

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Departamento de Odontologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Modulação do processo de reparo em modelo *in vitro* de
osteorradiocrose: um estudo piloto**

Bruna Bastos Silveira da Silva

Brasília, 05 de julho de 2023

Bruna Bastos Silveira da Silva

**Modulação do processo de reparo em modelo *in vitro* de
osteorradionecrose: um estudo piloto**

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.

Orientadora: Prof.^a Dra. Eliete Neves da Silva Guerra

Coorientadora: Doutoranda Juliana Amorim dos Santos

Brasília, 2023

Bruna Bastos Silveira da Silva

**Modulação do processo de reparo em modelo *in vitro* de
osteorradiocrose: um estudo piloto**

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

Data da defesa: 05 de julho de 2023

Banca examinadora:

Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra (Orientadora)

Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende (Membro Titular)

Profa. Dra. Nailê Damé Teixeira (Membro Titular)

Doutoranda Mylene Martins Monteiro (Suplente)

À minha família e ao meu noivo, meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a vida e me sustenta todos os dias. Agradeço por tantas bênçãos recebidas e por Sua mão que me guia com tanto cuidado.

A Nossa Senhora, Mãe de Deus e minha mãe, a quem sou consagrada. Em especial, agradeço ao título de Nossa Senhora Três Vezes Admirável de Schoenstatt, a quem sou devota desde criança e que sempre atende às minhas súplicas e é minha advogada e intercessora junto a Deus. Sou muito grata por ter uma mãe tão atenta e que me lembra todos os dias o quanto sou amada. Nada disso teria sido possível sem esse conforto e auxílio.

Aos meus pais, Bárbara e Aidano, que tanto se sacrificam por mim. Agradeço muito por tudo que fizeram e ainda fazem para que eu pudesse estudar e me desenvolver sempre com as melhores condições. Agradeço ao meu pai que sempre fez tudo por mim e nunca me deixou que faltasse nada. Agradeço à minha mãe que me ajuda de forma diária, que percebe tudo que preciso e esteve sempre me apoiando. Agradeço muito o suporte físico, emocional e espiritual que sempre tive em casa. Obrigada por serem os primeiros a terem acreditado no meu potencial e por me amarem de tantas formas.

Ao meu irmão, Danilo, que é o meu grande amigo e companheiro em casa. Sou muito grata pelo seu amor e apoio incondicional, sei que posso contar com seu ombro amigo e seu abraço fraterno em todos os momentos da minha vida. E aproveito para agradecer à minha família por sempre relevar e ter empatia com minhas ausências e minhas ansiedades.

Ao meu noivo, Gabriel, que é o meu melhor amigo desde o ensino médio e meu maior admirador. Agradeço muito seu incentivo e amparo em todos os momentos, às vezes me sinto envergonhada diante de tamanho cuidado e amor que Deus me revelou através de você. Obrigada por me dar apoio, suporte e incentivo todos os dias e me lembrar sempre de que “é justo que muito custe o que muito vale”. Os dias se tornam mais leves tendo um homem como você. Obrigada por tudo que você é e faz por nós. Não vejo a hora de iniciarmos nossa família.

À minha família, que são meus grandes incentivadores e apoiadores. Obrigada por tanto amor e carinho. Em especial, agradeço minha vó Diva, vó Nadir e vô Aidano e também minhas tias Márcia e Vitória. Agradeço também aos meus sogros Sílvia, Eloi e Abadia que me receberam tão bem na família.

À minha orientadora, professora Eliete, que desde o início acredita em mim e no meu potencial. Sou muito grata por toda a orientação e dedicação, é sempre um orgulho e uma alegria poder ser orientada por uma mulher tão inspiradora e tão amiga. Serei sempre muito grata por todas as oportunidades. Agradeço por toda a exigência e também por toda a compreensão. Sempre digo: todos os estudantes mereciam uma orientadora tão dedicada. Espero ser um dia metade da pesquisadora e professora que a senhora é.

À minha coorientadora, Juliana, que sempre me incentivou e foi uma admiração para mim. Tenho muito orgulho de poder trabalhar com alguém que admiro tanto. Obrigada por se mostrar sempre disponível e acessível, e por tudo que me ensinou com tanta dedicação.

Aos meus parceiros de laboratório e pesquisas, Larissa e Victor, que estiveram ao meu lado durante todo o desenvolvimento deste trabalho e em tantos outros projetos. Sou muito grata por poder contar com seu companheirismo e amizade. Obrigada por tornarem o laboratório um local de muitas risadas e carinho. Agradeço também pelo tanto que aprendemos juntos, como foi bom trabalhar com amigos que nos inspiram. Levarei eternamente a amizade de vocês e a gratidão.

À minha dupla, Patrícia, por toda a paciência, suporte e carinho durante esses anos. Obrigada por ter tornado meus dias mais leves e por tantos momentos compartilhados (de angústias e alegrias). Agradeço muito por ter encontrado uma irmã dentro do curso. Serei sempre grata por tantas risadas, partilhas e momentos. Só posso agradecer pelo tanto que aprendi com você.

Ao meu grupo de pesquisa, meus amigos que tanto me ajudam e motivam. Obrigada por todo suporte em todos os aspectos e, principalmente, pela amizade. Em especial, agradeço a Lídia e Mylene que me deram auxílio durante a realização do PCR sabendo que eu estava em aula e não poderia acompanhar todo o processo. Agradeço também à Quele que cuidou das células com tanto zelo nos

dias em que eu não podia ir. Agradeço também a Vitória e Isabella pelo incentivo constante. Tenho muito orgulho de fazer parte de um grupo tão inspirador.

Ao grupo de pesquisa Biodonto da Universidade Católica de Brasília por todo o suporte. Em especial, agradeço à professora Taia que nos cedeu as células SaOS-2 e se colocou à disposição para ajudar. Agradeço à Thais por nos receber no laboratório da UCB e nos ensinar a técnica do ELISA e da mensuração de óxido nítrico. Agradeço também ao Francisco pelo auxílio na análise dos dados. Sou muito grata.

Aos técnicos da radiologia do HuB, Samuel, Ricardo e Felipe, que foram sempre acessíveis e prestativos para fazer a radiação ionizante nas células. Agradeço por sempre me receberem tão bem e por serem flexíveis em relação aos horários para me ajudar nos períodos de aula.

Aos meus amigos da Paróquia São Judas Tadeu, grupo NATAL e DATING, que tanto me dão carinho e suporte. Obrigada por me ensinarem na prática a importância da vida intelectual para a nossa vida religiosa. Hoje posso dizer que entendo um pouco melhor o que São José Maria de Escrivá quis dizer com “Se tens de servir a Deus com a tua inteligência, para ti estudar é uma obrigação grave”. Obrigada por todo suporte. Em especial, agradeço aos meus amigos e irmãos de caminhada Wanessa, Ângelo, Mirella e Danilo que são também uma família para mim.

À minha amiga de infância, Lorrane, que mesmo distante está sempre presente na minha vida. Agradeço pelo seu incentivo e apoio constantes.

À turma 76, meus amigos e fiéis companheiros. Eu não poderia imaginar uma turma melhor. Obrigada pela amizade e carinho de sempre, levarei lembranças maravilhosas e sentirei saudades do nosso convívio. Agradeço de forma especial aos meus amigos Ana Luisa, Ana Gabriela, Bruna Dias, Lucas e Luana por tornarem a graduação mais leve.

Aos projetos de extensão que tive a oportunidade de participar durante a graduação e que tanto me ensinaram. Levarei muitos ensinamentos e memórias. Agradeço especialmente aos projetos CACON, Diabetes, Prótese PBMF, DTM e gestante e bebê.

Aos meus professores, que foram fundamentais para minha formação e são minhas inspirações. Agradeço imensamente por todo o carinho e paciência para nos ensinar e nos formar profissionalmente. Em especial, agradeço aos professores que tive oportunidade de ser orientada e acompanhada de forma mais direta, minha gratidão às professoras Aline, Ana Carolina, Carla, Cristiane, Eliana, Erica, Maria do Carmo, Nailê e Nilce, e aos professores Rodrigo e Paulo.

Aos meus pacientes que tive a oportunidade de prestar atendimento, agradeço a paciência, o incentivo e o carinho que tanto recebi. Obrigada por me permitirem aprender e por tantas trocas durante os atendimentos que me fizeram aprender na prática que o atendimento integral vai além de procedimentos técnicos.

À Universidade de Brasília e ao Hospital Universitário, agradeço por tantas oportunidades e por ter tido o privilégio de poder estudar em uma universidade pública de tanta qualidade. Aproveito para agradecer especialmente aos funcionários, servidores e toda a equipe pelo esforço diário e constante.

Ao Programa de Iniciação Científica (ProIC) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) agradeço pela oportunidade e por me inspirarem para o sonho da vida acadêmica. Agradeço também pelas bolsas de iniciação científica que me ajudaram tanto durante a graduação e pelo incentivo financeiro concedido para que eu pudesse participar do Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO) em Campinas.

A todos que de alguma forma participaram da minha trajetória durante a graduação e marcaram minha história. Ficam a gratidão e as boas lembranças.

“Que a tua vida não seja uma vida estéril. — Sê útil. — Deixa rastro.”

São Josemaria Escrivá

RESUMO

A osteorradiationecrose (ORN) pode ser descrita como um osso exposto e necrótico em um local irradiado que não cicatriza em um período de três a seis meses. Atualmente, a escolha do tratamento para ORN depende da gravidade do tecido necrótico e muitas intervenções são consideradas para melhor sucesso clínico. No entanto, ainda não há na literatura o estabelecimento de tratamento ideal ou diretrizes consensuais sobre a melhor terapia para ORN. A curcumina, o bpV(pic) e a terapia de fotobiomodulação são possíveis agentes promissores na prevenção e tratamento da ORN, porém ainda não foram testados para este fim. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um modelo *in vitro* de osteorradiationecrose usando células humanas imortalizadas de *osteoblastos-like* (SaOS-2) e modular o processo de reparo deste modelo usando curcumina, bpV(pic) e terapia de fotobiomodulação. Este trabalho foi realizado em duas partes. Primeiramente, foi definido o modelo *in vitro* de osteorradiationecrose pela aplicação de estímulo bacteriano com lipossacarídeos (LPS) de *Escherichia coli* e extrato protéico de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e ainda com radiação ionizante. Após os estímulos, foi analisada a viabilidade celular pelo ensaio de MTT, a mensuração de óxido nítrico e a expressão gênica de PIK3CA, mTOR, AKT e PTEN por meio da reação em cadeia de polimerase em tempo real/quantitativo (RT-qPCR). Em um segundo momento, o modelo foi tratado para avaliar a modulação do reparo com curcumina, bpV(pic) e terapia de fotobiomodulação. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelo ensaio de MTT e pela mensuração da produção de óxido nítrico. A análise estatística foi realizada com GraphPad Prism. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. O modelo *in vitro* de osteorradiationecrose foi estabelecido como cultura de células SaOS-2 submetidas a 16Gy de radiação ionizante sem estímulo bacteriano. Essa dose foi capaz de reduzir a viabilidade celular e aumentar a produção de óxido nítrico. O uso de curcumina, bpV(pic) e terapia de fotobiomodulação não aumentaram a viabilidade celular nas doses utilizadas neste estudo e a mensuração de óxido nítrico não foi possível pelas baixas taxas de produção. Conclui-se que a dose de radiação ionizante de 16Gy sem estímulo bacteriano foi capaz de reduzir a viabilidade celular e aumentar a produção de óxido nítrico. Assim, esta dose pode ser utilizada para estudos *in vitro* com células SaOS-2 para investigar a modulação do processo de reparo ósseo na osteorradiationecrose. As doses utilizadas de curcumina, bpV(pic) e terapia de fotobiomodulação não foram capazes de aumentar a viabilidade celular. Portanto, novas doses e mais ensaios devem ser investigados para verificar melhores tratamentos para a osteorradiationecrose.

