Jane Ryley, Elsevier Inc., 3251 Riverport Lane, Maryland Heights, MO 63043; e-mail: J.Ryley@Elsevier.com.

Issue Manager, Jill Shepherd. Telephone: (352) 483-8113; fax: (352) 483-3417; e-mail: J.Shepherd@Elsevier.com.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see [see](#) <http://www.elsevier.com/publishingethics> and

<http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

If there is any overlap between the submission and any other material, published or submitted, detail the nature of and reason for the overlap for the editors' assessment. Although poster presentations and abstracts are not considered duplicate

publication, they should be stated on the title page. Further information about Elsevier's standards for publication ethics is available at http://www.elsevier.com/wps/find/intro.cws_home/ethical_guidelines.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

All authors must have seen and approved the submission of the manuscript and be willing to take responsibility for the entire manuscript. All persons listed as authors must meet the criteria for authorship according to the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication" available at www.icmje.org. All persons who are identified as authors must have made substantial contribution to the manuscript through significantly contributing to the conception, design, analysis or interpretation of data; drafting or significantly revising the manuscript; and providing final approval of the manuscript throughout all its iterations. All three of these conditions must be met by each author. No additional authors can be added after submission unless editors receive agreement from all authors and detailed information is supplied as to why the author list should be amended. Persons who contribute to the effort in supporting roles should not be included as authors; they should be acknowledged at the end of the paper (see Acknowledgments below).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE, <http://www.icmje.org>) recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices,

behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Clinical trial results

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete

a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see [☞ http://www.elsevier.com/copyright](http://www.elsevier.com/copyright)). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult [☞ http://www.elsevier.com/permissions](http://www.elsevier.com/permissions)). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult [☞ http://www.elsevier.com/permissions](http://www.elsevier.com/permissions).

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see [☞ http://www.elsevier.com/OAauthoragreement](http://www.elsevier.com/OAauthoragreement)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see [☞ http://www.elsevier.com/openaccesslicenses](http://www.elsevier.com/openaccesslicenses)).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see [☞ http://www.elsevier.com/copyright](http://www.elsevier.com/copyright).

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for

the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a

translation), include in a collective work (such as an anthology), text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

The open access publication fee for this journal is USD 1850, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy:<http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

The open access publication fee for this journal is \$3,000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and begins from the publication date of the issue your article appears in.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in standard, grammatical English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (☞ <http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (☞ <http://support.elsevier.com>) for more information. Such assistance does not guarantee acceptance but may enhance the review, improve the chance of acceptance, and reduce the time until publication if the article is accepted.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the *Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals*, ☞ <http://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/tripleo>.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on

Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class *elsarticle.cls* (<http://www.ctan.org/tex-archive/macros/latex/contrib/elsarticle>) to prepare your manuscript and BibTeX (<http://www.bibtex.org>) to generate your bibliography.

For detailed submission instructions, templates and other information on LaTeX, see <http://www.elsevier.com/latex>.

Article structure

Essential Title Page Information

The title page of the manuscript should include the title of the article, the full name of the author(s), academic degrees, positions, and institutional affiliations. The corresponding author's address, business and home telephone numbers, fax number, and e-mail address should be given. Disclosures must appear on the title page (see *Disclosures*).

- *Title.* Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- *Author names, academic degrees, positions, and institutional affiliations.* Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter

immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- *Corresponding author.* Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- *Present/permanent address.* If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

- Disclosures must appear on the title page (see "Conflict of Interest" above).

Include on the title page a word count for the abstract (if relevant to article type), a complete manuscript word count (to include body text and figure legends), number of references, number of figures/tables, and number of supplementary elements, if any.

Statement of Clinical Relevance

For Original research, Review, and MPMU manuscripts, please provide a brief statement of no more than 40 words that succinctly summarizes the clinical relevance of the findings described in your manuscript.