PALAVRAS-CHAVE: Osteorradiationecrose; Radiação Ionizante; Vias de Sinalização; Curcumina; Terapia com Luz de Baixa Intensidade

ABSTRACT

Osteoradionecrosis (ORN) can be described as an exposed and necrotic bone in an irradiated site that does not heal in a period of three to six months. Currently, the choice of treatment for ORN depends on the severity of necrotic tissue and many interventions are considered for better clinical success. However, there is still no establishment in the literature of the ideal treatment or consensus guidelines on the best therapy for ORN. Curcumin, bpV(pic) and photobiomodulation therapy are possible promising agents in the prevention and treatment of ORN, but have not yet been tested for this purpose. Thus, the objective of this work was to establish an *in vitro* model of osteoradionecrosis using immortalized human osteoblast-like cells (SaOS-2) and to modulate the repair process of this model using curcumin, bpV(pic) and photobiomodulation therapy. This work was carried out in two parts. First, the *in vitro* model of osteoradionecrosis was defined by the application of bacterial stimulus with liposaccharides (LPS) from *Escherichia coli* and protein extract from *Porphyromonas gingivalis* (Pg) and with ionizing radiation. After the stimuli, cell viability was analyzed using the MTT assay, measurement of nitric oxide and gene expression of PIK3CA, mTOR, AKT and PTEN using real-time/quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). In a second moment, the model was treated to evaluate the repair modulation with curcumin, bpV(pic) and photobiomodulation therapy. The effects of the treatments were evaluated by the MTT assay and by measuring the production of nitric oxide. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. The *in vitro* model of osteoradionecrosis was established as a culture of SaOS-2 cells subjected to 16Gy of ionizing radiation without bacterial stimulation. This dose was able to reduce cell viability and increase nitric oxide production. The use of curcumin, bpV(pic) and photobiomodulation therapy did not increase cell viability at the doses used in this study and the measurement of nitric oxide was not possible due to the low production rates. It is concluded that the dose of ionizing radiation of 16Gy without bacterial stimulus was able to reduce cell viability and increase nitric oxide production. Thus, this dose can be used for *in vitro* studies with SaOS-2 cells to investigate the modulation of the bone repair process in osteoradionecrosis. The used doses of curcumin, bpV(pic) and photobiomodulation therapy were not able to increase cell viability. Therefore, new doses and further trials should be investigated to verify better treatments for osteoradionecrosis.

KEYWORDS: Osteoradionecrosis; Ionizing radiation; Signaling Routes; Curcumin; Low Intensity Light Therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Fluxograma metodológico.....19
- Figura 2:** Viabilidade celular da SaOS-2 analisada pelo ensaio de MTT após a indução com diferentes concentrações de estímulos bacterianos analisadas. Todas as concentrações estão em $\mu\text{g/mL}$ (LPS: 1, 5 e $10\mu\text{g/mL}$ e PG: 1, 2 e $5\mu\text{g/mL}$). Ctr: Grupo controle (sem estímulo bacteriano). Teste estatístico: Teste de Kruskal Wallis ($p>0,05$).....23
- Figura 3:** Viabilidade celular da SaOS-2 analisada pelo ensaio de MTT após a indução com diferentes doses de radiação ionizante (4, 6, 8 e 10Gy). Os grupos foram divididos em sem estímulo bacteriano, apenas LPS ($10\mu\text{g/mL}$), apenas PG ($5\mu\text{g/mL}$) e LPS e PG associados ($10\mu\text{g/mL}$ de LPS e $5\mu\text{g/mL}$ de PG). Teste estatístico: Ordinary one-way ANOVA ($*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$); teste de Kruskal Wallis ($\#p<0,05$; $\#\#p<0,01$; $\#\#\#p<0,001$).....24
- Figura 4:** Viabilidade celular da SaOS-2 analisada pelo ensaio de MTT 24, 48 e 72 horas após a indução com ou sem estímulos bacterianos ($10\mu\text{g/mL}$ de LPS e $5\mu\text{g/mL}$ de Pg) e com radiação ionizante (0, 12, 16 e 20Gy). Teste estatístico: Ordinary one-way ANOVA ($*p<0,05$; $***p<0,001$; $****p<0,0001$) e teste de Kruskal Wallis ($\#\#\#\#p<0,001$).....25
- Figura 5:** Mensuração da dosagem de óxido nítrico nas SaOS-2' após indução com (+) ou sem (-) estímulos bacterianos ($10\mu\text{g/mL}$ de LPS e $5\mu\text{g/mL}$ de Pg) e radiação ionizante (16 e 20Gy). Teste estatístico: Teste de Kruskal Wallis ($\#p<0,05$; $\#\#p<0,01$).....26
- Figura 6:** Expressão relativa dos marcados da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR utilizando RT-qPCR em SaOS-2 após radiação ionizante (16 e 20Gy). Teste estatístico: Ordinary one-way ANOVA ($p>0,05$).....26
- Figura 7:** Viabilidade celular do FG analisada pelo ensaio de MTT 24, 48 e 72 horas após a indução com ou sem estímulos bacterianos ($10\mu\text{g/mL}$ de LPS e $5\mu\text{g/mL}$ de Pg) e com radiação ionizante (12, 16 e 20Gy). Teste estatístico: Ordinary one-way ANOVA ($*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$; $****p<0,0001$) e teste de Kruskal Wallis ($\#p<0,05$).....27
- Figura 8:** Viabilidade celular da co-cultura SaOS-2/FG analisada pelo ensaio de MTT após a indução com ou sem estímulos bacterianos ($10\mu\text{g/mL}$ de LPS e $5\mu\text{g/mL}$ de Pg)

e com radiação ionizante (16 e 20Gy). Teste estatístico: Ordinary one-way ANOVA (**p<0,001; ***p<0,0001).....28

Figura 9: Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após a aplicação de curcumina, bpV(pic) e terapia de fotobiomodulação (PBMT) do modelo de ORN *in vitro* estabelecido na parte 1 (células SaOS-2 submetidas a 16Gy de radiação ionizante sem estímulo bacteriano). Ctr: Grupo controle (0Gy). Teste estatístico: Teste de Kruskal Wallis test (# p<0,05; ## p<0,01).....29

Figura 10: Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após a aplicação de curcumina, bpV(pic) e terapia de fotobiomodulação (PBMT) na co-cultura de SaOS-2/FG com radiação ionizante (20Gy) e estímulo bacteriano (10µg/mL de LPS e 5µg/mL de Pg). Ctr: Modelo sem tratamento. Doses utilizadas: Cur (curcumina): 2,5µM; bpV(pic): 1µM; PBMT: 3J/cm². Teste estatístico: Ordinary one-way ANOVA (p>0,05).....30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
ATP	Enzima adenosina trifosfato
bpV	Compostos bisperoxovanádio
CCP	Câncer de cabeça e pescoço
Ctrl	Controle
FG	Cultura primária de fibroblastos gengivais humanos
Gy	Gray
LPS	Lipossacarídeos
NO	Óxido nítrico
ORN	Osteorradionecrose
PBMT	Terapia de fotobiomodulação
PG	Extrato protéico de <i>Porphyromonas gingivalis</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real/quantitativo
SaOS-2	Células humanas imortalizadas do tipo <i>osteoblasto-like</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1. PARTE 1: ESTABELECIMENTO DE UM MODELO <i>IN VITRO</i> DE OSTEORRADIONECROSE.....	19
2.1.1. Cultura celular.....	19
2.1.2. Viabilidade celular.....	19
2.1.3. Mensuração de óxido nítrico.....	20
2.1.4. RT-qPCR.....	20
2.1.5. Avaliação inicial para o estabelecimento de um modelo em co-cultura.....	21
2.2. PARTE 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS TERAPIAS NA MODULAÇÃO DO REPARO.....	21
2.2.1. Tratamento.....	21
2.2.2. Avaliação do tratamento.....	22
2.2.3. Avaliação do tratamento no modelo em co-cultura.....	22
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
3. RESULTADOS.....	22
3.1. PARTE 1: ESTABELECIMENTO DO MODELO <i>IN VITRO</i> DE OSTEORRADIONECROSE.....	22
3.1.1. Viabilidade celular.....	22
3.1.2. Mensuração de óxido nítrico.....	25
3.1.3. RT-qPCR.....	26
3.1.4. Avaliação inicial para o estabelecimento de um modelo em co-cultura.....	27
3.2. PARTE 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS TERAPIAS DE MODULAÇÃO DA VIA DE REPARO CELULAR NO MODELO.....	28
3.2.1. Viabilidade celular.....	28
3.2.2. Mensuração de óxido nítrico.....	29
3.2.3. Avaliação do tratamento no modelo em co-cultura.....	29
4. DISCUSSÃO.....	30
4.1. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	33

5. CONCLUSÃO.....	33
CONFLITOS DE INTERESSE.....	34
FINANCIAMENTO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
ANEXOS.....	39
NORMAS DA REVISTA.....	39

1. INTRODUÇÃO

A osteorradionecrose (ORN) é uma condição com muitas definições; no entanto, a sua apresentação clínica pode ser descrita como um osso exposto e necrótico em um local irradiado que não cicatriza em um período de três a seis meses [1-2]. O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é um grupo de neoplasias malignas que acometem as regiões oral, nasofaríngea, laríngea, hipofaríngea ou nasossinusal [3]. A radioterapia é importante e frequentemente utilizada para o tratamento de pacientes com CCP, em fases iniciais da doença a terapia com radiação ionizante pode ser usada isoladamente ou em associação com cirurgia, e em fases avançadas em associação com quimioterapia [4]. O principal objetivo da radioterapia é maximizar o controle local do tumor, minimizando as lesões aos tecidos normais do paciente. Existe um espectro de efeitos adversos (toxicidades) nos tecidos normais circundantes associados à radioterapia. A via de sinalização PI3K-PTEN-AKT-mTOR pode ser desregulada por radiação ionizante, levando à ativação da subunidade catalítica de proteína quinase dependente de DNA e proteínas apoptóticas associadas, interrompendo assim o processo de reparo e apoptose [5].

Historicamente, a patogênese da ORN foi entendida como secundária ao trauma e a infecção após radioterapia. Esse paradigma mudou quando Marx propôs um novo modelo e sugeriu que nessas circunstâncias a infecção acontecia após o surgimento do quadro de necrose e a causa primária da condição foi associada a radiação ionizante na radioterapia [6]. O tratamento com radioterapia é comumente usado na terapia antineoplásica; no entanto, esse grupo de terapia reduz a vascularização destruindo os vasos sanguíneos, causando hipóxia e consequentemente necrose tecidual [7]. Além disso, a teoria vascular também é apoiada clinicamente, uma vez que o desenvolvimento da ORN é mais comum em mandíbulas, região mais vascularizadas quando comparada à maxila [2].

Outra consequência da radioterapia é o processo fibroatrófico induzido pela radiação e mais um conceito pode sugerir a histopatologia da ORN. Desta forma, a radiação causa senescência prematura de fibroblastos induzida pelo estresse e proliferação retardada, consequentemente ocorre a morte celular [8]. Além disso, Xu et al. (2012) realizaram um estudo *in vivo* que sugere que a hipervascularização causada pela redução do fluxo sanguíneo local pode causar um desequilíbrio na remodelação óssea. Também, o mesmo estudo detectou lesão de osteócitos algumas horas após a radiação [9] e a análise histológica de mandíbulas com

osteorradionecrose mostrou perda de osteócitos e células inflamatórias ao redor das áreas de necrose [10].

Entre as toxicidades da radioterapia, a ORN é uma complicação grave, representando quadro clínico limitante que impacta negativamente na qualidade de vida do paciente [1, 11]. Os pacientes que tiveram extrações antes e depois da radioterapia de cabeça e pescoço tiveram 5,5% e 5,3% de incidência de ORN, respectivamente [12]. Portanto, considerando as características do paciente e a gravidade da doença, uma combinação de diferentes estratégias terapêuticas deve ser considerada [13].

Atualmente, a escolha do tratamento para ORN depende da gravidade do tecido necrótico e muitas intervenções são consideradas para melhor sucesso clínico. Essas possíveis terapias podem ser divididas em terapia não cirúrgica e cirúrgica. O tratamento conservador incluiu observação, terapia com ultrassom, oxigenoterapia hiperbárica e outras medidas de suporte. No entanto, quando a lesão é avançada, a melhor opção podem ser procedimentos cirúrgicos, incluindo principalmente desbridamento do tecido necrótico e reconstrução óssea [14]. No entanto, ainda não há na literatura o estabelecimento de tratamento ideal ou diretrizes consensuais sobre a melhor terapia para ORN.

A curcumina foi investigada e pode ter eficácia contra muitas patologias. Essa molécula, também chamada de diferuloilmetano, é encontrada no rizoma da *Curcuma spp.*, principalmente na *Curcuma longa*. A curcumina tem efeitos benéficos e pode ser relevante para o tratamento de muitas doenças, incluindo alterações neurológicas, cardiovasculares, síndromes metabólicas e doenças malignas [15]. Em lesões inflamatórias orais como a mucosite oral, a aplicação tópica de curcumina pode ser eficaz no controle dos sinais e sintomas, reduzindo a dor, o eritema, o tamanho da área ulcerada e o grau de mucosite [16]. As principais propriedades da curcumina são o seu efeito antioxidante e anti-inflamatório. O potencial antioxidante pode ser explicado pela estrutura da curcumina que contém muitos grupos funcionais [17]. Além disso, a curcumina tem a capacidade de inibir COX-2, LOX e iNOS, inibindo assim a produção de citocinas inflamatórias como interferon- γ e fator de necrose tumoral e ativando os fatores de transcrição NF κ B e AP-1. Desta forma, a curcumina é um potente anti-inflamatório [17]. Assim, a curcumina pode ser um agente promissor na prevenção e tratamento da ORN, porém ainda não foi testada para este fim.

Os compostos bisperoxovanádio (bpV) são drogas que inibem o supressor tumoral PTEN, que atua como um antagonista da via PI3K-AKT-mTOR [18]. Portanto, a regulação negativa do PTEN resulta em superativação da via, o que conseqüentemente aumenta a proliferação celular [19]. No entanto, pouco se sabe sobre a modulação da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR para reparação óssea. Assim, é relevante considerar a atividade de bpV(pic) na modulação do processo de reparo da ORN.

Atualmente, a terapia de fotobiomodulação (PBMT) pode ser um tratamento não invasivo eficaz para muitas doenças bucais [20]. Há mais de 50 anos, a PBMT foi descrita pela primeira vez para cicatrização de feridas, sendo o laser de baixa potência também eficaz para a cicatrização em casos de feridas crônicas [21]. Posteriormente, observou-se que o laser é capaz de modificar processos deletérios, modulando a inflamação e a dor [22]. Portanto, esta terapia com luz de comprimento de onda entre 600 e 1000nm, tem sido utilizada para estimular o reparo, prevenir e tratar sinais decorrentes da inflamação e da exacerbação da resposta imune [22-23]. Sendo assim, PBMT pode ser um agente eficaz para prevenir e tratar ORN.

Dessa forma, este estudo teve como objetivo estabelecer um modelo *in vitro* de osteorradiocrose usando células humanas imortalizadas de *osteoblastos-like* (SaOS-2) e modular o processo de reparo deste modelo usando curcumina, bpV(pic) e terapia de fotobiomodulação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi feito em duas partes. Primeiramente, foi definido o modelo *in vitro* de osteorradiocrose e, a seguir, o modelo foi tratado para avaliar a modulação do reparo. O fluxograma foi construído para descrever a metodologia (Figura 1).

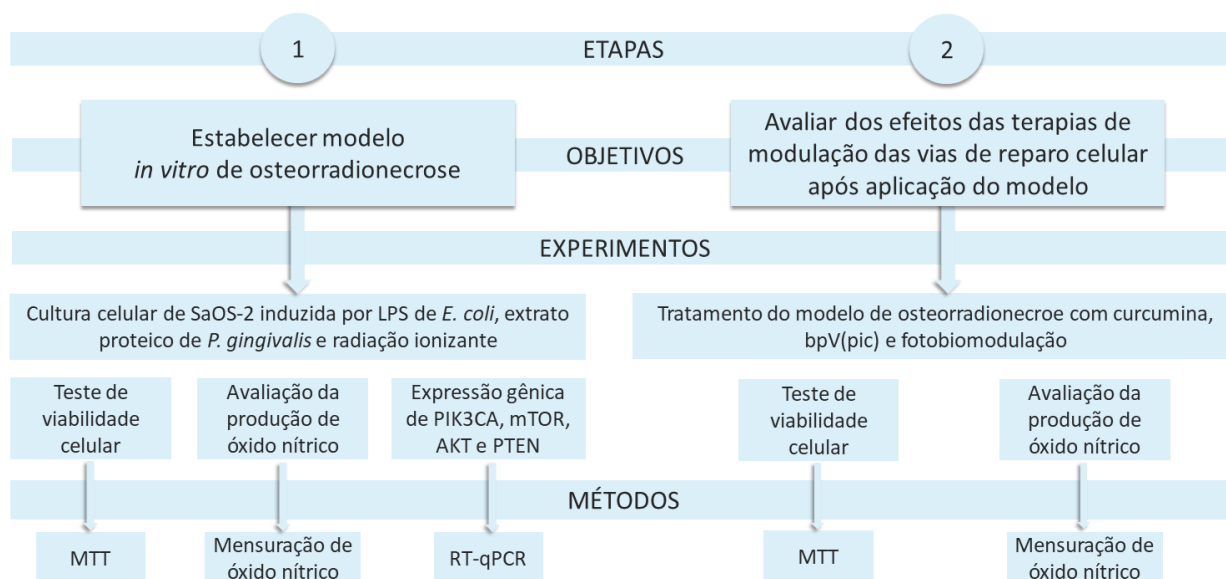


Figura 1: Fluxograma metodológico.

2.1. PARTE 1: ESTABELECIMENTO DE UM MODELO *IN VITRO* DE OSTEORRADIONECCROSE

2.1.1. Cultura celular

Células humanas imortalizadas do tipo *osteoblasto-like* (SaOS-2) foram cultivadas em DMEM com soro fetal bovino (10%), penicilina (50µg/mL) e gentamicina (50µg/mL). Durante o período de cultivo celular, as células foram mantidas em condições ideais, incubadas em incubadora umidificada a 37°C acompanhada de CO₂ (5%) e o meio foi trocado regularmente.

2.1.2. Viabilidade celular

Estímulo bacteriano: O estímulo bacteriano foi induzido com veículo (controle), lipossacarídeos (LPS) de *Escherichia coli* e extrato protéico de *Porphyromonas gingivalis* (Pg). Lipopolissacarídeo de *E. coli* (*E. coli* O111:B4; Sigma-Aldrich) e extrato proteico de Pg foram usados para simular a liberação de produtos do biofilme bacteriano nas lesões da mucosa. O LPS foi solubilizado em PBS e armazenado a -20°C. Os extratos da proteína Pg foram preparados conforme descrito anteriormente [24], diluídos em DMEM e armazenados a -80°C. Quando as células apresentaram confluência de 70-80%, o meio foi substituído por DMEM fresco e as células foram estimuladas com 1, 5 e 10µg/mL de LPS e com 1, 2 e 5µg/mL de Pg. As células foram plqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2x10⁴ e

incubadas por 24h. Em seguida, os tratamentos foram aplicados em 9 repetições biológicas de acordo com o grupo experimental e, após 24h, foram adicionados 10 μ L de solução de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e as células foram incubadas, protegidas da luz, por 4h, seguido pela adição de isopropanol acidificado (25mL de isopropanol + 104 μ L de HCl 100%) em cada poço. A toxicidade celular foi medida comparando a absorbância entre os grupos experimentais e o veículo. A absorbância foi medida a 570nm em um Thermo Plate TP Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Esses resultados orientaram a escolha da concentração do estímulo bacteriano.

Radiação ionizante: As células foram divididas em “sem” e “com” estímulos bacterianos. Após uma hora do estímulo bacteriano, todas as células foram transportadas para a Unidade de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital Universitário de Brasília para serem irradiadas. As células foram induzidas com 0, 4, 6, 8 e 10 Gray (Gy) e após 24 horas, a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio MTT. Este experimento foi repetido com 0, 12, 16 e 20Gy após 24, 48 e 72 horas.

2.1.3. Mensuração de óxido nítrico

Após 6 e 24 horas do estímulo, a produção de óxido nítrico (NO) foi estabelecida pela metodologia descrita por Green et al. (1982) com modificações [25]. A quantidade de 100 μ L do sobrenadante foi coletada e transferida para uma placa de 96 poços. A curva padrão foi construída adicionando 100 μ L de DMEM e adicionando 100 μ L de uma solução de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 2,5% e naftiletenodiamina 1% em ácido fosfórico 2,5%, na proporção de 1:1. Após 10 minutos em temperatura ambiente, a leitura foi realizada com um leitor de microplacas (Bio-Tek PowerWave HT, EUA). Para estimar a quantidade de nitrito, será feito um cálculo a partir da equação da curva padrão (1,5625 μ M - 200 μ M) e avaliação do coeficiente de regressão linear (R²).

2.1.4. RT-qPCR

A expressão gênica de PIK3CA, mTOR, AKT e PTEN foi avaliada por meio da reação em cadeia de polimerase em tempo real/quantitativo (RT-qPCR) após 12 horas do estímulo. A extração do RNA total foi realizada de acordo com o método estabelecido pelo TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, EUA). A concentração e a qualidade das amostras foram determinadas usando NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) por espectrofotometria. As amostras foram tratadas com

DNase I (Sigma-Aldrich, EUA) para remover a contaminação do DNA. A reação em cadeia da polimerase foi realizada usando Power Up™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) em um termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

2.1.5. Avaliação inicial para o estabelecimento de um modelo em co-cultura

Os próximos passos do projeto envolvem o estabelecimento de uma co-cultura com células SaOS-2 e cultura primária de fibroblastos gengivais humanos (FG) usando membranas Transwell®. Inicialmente, foi realizada a análise da viabilidade celular dos fibroblastos gengivais humanos por ensaio de MTT. As células FG foram adquiridas de um projeto de pesquisa de 2022, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília (CAAE Nº 52278221.6.0000.0030). Os fibroblastos foram plaqueados em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 e incubados por 24h. Após esse período, foram divididos em grupos estimulados com estímulos bacterianos e não estimulados e então submetidos a radiação ionizante em doses de 12, 16 e 20Gy. Após 24, 48 e 72h, o ensaio de MTT foi realizado como previamente descrito.