For example:

"The risk of postoperative bleeding complications in patients in whom anticoagulation is continued for dental surgery is exceedingly small and is outweighed by the small risk of serious and sometimes fatal embolic events when anticoagulation is interrupted for dental surgery." (Wahl et al. 119(2) doi:10.1016/j.oooo.2014.10.011)

Abstract

A structured abstract, limited to 200 words, must be used for data-based research articles. The structured abstract is to contain the following major headings: Objective(s); Study Design; Results; and Conclusion(s). The Objective(s) reflects the purpose of the study, that is, the hypothesis that is being tested. The Study Design should include the setting for the study, the subjects (number and type), the treatment or intervention, and the type of statistical analysis. The Results include the outcome of the study and statistical significance if appropriate. The Conclusion(s) states the significance of the results. For nondata-based submissions, the abstract should be an unstructured summary of less than 150 words. No abstract is needed for submissions to the CPC section.

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into the following clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the problem being investigated, summarize the existing

knowledge to place the problem in context, and describe the hypothesis and general experimental design. Avoid a detailed literature survey or a summary of the results.

Materials and Methods

As relevant, the Materials and Methods section should describe in adequate detail the experimental subjects, their important characteristics, and the methods, apparatus, and procedures used so that other researchers can reproduce the experiment. When the manuscript submitted reports on research in which humans are involved as experimental subjects directly or indirectly, the Materials and Methods section must indicate that the protocol was reviewed by the appropriate institutional review board (IRB), is in compliance with the Helsinki Declaration, and that each subject in the project signed a detailed informed consent form. Authors should verify compliance with the Health Insurance Portability and Accountability Act of 1996 (HIPAA) before submission. Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference; only relevant modifications should be described.

Animals. Please indicate that protocols were reviewed by the appropriate institutional committee with respect to the humane care and treatment of animals used in the study.

Results

Results should be clear and concise and presented in a logical sequence. Tables and illustrations may be helpful in clarifying the findings and can reduce the length of the manuscript.

Discussion

The Discussion states the significance of the results and limitations of the study. Authors should discuss their findings in the framework of previously published research. They should explain why their results support or contradict existing knowledge. If appropriate, the authors may suggest further research to follow up on their findings.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Dental Nomenclature. Because of competing dental nomenclature systems, confusion can be eliminated by identifying teeth by their name, rather than a number or letter. Be consistent throughout the manuscript.

In tables, use the Universal Numbering System to identify the teeth. For example, the maxillary right permanent lateral incisor is designated tooth 7. The mandibular right deciduous second molar is designated tooth T. Identify the numbers/letters in the footnote to the table like any other abbreviations.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Acknowledgments

The names of persons who have contributed substantially to a manuscript but who do not fulfill the criteria for authorship, along with their conflicts of interest, funding sources, and industry relations, if relevant, are to be listed in the Acknowledgment section. This section should include individuals who provided any writing, editorial, statistical assistance, etc. Collate acknowledgments in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. Do not include statements of the authors' funding, conflicts, or other disclosures in the Acknowledgments; these must appear on the title page.

References

Citation in text

References should be complete and reflect the current state of knowledge on the topic. Make sure all references have been verified and are cited consecutively in the text (not including tables) by superscript numbers. The reference list should be typed double-spaced on a separate page of the manuscript file

and numbered in the same order as the reference citations appear in the text.

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not to be cited in the reference list but are to be cited in parentheses at the appropriate place in the text. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication, and publication information must be updated if the manuscript is accepted.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

If accepted, the reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Make sure the information in each reference is complete and correct. To see the format used by the journal, refer to a recent issue.

Journal abbreviation source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Mendeley

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/oral-surgery-oral-medicine-oral-pathology-and-oral-radiology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Artwork

Electronic artwork

Illustrations should be numbered with Arabic numerals in the order of appearance in the text and accompanied by suitable legends (see Figure Captions).

A reasonable number of halftone illustrations or line drawings will be reproduced at no cost to the author. At the editors' discretion, color illustrations may be published in grayscale with the color image available in the online edition of the Journal; elaborate tables and extra illustrations, if accepted, may also appear as supplementary material in the online edition only. Typewritten or freehand lettering on illustrations is not acceptable. All lettering must be done professionally, and letters should be in proportion to the drawings or photographs on which they appear.

Figures must be submitted in electronic figure file format. For best reproduction, images should be submitted in .tif format. Figures in .jpg format may be acceptable if they meet minimum resolution guidelines. Images embedded in programs such as PowerPoint or Word will not be accepted. Photographic images must be submitted at 300 ppi (pixels per inch) with the following dimensions: Full page 5" wide (1,500 pixels wide) or half page 3" wide (900 pixels wide). Screen capture resolutions (typically 72 ppi) will not provide adequate reproduction quality. Line-art images (charts, graphs) must be submitted at 1200 ppi with the following dimensions: Full page 5" wide (6000 pixels wide) or half page 3" wide (3600 pixels wide).