Em seguida, foi realizado o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular das células SaOS-2 em co-cultura com as células FG. As células SaOS-2 foram plaqueadas em placa de 12 poços a uma densidade de 2×10^6 e os FG foram plaqueados na membrana Transwell® na densidade de 5×10^3 . Após 24h de incubação, as células foram submetidas 16 e 20Gy de radiação ionizante e após 24h foi realizado o ensaio de MTT.

2.2. PARTE 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS TERAPIAS NA MODULAÇÃO DO REPARO

2.2.1. Tratamento

Após o estímulo estabelecido na parte 1, o modelo de ORN *in vitro* foi tratado com 2,5, 5 e 10 μ M de curcumina, 0,5, 1 e 5 μ M de bpV(pic) e 5, 10 e 15J/cm² de terapia de fotobiomodulação. O tratamento com PBMT foi repetido após 12h.

2.2.2. Avaliação do tratamento

Os efeitos do tratamento no modelo foram avaliados 24 horas após o estímulo pelo ensaio de MTT e pela mensuração de NO. Os experimentos foram realizados da mesma forma descrita na parte 1.

2.2.3. Avaliação do tratamento no modelo em co-cultura

De acordo com o modelo em co-cultura estabelecido na parte 1, foi realizada uma análise inicial da viabilidade celular para a avaliação dos tratamentos do modelo em co-cultura. O modelo de co-cultura de SaOS-2/FG com radiação ionizante (20Gy) e estímulo bacteriano (10µg/mL de LPS e 5µg/mL de Pg) foi tratado com 2,5µM de curcumina, 1µM de bpV(pic), 3J/cm² de terapia de fotobiomodulação, associação de 2,5µM de curcumina e 3J/cm² de PBMT e associação de 1µM de bpV(pic) e 3J/cm² de PBMT. Após 24h, o ensaio de MTT foi realizado da mesma forma como descrito anteriormente.

2.3. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em nove replicatas biológicas para cada grupo. A análise estatística foi realizada com *GraphPad Prism* versão 9.0.2 (GraphPad Software, LA Jolla, CA). Os dados quantitativos foram verificados quanto à distribuição normal (teste de normalidade de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de variância igual de Levene). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) e analisados usando o teste ANOVA para dados paramétricos ou Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. PARTE 1: ESTABELECIMENTO DO MODELO *IN VITRO* DE OSTEORRADIONECROSE

3.1.1. Viabilidade celular

O primeiro experimento foi realizado para avaliar a viabilidade celular de SaOS-2 após a indução com estímulos bacterianos. Nenhuma das concentrações de LPS e Pg alterou significativamente a viabilidade celular. Pelo contrário, todas as doses aplicadas apresentaram tendência de aumento da viabilidade celular. Os grupos de

concentração 10 μ g/mL de LPS e 5 μ g/mL de Pg apresentaram as menores tendências (26,8% e 30,3%, respectivamente) e por isso essas concentrações foram escolhidas para o seguimento dos experimentos. A análise de viabilidade celular após o estímulo bacteriano é mostrada na Figura 2.

Viabilidade celular das SaOS-2 com estímulos bacterianos

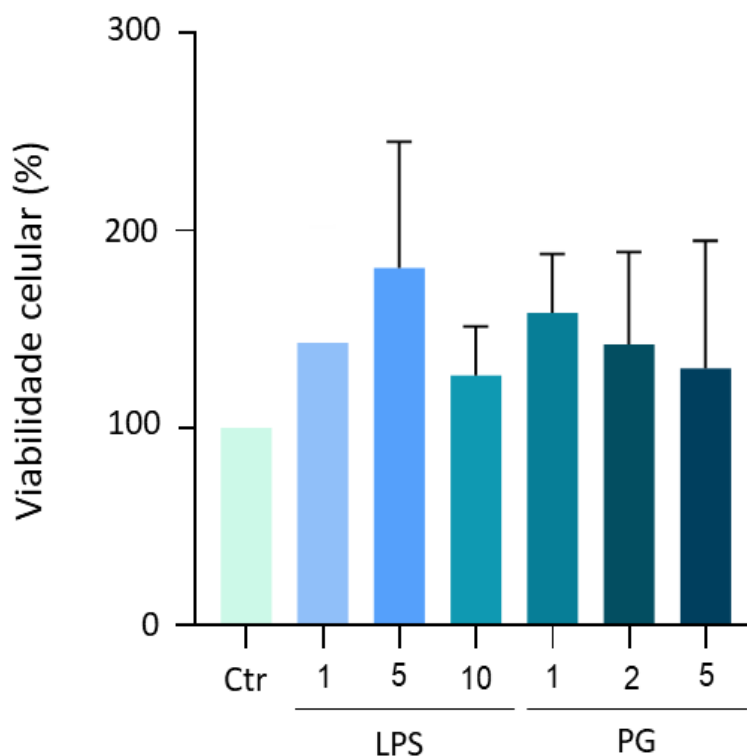


Figura 2: Viabilidade celular da SaOS-2 analisada pelo ensaio de MTT após a indução com diferentes concentrações de estímulos bacterianos analisadas. Todas as concentrações estão em μ g/mL (LPS: 1, 5 e 10 μ g/mL e PG: 1, 2 e 5 μ g/mL). Ctr: Grupo controle (sem estímulo bacteriano). Teste estatístico: Teste de Kruskal Wallis ($p > 0,05$).

O segundo passo foi estabelecer a dose de radiação ionizante. As doses de 4, 6 e 8Gy não foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular (Figura 3). A dose de 10Gy apresentou as menores taxas de viabilidade, com uma diferença de apenas 4% em relação ao grupo controle. No entanto, quando as células foram irradiadas com 10Gy após estímulos bacterianos houve tendência de aumento da viabilidade quando associadas a 10 μ g/mL de LPS, 5 μ g/mL de PG e os dois estímulos juntos (13,6%, 13,9% e 17,3% respectivamente). Embora a aplicação de 10Gy sem adição de bactérias tenha reduzido a viabilidade celular em aproximadamente 14%, não houve significância estatística e por isso doses mais altas foram testadas (12, 16 e 20Gy). Sem estímulo bacteriano, todas as doses reduziram a viabilidade celular

após 24 horas, as doses de 12, 16 e 20Gy reduziram a viabilidade celular em 28,5%, 40,1% e 30,0%, respectivamente. Sendo assim, a dose de radiação ionizante mais próxima em reduzir a viabilidade celular em 50% foi a dose de 16Gy. Por outro lado, com os estímulos bacterianos, apenas 20Gy foi capaz de produzir o mesmo efeito de forma significativa. A dose de 12Gy aumentou a viabilidade em aproximadamente 3% e as doses de 16 e 20Gy reduziram a viabilidade celular em 19,3% e 23,3% (Figura 4).

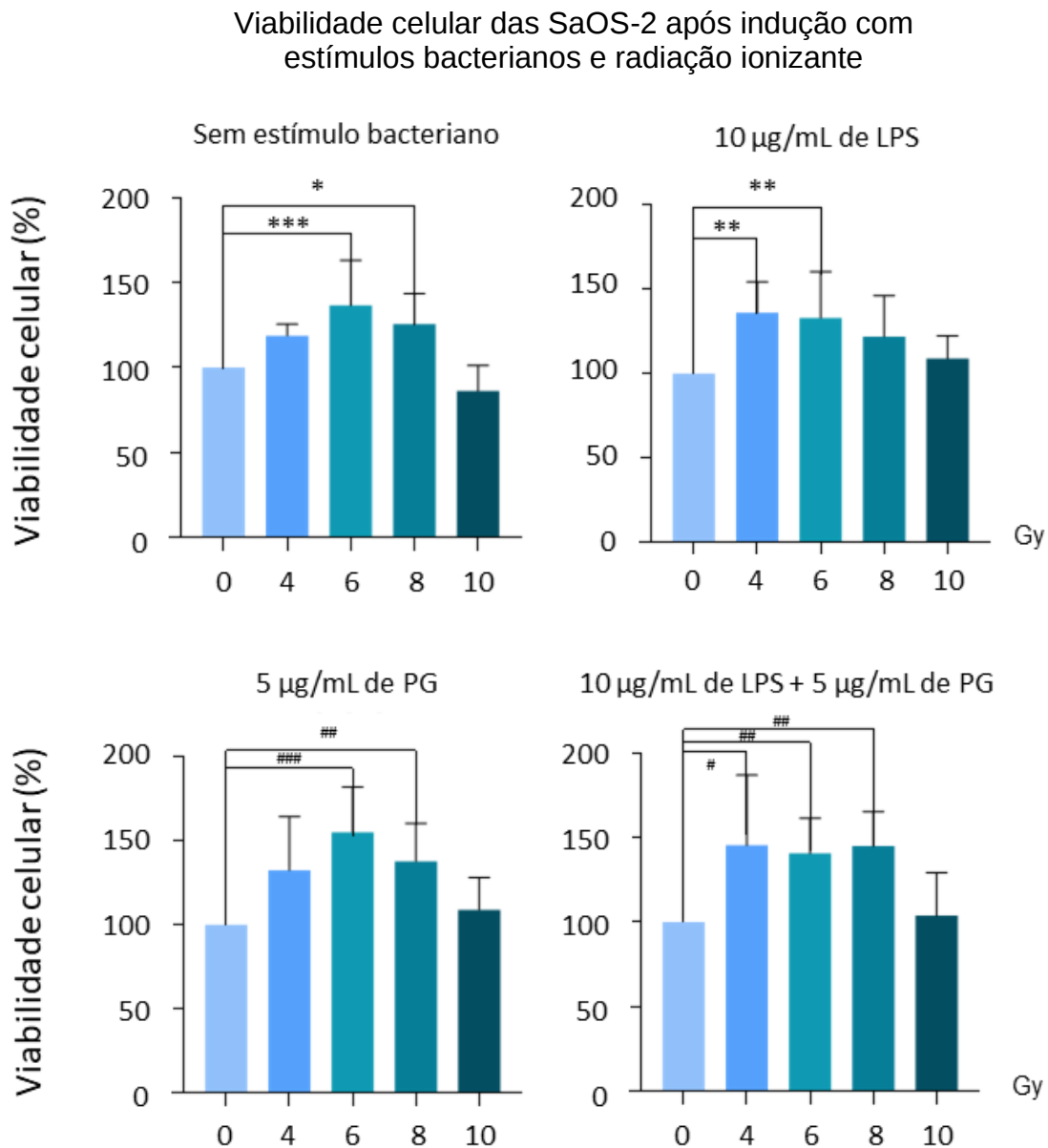


Figura 3: Viabilidade celular da SaOS-2 analisada pelo ensaio de MTT após a indução com diferentes doses de radiação ionizante (4, 6, 8 e 10Gy). Os grupos foram divididos em sem estímulo bacteriano, apenas LPS (10µg/mL), apenas PG (5µg/mL) e LPS e PG associados (10µg/mL de LPS e 5µg/mL de PG). Teste estatístico: Ordinary one-way ANOVA (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); teste de Kruskal Wallis (#p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001).

Viabilidade celular das SaOS-2 após indução com estímulos bacterianos e radiação ionizante

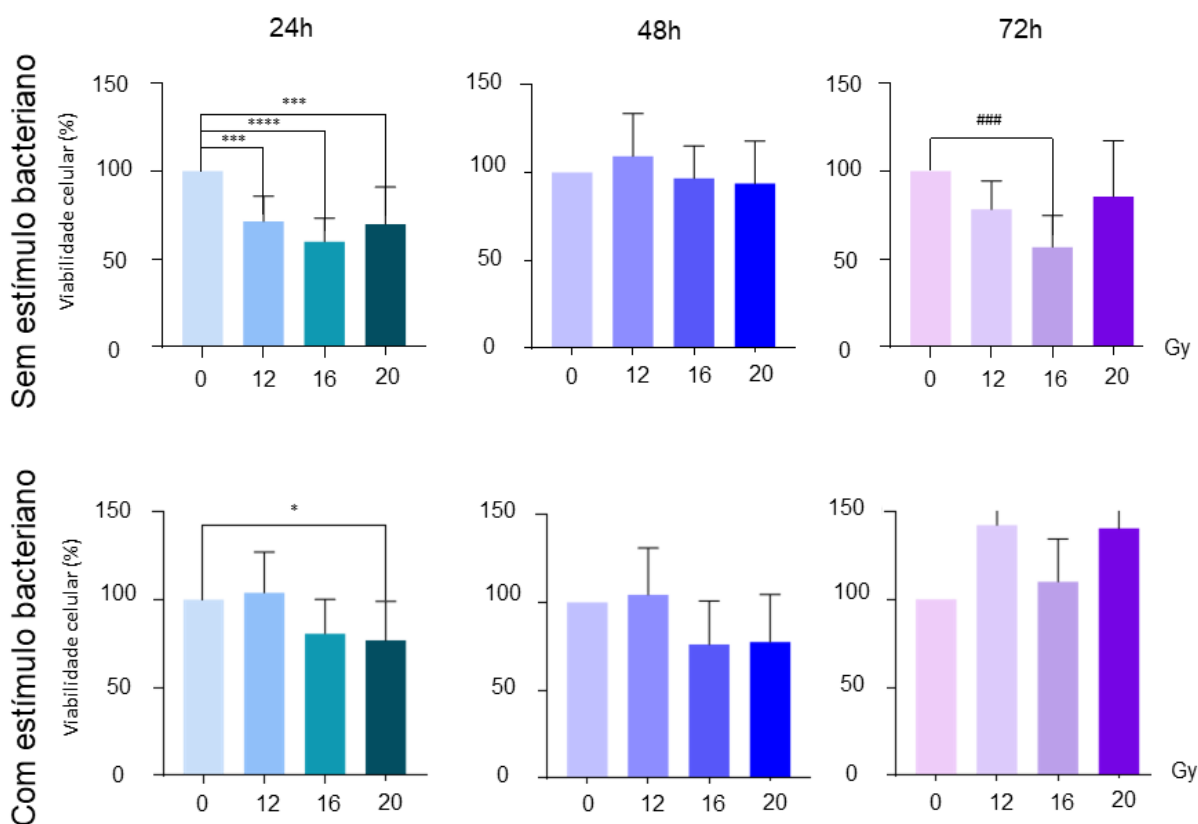


Figura 4: Viabilidade celular da SaOS-2 analisada pelo ensaio de MTT 24, 48 e 72 horas após a indução com ou sem estímulos bacterianos (10µg/mL de LPS e 5µg/mL de Pg) e com radiação ionizante (0, 12, 16 e 20Gy). Teste estatístico: Ordinary one-way ANOVA (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) e teste de Kruskal Wallis (### $p < 0,001$).

3.1.2. Mensuração de óxido nítrico

Após 6 horas, a concentração de NO produzida pelas células ainda era insuficiente para medição. Entretanto, após 24 horas, a concentração de NO teve um aumento de, respectivamente, 32,2% e 24,6% nos grupos de 16 e 20Gy sem estímulo bacteriano, sendo que o aumento foi significativo apenas no grupo de 16Gy. Quando associados os estímulos bacterianos a produção de NO aumentou em apenas 2% no grupo de 16Gy e reduziu em 6,6% no grupo de 20Gy (Figura 5). Assim, 16 e 20Gy sem estímulo bacteriano foram as doses selecionadas para análise da RT-qPCR.

Mensuração de óxido nítrico após indução com estímulos bacterianos e com radiação ionizante

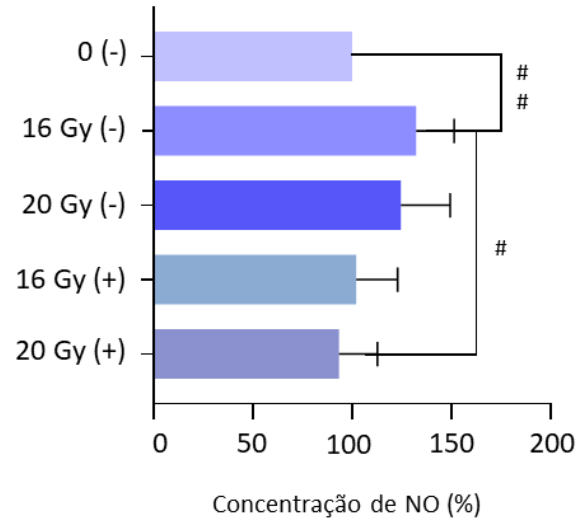


Figura 5: Mensuração da dosagem de óxido nítrico nas SaOS-2 após indução com (+) ou sem (-) estímulos bacterianos (10 μ g/mL de LPS e 5 μ g/mL de Pg) e radiação ionizante (16 e 20Gy). Teste estatístico: Teste de Kruskal Wallis (# p <0,05; ## p <0,01).

3.1.3. RT-qPCR

Para avaliar o estado inflamatório após os estímulos, foi realizado o RT-qPCR. Após 12 horas, 16Gy mostrou uma maior expressão relativa de marcadores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR. No entanto, a diferença entre os grupos não foi significativa (Figura 6).

Expressão relativa dos marcados da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR das SaOS-2 após indução radiação ionizante

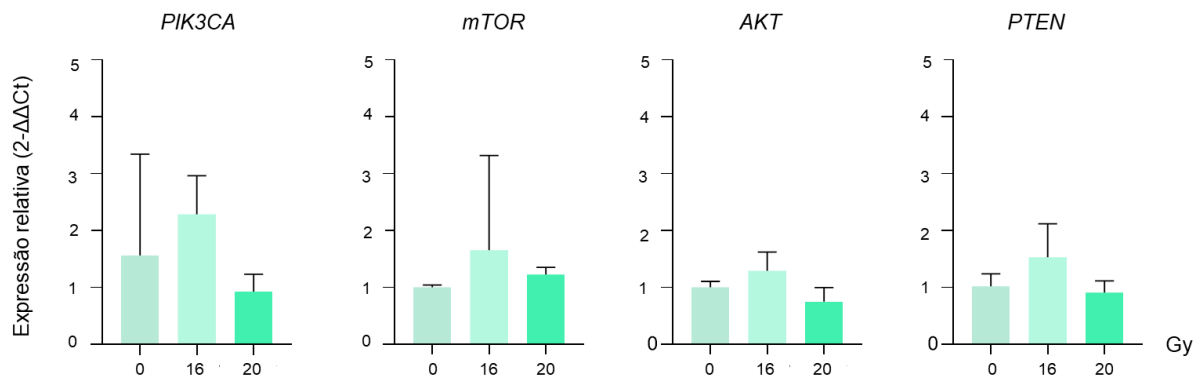


Figura 6: Expressão relativa dos marcados da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR utilizando RT-qPCR em SaOS-2 após radiação ionizante (16 e 20Gy). Teste estatístico: Ordinary one-way ANOVA (p >0,05).

3.1.4. Avaliação inicial para o estabelecimento de um modelo em co-cultura

Os fibroblastos gengivais apresentaram redução da viabilidade celular 24h após a radiação ionizante, as doses de 16 e 20Gy reduziram a viabilidade celular em 24,0% e 31,9%, respectivamente. Porém, quando os fibroblastos foram submetidos a estímulos bacterianos apenas o grupo de 20Gy foi capaz do mesmo efeito, reduzindo a viabilidade em 15,8% (Figura 7).

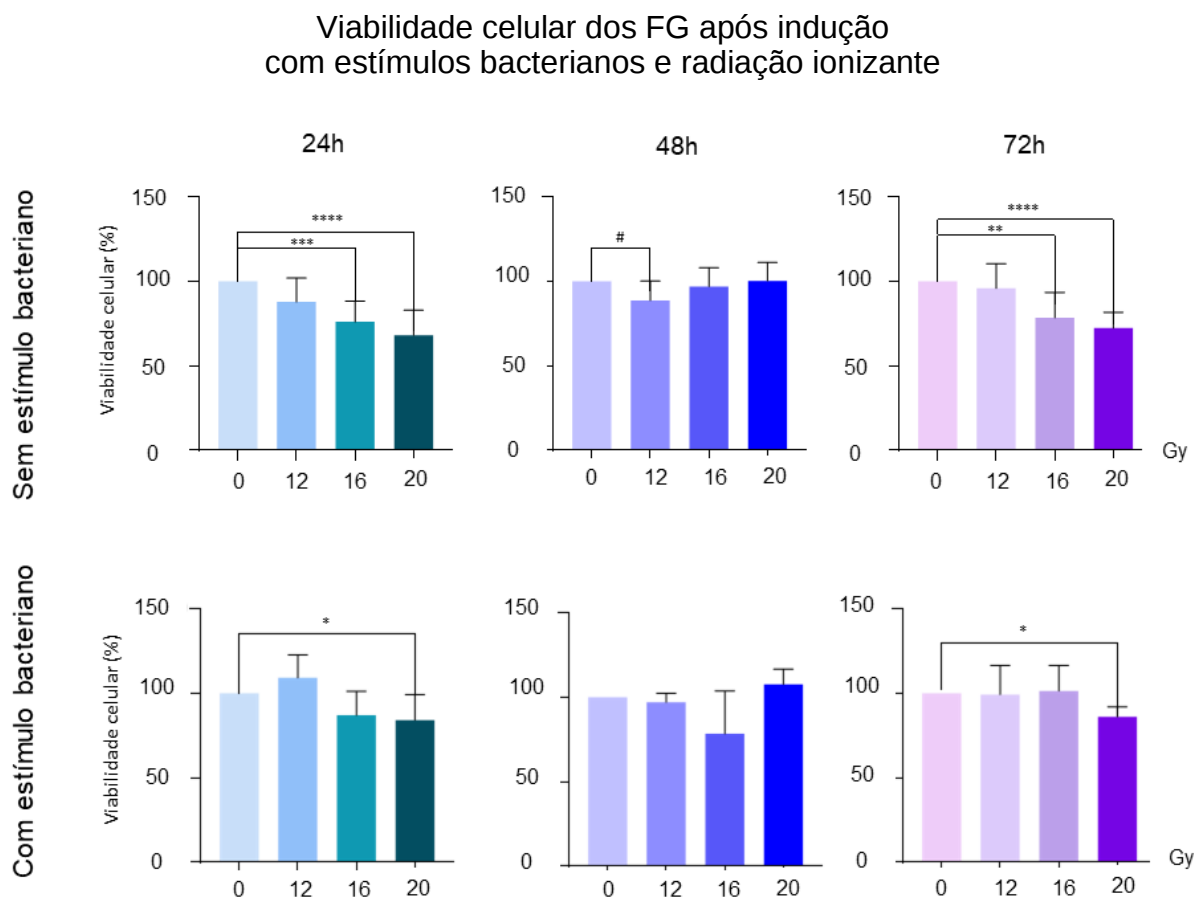


Figura 7: Viabilidade celular do FG analisada pelo ensaio de MTT 24, 48 e 72 horas após a indução com ou sem estímulos bacterianos (10µg/mL de LPS e 5µg/mL de Pg) e com radiação ionizante (12, 16 e 20Gy). Teste estatístico: Ordinary one-way ANOVA (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001) e teste de Kruskal Wallis (#p<0,05).