Avoid background gridlines and other formatting that do not convey information (e.g., superfluous use of 3-dimensional formatting, background shadings). All images should be cropped to show only the area of interest and the anatomy necessary to establish a regional frame of reference. Although multipart figures are not preferred, if they are used, label multipart figures with capital letters (e.g., A, B, C, etc); do not exceed nine parts to one figure. If images are to be combined in one figure, they should be the same height and magnification to facilitate reproduction.

For advice on image enhancement and annotation refer to Corl

FM, et al. A five-step approach to digital image manipulation for the radiologist. *RadioGraphics* 2002;22:981-992.

For further information, please see [☞ www.elsevier.com/artwork](http://www.elsevier.com/artwork).

See also *Permissions*.

Color artwork

If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. For further information on the preparation of electronic artwork, please see [☞ http://www.elsevier.com/artworkinstructions](http://www.elsevier.com/artworkinstructions). Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print), please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's [WebShop](http://webshop.elsevier.com/illustrationservices) ([☞ http://webshop.elsevier.com/illustrationservices](http://webshop.elsevier.com/illustrationservices)) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Each illustration must be accompanied by a legend. These should

be typed double-spaced on a separate page. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. If an illustration has been taken from published or copyrighted material, the legend must give full credit to the original source and accompanied by signed, written permission from the copyright holder (see *Permissions* below).

Artwork: General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations to appear as a separate page in the manuscript file.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 ppi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1200 ppi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Tables

Number tables consecutively using Roman numerals in accordance with their appearance in the text.

Each table should be submitted as a separate file. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. All table reference citations should be repeats of numbers assigned within the text, not initial citations. A concise title should be supplied for each table. All columns should carry concise headings describing the data therein. Type all footnotes immediately below the table and define abbreviations (see also Dental Nomenclature above). If a table or any data therein have been previously published, a footnote to the table must give full credit to the original source and accompanied by signed, written permission from the copyright holder (see *Permissions* below).

Supplementary Data

To save print pages and/or shorten an article to a readable length while allowing for detailed information to be available to interested readers, authors are encouraged to provide information that is essential for the discussion of the results of the submission in the submission itself and utilize supporting information to describe experimental details and nonessential but useful information as Supplementary Material. If the manuscript is accepted for print publication, a reference to the online material will appear in the print version.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Upload material, figures, and tables for online publication under the submission item "Supplementary Material" through the EES system. Be sure to change the description of the Supplementary Material to reflect the content; for example, Supplementary Detailed Methodology, Supplementary Figure Sx, Supplementary Table Sx.

Please order material such as Figures and Supplemental Figures separately in order of the callouts/first mentions in the text. For example: Figure 1, Figure 2; Supplemental Figure S1, Supplemental Figure S2, etc.

In the text be sure that you add behind the reference to the supplemental material "(Supplemental Table Sx; available at [URL/link*])." *To be provided by the production department.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief,

webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

NEW! Virtual Microscope Feature

After submission of your paper, if it contains conventional slide images, you may receive an invitation to complement the slide images with high resolution versions for use with the Virtual Microscope. After accepting the invitation, you will have the opportunity to upload the high resolution slide images using the Virtual Microscope authoring system and will receive instructions on how to include references to the high resolution slides in your manuscript. Readers of your final, published paper will be able to see the slides at their highest resolution using the Virtual Microscope and can link from the article straight to the slides. For more information about the Virtual Microscope: <http://www.elsevier.com/about/content-innovation/virtual-microscope>.