Um efeito diferente foi observado na viabilidade celular quando as células foram cultivadas em co-cultura SaOS-2/FG. Na co-cultura, o único grupo sem estímulo bacteriano capaz de reduzir a viabilidade celular foi o de 20Gy (28,7%). Por outro lado, os grupos com estímulos bacterianos foram capazes de reduzir a viabilidade celular na dose de 16Gy e 20Gy, queda na viabilidade de 32,3% e 34,5%, respectivamente (Figura 8).

Viabilidade celular da co-cultura SaOS-2/FG após indução com estímulos bacterianos e radiação ionizante

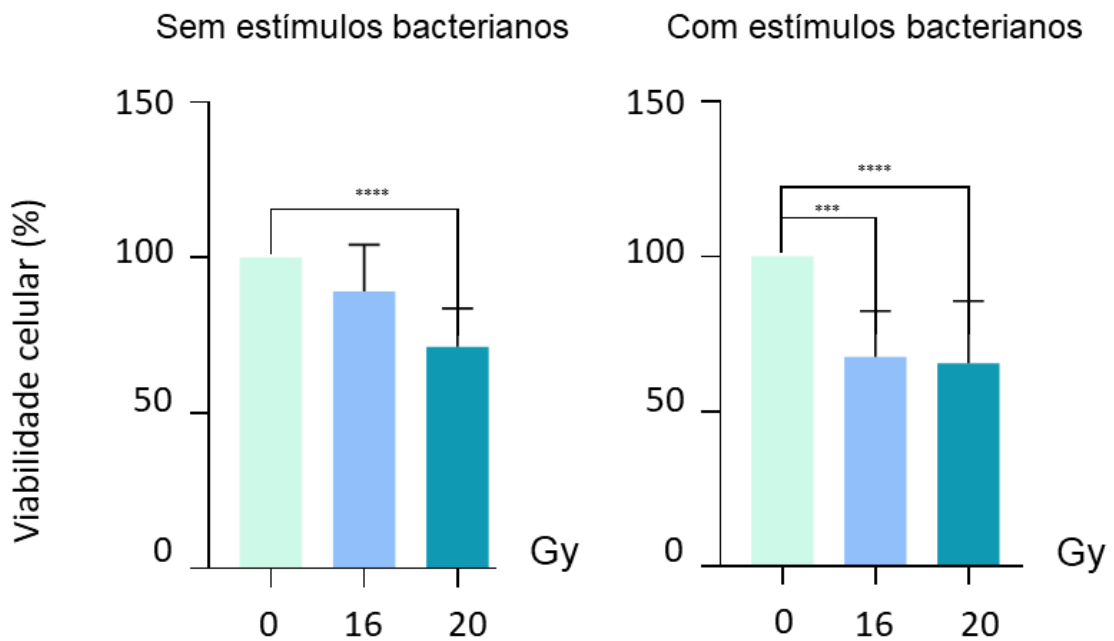


Figura 8: Viabilidade celular da co-cultura SaOS-2/FG analisada pelo ensaio de MTT após a indução com ou sem estímulos bacterianos (10µg/mL de LPS e 5µg/mL de Pg) e com radiação ionizante (16 e 20Gy). Teste estatístico: Ordinary one-way ANOVA (**p<0,001; ****p<0,0001).

Diante dos resultados encontrados, o modelo *in vitro* de osteorradionecrose foi estabelecido como monocultura celular de células SaOS-2 submetidas a 16Gy de radiação ionizante sem estímulo bacteriano. E, para o modelo em co-cultura, foi estabelecida a dose de 20Gy com 10µg/mL de LPS e 5µg/mL de PG.

3.2. PARTE 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS TERAPIAS DE MODULAÇÃO DA VIA DE REPARO CELULAR NO MODELO

3.2.1. Viabilidade celular

Os tratamentos propostos não foram capazes de aumentar a viabilidade celular. Os tratamentos com 2,5, 5 e 10µM de curcumina reduziram a viabilidade celular em 32,6%, 28,1% e 41,9%, respectivamente. Já os tratamentos com 0,5, 1 e 5µM de bpV(pic) reduziram em 23,5%, 49,7% e 55,7%, de modo respectivo. E, o tratamento com 5, 10 e 15J/cm² de terapia de fotobiomodulação reduziu a viabilidade celular em 5,2%, 30,2% e 28,0%. As reduções de viabilidade celular significativas ocorreram com as doses de 10µM de curcumina e 1µM de bpV(pic), sendo essas, portanto, doses citotóxicas (Figura 9).

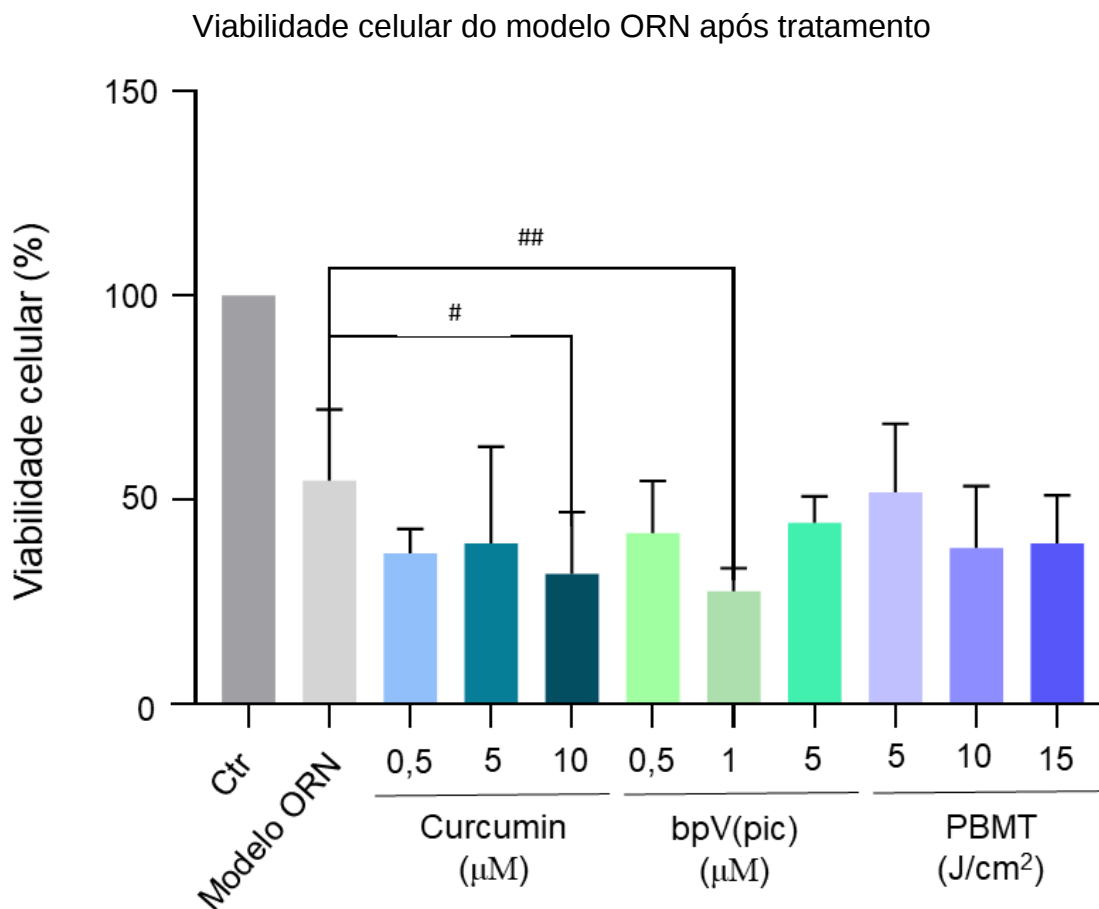


Figura 9: Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após a aplicação de curcumina, bpV(pic) e terapia de fotobiomodulação (PBMT) do modelo de ORN *in vitro* estabelecido na parte 1 (células SaOS-2 submetidas a 16Gy de radiação ionizante sem estímulo bacteriano). Ctr: Grupo controle (0 Gy). Teste estatístico: Teste de Kruskal Wallis test (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$).

3.2.2. Mensuração de óxido nítrico

A concentração de NO após o tratamento não foi possível devido à baixa taxa de produção.

3.2.3. Avaliação do tratamento no modelo em co-cultura

O modelo em co-cultura SaOS-2/FG foi estimulado com com radiação ionizante (20Gy) e estímulo bacteriano (10μg/mL de LPS e 5μg/mL de Pg). Em relação ao tratamento, a co-cultura não mostrou diferença na viabilidade celular dos grupos tratados com 2,5μM de curcumina, 1μM de bpV(pic) e 3J/cm² de PBMT. Houve queda de 1,4% e de 5,5% na viabilidade celular com os tratamentos de curcumina isolada ou associada com PBMT, respectivamente. Também houve queda de 3% com a associação de bpV(pic) e PBMT. Porém, bpV(pic) e PBMT isolados conseguiram aumentar, de forma respectiva, a viabilidade em 6,2% e 10,6% (Figura 10).

Viabilidade celular da co-cultura SaOS-2/FG após indução do modelo e tratamento

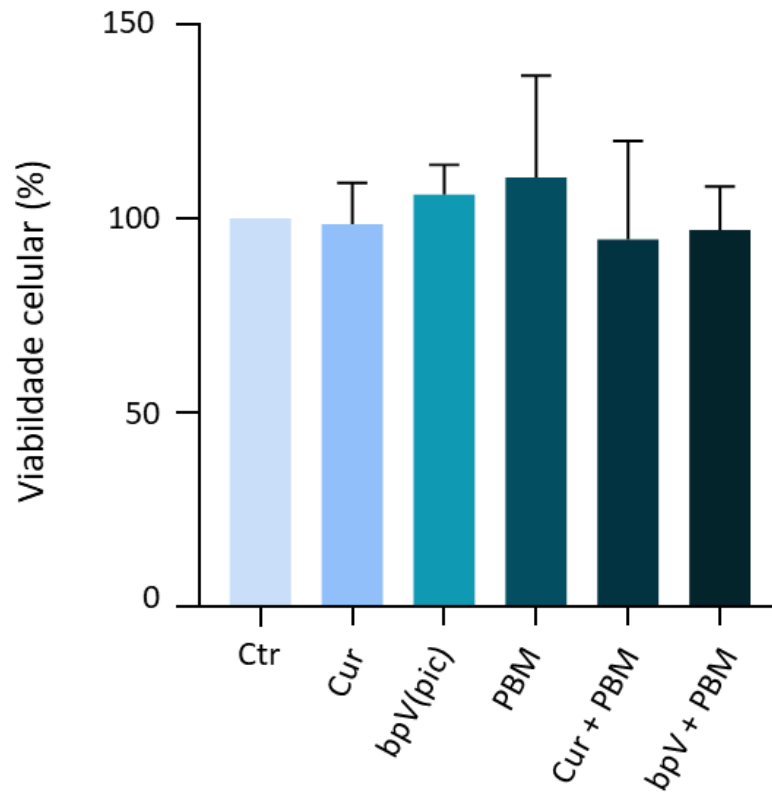


Figura 10: Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após a aplicação de curcumina, bpV(pic) e terapia de fotobiomodulação (PBMT) na co-cultura de SaOS-2/FG com radiação ionizante (20Gy) e estímulo bacteriano (10µg/mL de LPS e 5µg/mL de Pg). Ctr: Modelo sem tratamento. Doses utilizadas: Cur (curcumina): 2,5µM; bpV(pic): 1µM; PBMT: 3 J/cm². Teste estatístico: Ordinary one-way ANOVA (p>0,05).

4. DISCUSSÃO

A osteorradição é uma condição limitante que afeta negativamente a qualidade de vida dos pacientes visto que a manifestação clínica é caracterizada por dor crônica, trismo, mau odor, diminuição da capacidade de cicatrização dos tecidos e, em casos mais graves, fístula orocutânea e fraturas patológicas [11]. No entanto, o tratamento não está estabelecido na literatura. Portanto, é importante que novas alternativas clínicas viáveis para o tratamento da osteorradição sejam estudadas.

As técnicas de pesquisa *in vitro* e *in vivo* auxiliam na avaliação de novas terapias, permitindo a análise a nível molecular, celular e tecidual antes da aplicação clínica. Entretanto, como a ORN é uma condição complexa e multifatorial, mimetizar essa condição clínica em modelos laboratoriais permanece um desafio. Na literatura, as estratégias medicamentosas para ORN são geralmente estudadas *in vivo*

usando modelos animais de ratos [26-27]. Por outro lado, modelos *in vitro* para o estudo dessas lesões ainda não foram estabelecidos, sendo este o primeiro a propor o desenvolvimento de modelo *in vitro* de ORN.

Os efeitos adversos da radioterapia e quimioterapia na saúde oral incluem comprometimento da função imunológica e da salivação [28-29]. Essas alterações são responsáveis pela disbiose da microbiota oral. A disbiose é um desequilíbrio que pode comprometer a saúde oral pela elevada presença de certas bactérias e uma redução na diversidade da microbiota [28, 30]. Além disso, a osteorradionecrose é caracterizada por osso exposto e necrótico, e essas lesões podem ser infectadas pela colonização de células da flora bacteriana local [31]. Assim, o estímulo bacteriano tem significativa importância clínica. No entanto, a tentativa de usar estímulos bacterianos *in vitro* não mostrou resultados promissores.

Poucos estudos avaliaram os efeitos da radioterapia nas células osteoblásticas. A célula MC3T3-E1 é uma célula osteoblástica derivada da calvária de camundongos. Essas células de osteoblastos de camundongos foram irradiadas com 0,4, 4, 6 e 8Gy. Após a radiação, as células demonstraram diminuição da proliferação celular de maneira dependente da dose [32-34]. Quando osteoblastos alveolares humanos primários foram irradiados *in vitro* com 2, 6 e 10Gy, foi observada a mesma redução na proliferação celular de forma dose-dependente e as células apresentaram mudanças na morfologia [35]. Este é o primeiro estudo a avaliar o efeito da radiação ionizante nas células SaOS-2, sendo que doses baixas de radiação (4, 6, 8 e 10Gy) não foram capazes de reduzir a proliferação celular de forma significativa. Com isso, observou-se que as células SaOS-2 são resistentes a radiação ionizante, com alteração na viabilidade dependente de doses mais altas, como 12, 16 e 20Gy.

De acordo com a teoria mais recente da patogênese da ORN, após a radiação, há um aumento na presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) e TGF- β -1 no tecido e isso resulta em um processo envolvendo inflamação precoce, fibrose e remodelamento [8]. O óxido nítrico é um radical reativo citotóxico presente em processos inflamatórios [36]. Em um estudo anterior, a produção de NO foi estimulada em SaOS-2 por 10 μ g/mL LPS [37]. No entanto, neste estudo, a mesma dose de 10 μ g/mL LPS associada a radiação ionizante não demonstrou esse efeito significativo. Este estudo piloto foi o primeiro a irradiar células SaOS-2 e os resultados demonstram a resistência celular aos estímulos aplicados.

Em relação aos tratamentos analisados, a curcumina tem sido considerada por suas propriedades citoprotetoras, antioxidantes e anti-inflamatórias, apresentando proteção celular em situações de citotoxicidade e estresse oxidativo [38]. Recentemente, o estudo de Ma e colaboradores (2021) [39] demonstrou os efeitos do uso de curcumina em um modelo *in vitro* de osteoporose diabética, dentre eles, houve redução da apoptose por diminuição do estresse oxidativo e autofagia induzida por ROS. Em outro estudo, Hatefi e colaboradores (2018) relataram que a curcumina apresentou efeitos inibitórios no processo de osteoporose em pacientes com lesão medular, e assim houve melhora nos parâmetros densitométricos, redução da perda óssea e diminuição dos biomarcadores ósseos [40]. Já as estruturas compostas incorporadas com bpV (pic) podem prevenir a apoptose e promover osteogênese e angiogênese *in vivo* para o tratamento de necrose avascular da cabeça femoral [41]. Além disso, quando células são submetidas ao estresse oxidativo, o PBMT pode reduzir as ROS [42]. No osso irradiado, o PBMT pode acelerar a regeneração óssea pelo aumento do número de osteócitos, controle da resposta inflamatória e aumento da vascularização [43]. A fotobiomodulação e a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) foram utilizadas como adjuvantes do procedimento cirúrgico no tratamento da ORN e em 12 meses de acompanhamento não foi observada recidiva [44]. O tratamento conservador com aPDT foi eficiente no controle da lesão [45]. PBMT é uma ferramenta potencial para melhorar a cicatrização óssea após a radiação ionizante, *in vivo* a terapia pode melhorar a formação de osso novo e a vascularização local [26].

Assim, embora a curcumina, bpV(pic) e PBMT sejam possíveis agentes no tratamento da osteorradionecrose, ao aplicar esses tratamentos em células SaOS-2 previamente estimuladas com radiação ionizante, não foram encontradas diferenças significativas para o retorno da viabilidade celular. Diante de novas teorias da patogênese da ORN, como a possível desregulação da atividade dos fibroblastos, novos tratamentos têm sido propostos como a associação de pentoxifilina e tocoferol (vitamina E), ambos os agentes podem reduzir os danos produzidos pelos radicais livres [46]. O uso de pentoxifilina e tocoferol em estudos clínicos mostrou bons resultados como redução da progressão da fratura e da quantidade estimada de osso exposto. Esses resultados demonstraram que o uso de tratamento antioxidante pode ter resultados bem-sucedidos no tratamento da ORN [47].

A teoria mais recente que explica a patogênese da ORN propõe que o dano ao osso é causado por fibrose induzida por radiação. Nesse sentido, as células ósseas são danificadas como resultado da inflamação aguda que ocorre pela geração de

radicais pelos fibroblastos desregulados [46]. Sendo assim, evidencia-se a importância dos fibroblastos para o processo de desregulação das células ósseas. Associando os achados com a patogênese da ORN, que envolve essa interação de células ósseas e células fibroblásticas, os próximos passos do projeto buscam o estabelecimento de um modelo *in vitro* que adicione fibroblastos em co-cultura com as células osteoblastos semelhantes.

4.1. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este foi um estudo piloto que auxiliou no conhecimento da resposta da célula SaOS-2 após estímulo bacteriano e de radiação ionizante. Dessa forma, foi possível conhecer um pouco mais do comportamento celular e formular novos objetivos para o estudo da modulação do processo de reparo da ORN. Para dar continuidade, novos experimentos serão desenvolvidos:

1) Como visto anteriormente, a patogênese da ORN envolve a interação entre osteoblastos e fibroblastos, sendo assim, o próximo passo será o estabelecimento de um modelo de células humanas imortalizadas do tipo *osteoblasto-like* (SaOS-2) e cultura primária de fibroblastos gengivais humanos (FG) em co-cultura usando membranas Transwell® e induzindo as células por radiação ionizante. Após o estabelecimento do modelo em co-cultura, grupos experimentais serão propostos e tratados com veículo, Curcumina, bpV(pic) e PBMT. A partir dos resultados da viabilidade celular em diferentes doses, as terapias serão investigadas em relação a expressão proteica e gênica de citocinas pró-inflamatórias, mensuração da produção de óxido nítrico, morfologia celular e ensaio de migração. Além disso, será realizado também o ensaio de detecção de ROS e o ensaio de células-tronco.

2) As doses utilizadas nesse estudo mostraram-se citotóxicas. Sendo assim, os experimentos deverão ser repetidos reduzindo as doses da curcumina, do bpV(pic) e da terapia de fotobiomodulação. É possível que doses mais baixas possam apresentar resultados significativos;

5. CONCLUSÃO

A dose de radiação ionizante de 16Gy sem estímulo bacteriano foi capaz de reduzir a viabilidade celular e aumentar a produção de óxido nítrico. Assim, esse modelo pode ser utilizado para estudos *in vitro* em células SaOS-2 para investigar a modulação do processo de reparo ósseo na osteorradionecrose. O uso de curcumina,

bpV(pic) e terapia de fotobiomodulação não mostraram aumento da viabilidade celular nas doses utilizadas neste estudo. Portanto, novas doses e mais ensaios devem ser investigados para verificar o tratamento mais adequado para a osteorradição.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pela Chamada CNPq/MCTI/FNDCT no 18/2021 – UNIVERSAL – Faixa B e pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da Universidade de Brasília (UnB) 2022/2023.

REFERÊNCIAS

1. Chronopoulos A, Zarra T, Ehrenfeld M, Otto S. Osteoradionecrosis of the jaws: definition, epidemiology, staging and clinical and radiological findings. A concise review. *Int Dent J*. 2018;68(1):22–30.
2. Frankart AJ, Frankart MJ, Cervenka B, Tang AL, Krishnan DG, Takiar V. Osteoradionecrosis: Exposing the Evidence Not the Bone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys [Internet]*. 2021;109(5):1206–18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.12.043>
3. Rahman QB, Iocca O, Kuffa K, Shanti RM. Global Burden of Head and Neck Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am [Internet]*. 2020;32(3):367–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coms.2020.04.002>
4. Alterio D, Marvaso G, Ferrari A, Volpe S, Orecchia R, Jereczek-Fossa BA. Modern radiotherapy for head and neck cancer. *Semin Oncol [Internet]*. 2019;46(3):233–45. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.07.002>
5. Guo Z, Shu Y, Zhou H, Zhang W, Wang H. Radiogenomics helps to achieve personalized therapy by evaluating patient responses to radiation treatment. *Carcinogenesis*. 2014;36(3):307–17.
6. Marx RE. A New Concept of Its Pathophysiology. *Growth (Lakeland) [Internet]*. 1983;41(5):283–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6572704>
7. Leonetti JP, Weishaar JR, Gannon D, Harmon GA, Block A, Anderson DE. Osteoradionecrosis of the skull base. *J Neurooncol [Internet]*. 2020;150(3):477–82. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03462-3>
8. Delanian S, Lefaix J-L. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol*. 2004;119–31.
9. Xu J, Zheng Z, Fang D, Gao R, Liu Y, Fan ZP, et al. Early-stage pathogenic sequence of Jaw osteoradionecrosis in vivo. *J Dent Res*. 2012;91(7):702–8.
10. Bras J, de Jonge HKT, van Merkesteyn JPR. Osteoradionecrosis of the mandible: Pathogenesis. *Am J Otolaryngol Neck Med Surg*. 1990;11(4):244–50.
11. Iqbal Z, Kyzas P. Analysis of the critical dose of radiation therapy in the incidence of Osteoradionecrosis in head and neck cancer patients: a case series. *BDJ Open [Internet]*. 2020;6(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41405-020-00044-3>
12. Beaumont S, Bhatia N, McDowell L, Fua T, McCullough M, Celentano A, et al. Timing of dental extractions in patients undergoing radiotherapy and the incidence of osteoradionecrosis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Oral Maxillofac Surg [Internet]*. 2021;59(5):511–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2020.10.006>
13. Raggio BS, Winters R. Modern management of osteoradionecrosis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;26(4):254–9.
14. De Felice F, Tombolini V, Musio D, Polimeni A. Radiation Therapy and Mandibular Osteoradionecrosis: State of the Art. *Curr Oncol Rep*. 2020;22(9).
15. Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa MC. Curcumin and health. *Molecules*. 2016;21(3):1–22.
16. Normando AGC, de Meneses AG, de Toledo IP, Borges GÁ, de Lima CL, dos Reis PED, et al. Effects of turmeric and curcumin on oral mucositis: A