For uploading of the slide images or for support, please contact virtualmicroscope@elsevier.com

Imaging Data DICOM Viewer

If your paper contains images generated from DICOM data, you may receive an invitation from the Section editor(s) after submission inviting you to complement your online article by providing volumetric radiological data of a case, a specific

example, or multiple datasets in DICOM format. Readers will be able to interact, adjust, display, and view the DICOM data using an interactive viewer embedded within your article. Specifically, the viewer will enable users to explore the DICOM data as 2D orthogonal MPR series, 3D volume rendering and 3D MIP. Specific enhancements include zoom, rotate and pan 3D reconstructions, section through the volume, and change opacity and threshold level. Each DICOM dataset will have to be zipped in a folder and uploaded to the online submission system via the "DICOM dataset" submission category. The recommended size of a single uncompressed dataset is 200 MB or less. Please provide a short informative description for each dataset by filling in the 'Description' field when uploading each ZIP file. Note: All datasets will be available for download from the online article on ScienceDirect, so please ensure that all DICOM files are anonymized before submission. For more information see: <http://www.elsevier.com/about/content-innovation/radiological-data>

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products,

including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction [pages](http://www.elsevier.com/artworkinstructions) at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Permissions

Upload written permissions from the copyright holder to republish previously published material. Authors are responsible for obtaining and uploading any needed permissions and for clearly and completely identifying any overlapping material and/or quoted or paraphrased passages with proper attribution in the text to avoid plagiarism (including self-plagiarism). The Permissions FAQ for Authors is available at <http://www.elsevier.com/authors/permission-seeking-guidelines-for-elsevier-authors>. For assistance, please contact Elsevier's Permissions Helpdesk: +1-800-523-4069 x 3808; +1-215-239-3805; permissionshelpdesk@elsevier.com

Written, signed permission(s) from the patient or legal guardian is/are required for publication of recognizable photographs. Clearly state in your cover letter that patient consent has been obtained and is immediately available upon request. If it is impossible to obtain a consent form, the image(s) must be removed or sufficiently cropped to the area of interest only or otherwise changed so the patient cannot be recognized. However, blurring or placing bars over the eyes is no longer acceptable to eliminate the need for a signed consent form. The restrictions for photos have become very strict.

Letters to the Editor

Letters to the Editor should be a succinct comment pertaining to a paper(s) published in the Journal within the past year or to related topics. Provide a unique title for the Letter on the title page with complete contact information for the author(s). Double-space the text of the Letter. References, including reference to the pertinent article(s) in the Journal, should conform to style for manuscripts (see *References*). If accepted, the author(s) of the pertinent article(s) may be contacted to prepare a response to the comment.

Announcements

Announcements must be received by the Editorial Office at least 10 weeks before the desired month of publication. Items published at no charge include those received from a sponsoring society of the Journal; courses and conferences sponsored by state, regional, or national dental organizations; and programs for the dental profession sponsored by government agencies. All other announcements selected for publication by the Editor carry a charge of \$60 US, and the fee must accompany the request to publish.

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution

microscopic images with their readers. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/about/content-innovation/virtual-microscope>. Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

- Letter of submission, to include disclosure of any previous publications or submissions with any overlapping information
- Statement of clinical relevance (uploaded separately)
- Title page
- Title of article
- Full names(s), academic degree(s), affiliation(s) and titles of author(s)
- Author to whom correspondence, proof, and reprint requests are to be sent, including address and business and home telephone numbers, fax number, and e-mail address
- Any conflict of interest statement(s), disclosure(s), and/or financial support information, including donations
- Word count for the abstract (if relevant to article type), a complete manuscript word count (to include body text and figure legends), number of references, and number of figures/tables
- Structured abstract (double-spaced as part of manuscript file), as relevant to article type
- Article proper (double-spaced)

- ___ Statement of IRB review and compliance with Helsinki Declaration (stated in Methods section of manuscript, as relevant)
 - ___ References (double-spaced on a separate page of the manuscript file)
 - ___ Figure legends (double-spaced, on a separate page of the manuscript file)
 - ___ Tables (double-spaced, uploaded separately as word processing [eg, .doc] files)
 - ___ Illustrations, properly formatted (uploaded as separate files)
 - ___ Video/computer graphics, properly formatted (uploaded as separate files)
 - ___ Signed permission to reproduce any previously published material, in all forms and media (scanned in as a file and uploaded as Permission)
 - ___ Signed permission to publish photographs of identifiable persons from the individual or legal guardian specifying permission in all forms and media (scanned in as a file and uploaded as Permission)
- For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alphanumeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

☞ <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author or a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 9 (or higher) available free from ☞ <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: ☞ <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.