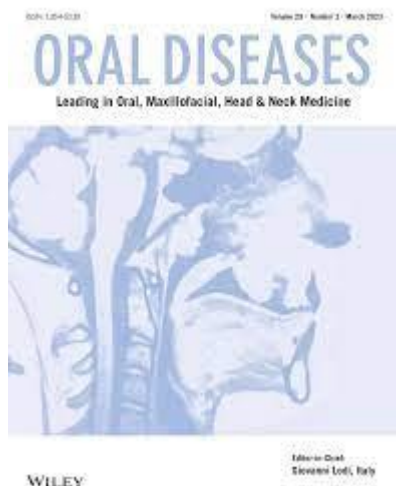
- systematic review. *Phyther Res.* 2019;33(5):1318–29.
17. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595(September 2001):105–25.
 18. Chauhan A, Sah DK, Kumari N, Kalra N, Soni R, Bhatt AN. PTEN inhibitor bpV(HOPic) confers protection against ionizing radiation. *Sci Rep [Internet].* 2021;11(1). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80754-8>
 19. Cao L, Graue-Hernandez EO, Tran V, Reid B, Pu J, Mannis MJ, et al. Downregulation of PTEN at corneal wound sites accelerates wound healing through increased cell migration. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(5):2272–8.
 20. Kalhori KAM, Vahdatinia F, Jamalpour MR, Vescovi P, Fornaini C, Merigo E, et al. Photobiomodulation in Oral Medicine. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg.* 2019;37(12):837–61.
 21. Mosca RC, Adrian, Albasha O, Bass K, Arany P. Photobiomodulation Therapy for Wound Care: A Potent, Noninvasive, Photoceutical Approach. *Wound Care.* 2019;25(1):157–67.
 22. Zadic Y, Arany PR, Fregnari ER, Bossei P, Antunes HS, Bensadoun R-J, et al. Systematic review of growth factors and cytokines for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer.* 2020;28(5):2485–98.
 23. Aguiar BRL de, Guerra ENS, Normando AGC, Martins CC, Reis PED dos, Ferreira EB. Effectiveness of photobiomodulation therapy in radiation dermatitis: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol [Internet].* 2021;162(October 2020):103349. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103349>
 24. Albiero ML, Stipp RN, Saito MT, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, et al. Viability and Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Progenitor Cells Are Maintained After Incubation With *Porphyromonas gingivalis* Protein Extract . *J Periodontol.* 2017;88(11):e188–99.
 25. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131–8.
 26. de Oliveira SV, dos Reis T, Amorim J, Rocha FS, Marques MM, Guerra ES, et al. Efficacy of photobiomodulation therapy on healing of ionizing irradiated bone: a systematic review of in vivo animal studies. *Lasers Med Sci [Internet].* 2022;37(9):3379–92. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03649-2>
 27. Tamplen M, Trapp K, Nishimura I, Armin B, Steinberg M, Beumer J, et al. Standardized analysis of mandibular osteoradionecrosis in a rat model. *Otolaryngol - Head Neck Surg.* 2011;145(3):404–10.
 28. Wang Y, Xue J, Zhou X, You M, Du Q, Yang X, et al. Oral microbiota distinguishes acute lymphoblastic leukemia pediatric hosts from healthy populations. *PLoS One.* 2014;9(7):3–10.
 29. Meurman JH, Grönroos L. Oral and dental health care of oral cancer patients: hyposalivation, caries and infections. *Oral Oncol [Internet].* 2010;46(6):464–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.02.025>
 30. Wang Y, Zeng X, Yang X, Que J, Du Q, Zhang Q, et al. Oral Health, Caries Risk Profiles, and Oral Microbiome of Pediatric Patients with Leukemia Submitted to Chemotherapy. *Biomed Res Int.* 2021;2021.
 31. Zhu Y, Liang J, Wang F, Li J, Wang C, Hou J. Bacterial spectrum analysis and antimicrobial susceptibility study of osteoradionecrosis of the jaw in Southern China. *Oral Dis.* 2022;28(7):2015–25.

32. Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg*. 2000;106(5):1049–61.
33. Gal TJ, Munoz-Antonia T, Muro-Cacho CA, Klotch DW. Radiation effects on osteoblasts in vitro: A potential role in osteoradionecrosis. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2000;126(9):1124–8.
34. He J, Qiu W, Zhang Z, Wang Z, Zhang X, He Y. Effects of irradiation on growth and differentiation-related gene expression in osteoblasts. *J Craniofac Surg*. 2011;22(5):1635–40.
35. Amler AK, Schlauch D, Tüzüner S, Thomas A, Neckel N, Tinhofer I, et al. Pilot investigation on the dose-dependent impact of irradiation on primary human alveolar osteoblasts in vitro. *Sci Rep [Internet]*. 2021;11(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99323-8>
36. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(4):471–9.
37. Souza GL de, Moura CCG, Silva ACA, Marinho JZ, Silva TR, Dantas NO, et al. Effects of zinc oxide and calcium-doped zinc oxide nanocrystals on cytotoxicity and reactive oxygen species production in different cell culture models. *Restor Dent Endod*. 2020;45(4):1–16.
38. Guan G, Lei L, Lv Q, Gong Y, Yang L. Curcumin attenuates palmitic acid-induced cell apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress in H9C2 cardiomyocytes. *Hum Exp Toxicol*. 2019;38(6):655–64.
39. Ma B, Guan G, Lv Q, Yang L. Curcumin ameliorates palmitic acid-induced SaOS-2 cell apoptosis via inhibiting oxidative stress and autophagy. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2021;2021.
40. Hatefi M, Ahmadi MRH, Rahmani A, Dastjerdi MM, Asadollahi K. Effects of Curcumin on Bone Loss and Biochemical Markers of Bone Turnover in Patients with Spinal Cord Injury. *World Neurosurg [Internet]*. 2018;114:e785–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.03.081>
41. Li F, Cao Z, Li K, Huang K, Yang C, Li Y, et al. Cryogenic 3D Printing of β -TCP/PLGA Composite Scaffolds Incorporated With BpV (Pic) for Treating Early Avascular Necrosis of Femoral Head. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;9(January):1–12.
42. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*. 2017;4(3):337–61.
43. Escudero JSB, Perez MGB, de Oliveira Rosso MP, Buchaim DV, Pomini KT, Campos LMG, et al. Photobiomodulation therapy (PBMT) in bone repair: A systematic review. *Injury [Internet]*. 2019;50(11):1853–67. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2019.09.031>
44. Magalhães IA, Forte CPF, Viana TSA, Teófilo CR, Lima Verde R de MB, Magalhães DP, et al. Photobiomodulation and antimicrobial photodynamic therapy as adjunct in the treatment and prevention of osteoradionecrosis of the jaws: A case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet]*. 2020;31(August):101959. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101959>
45. Pedroni ACF, Miniello TG, Hirota C, Carvalho MH, Lascala CA, Marques MM. Successful application of antimicrobial photodynamic and photobiomodulation therapies for controlling osteoradionecrosis and xerostomia after laryngeal carcinoma treatment: A case report of full oral rehabilitation. *Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet]*. 2020;31(December 2019):101835. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101835>
46. Lyons A, Ghazali N. Osteoradionecrosis of the jaws: current understanding of

- its pathophysiology and treatment. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008;46(8):653–60.
47. Kolokythas A, Rasmussen JT, Reardon J, Feng C. Management of osteoradionecrosis of the jaws with pentoxifylline–tocopherol: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2019;48(2):173–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2018.08.007>

APÊNDICES

NORMAS DA RESVISTA



Author Guidelines

SUBMISSION

Once the submission materials have been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online at <https://wiley.atyponrex.com/journal/ODJ>.

GENERAL

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

ETHICAL GUIDELINES

Oral Diseases adheres to the ethical guidelines given below for publication and research.

Authorship and Acknowledgements

Authorship: Oral Diseases adheres to the International Standards for Authors published by the Committee on Publication Ethics (COPE). All authors named on a paper should agree to be named on the paper, and all authors so named should agree to the submission of the paper to Oral Diseases and approve the submitted and

accepted versions of the publication. Any change to the author list should be approved by all authors, including any author who has been removed from the list.

Oral Diseases also adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that the corresponding author submit a short description of each individual's contribution to the research and its publication. Upon submission of a manuscript all co-authors should also be registered with a correct e-mail addresses. If any of the e-mail addresses supplied are incorrect, the corresponding author will be contacted by the Journal Administrator.

For all articles, the journal mandates the CRediT (Contribution Roles Taxonomy), for more information please see Author Services.

Acknowledgements: Authors must acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research. Authors must acknowledge any assistance that they have received (e.g. provision of writing assistance, literature searching, data analysis, administrative support, supply of materials). If/how this assistance was funded should be described and included with other funding information. "Acknowledgements" should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. Where people are acknowledged, a cover letter demonstrating their consent must be provided.

Conflict of Interest and Source of Funding

All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Authors are also required to disclose any possible conflict of interest. These include financial (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee). Information on sources of funding and any potential conflict of interest should be disclosed at submission under the heading "Acknowledgements".

MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles: Manuscripts reporting laboratory investigations, well-designed and controlled clinical research, and analytical epidemiology are invited. Studies related to aetiology, pathogenesis, diagnosis, prevention and treatment are all of interest, but all papers must be based on rigorous hypothesis-driven research. Areas of interest include diseases affecting any structures of the mouth; cancer and pre-cancerous conditions; saliva and salivary glands; bone and hard tissues; relationship between oral, periodontal, and dental conditions and general health; pain; behavioral dentistry; chemosensory, developmental, geriatric, and motor disorders.

MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

Format

Language: Authors should write their manuscripts in British English using an easily readable style. Authors whose native language is not English should have a native English speaker read and correct their manuscript. Spelling and phraseology should conform to standard British usage and should be consistent throughout the paper. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

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

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

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

Structure: All papers submitted to Oral Diseases should include:

- Title Page
- Structured Abstract
- Main text
- References

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

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

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

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

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

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

References

References should be prepared according to the Publication Manual of the American Psychological Association (6th edition). This means in-text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). For references with three to five authors, all authors should be listed only on the first occurrence of the in-text citation, and in subsequent in-text occurrences only the first author should be listed followed by 'et al.'. The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper.

A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the APA website. Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

Journal article

Example of reference with 2 to 7 authors

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

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

Example of reference with more than 7 authors

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

Book edition

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

Tables, Figures and Figure Legends

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

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

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same type size as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and unit, and follow SI nomenclature common to a particular field. Unusual units and abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc).