



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

LUIZ HENRIQUE FERREIRA DOS SANTOS BONFIETTI

**“Terapia Coadjuvante com Alendronato de Sódio
no Tratamento da Doença Periodontal
Experimental em Ratos.”**

**Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Graduação em Odontologia da
Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.**

Orientador: Prof. Ass. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Co-orientador: Prof. Adj. Dr. Glauco Issamu Miyahara

ARAÇATUBA – SP

2013

Dedicatória

À Deus

Ofereço esta conquista à Deus, que me deu força e persistência para ultrapassar todos os obstáculos encontrados, iluminando meu caminho em todos os momentos, permitindo que eu nunca desistisse.

Obrigado meu Deus por colocar ao meu lado uma família amorosa e compreensiva, amigos acolhedores e professores generosos. Com eles pude vivenciar momentos maravilhosos de aprendizado e crescimento pessoal.

Obrigado Senhor por todas as graças concedidas e por cada momento que estive comigo, protegendo-me e guiando-me sempre. Minha eterna gratidão por mais esta concretização em minha vida!

Aos Meus Pais

Á minha mãe *Soraia*, ao meu pai *Luiz Carlos*

Ambos me deram o sustentáculo para a vida. Devo a vocês minha formação humana e profissional.

Os exemplos de responsabilidade, trabalho, respeito e solidariedade me tornaram uma pessoa capaz de amar e ser feliz.

Foi o incentivo em ir além, que sempre recebi de vocês, tendo em mente que através do esforço do nosso trabalho podemos alcançar grandes conquistas que me fizeram chegar à este momento.

Compartilho com vocês os méritos desta conquista..

Estarão sempre em meu coração.

Ao Meu Irmão

Ao meu irmão *Gustavo*

Minha gratidão pelo apoio sempre que precisei, pelos avisos e conselhos durante minha caminhada nesta fase de graduação.

Meus sinceros votos para que tenha sucesso absoluto em sua profissão.

Amo você!

À **Disciplina de Periodontia e ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

À **Banca Examinadora**, Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida, Prof. Dr. Éder Ricardo Biasoli e à Doutouranda Paula Lazilha Faleiros, pela disponibilidade em avaliar o meu trabalho, contribuindo integralmente para seu enriquecimento.

À minha “chefa” **Vivian Cristina Noronha Novaes**, por ter-me convidado e incentivado a realizar este trabalho, por ter-me transmitido todos os seus conhecimentos técnicos e científicos em todos os estágios da pesquisa, inclusive foi muito importante nesta etapa final do TCC. Sempre presente e disponível, não mensurando esforços para me guiar. A maioria dos meus conhecimentos adquiridos dentro do departamento, dentro da minha pesquisa, eu devo a você e por isso sou imensamente grato à sua pessoa. Tenho você como grande amiga e estarei a disposição sempre que precisar. #nãosaídopédobizola

Ao **Prof. Dr. Edilson Ervolino**, sou grato pela sua contribuição, constante e segura na etapa final desse trabalho. Sua extrema atenção e experiência com as análises histológicas aprimoraram brilhantemente os resultados da pesquisa. Agradeço pela presença sempre tranquila, transmitindo seus conhecimentos e pela dedicação prestada neste estudo.

Ao meu mestre e grande amigo **Professor Dr. Éder Ricardo Biasoli**, por ter me apoiado e confiado em minha decisão no momento de alteração de tema do Trabalho de Conclusão de Curso, por ter aceitado compor a banca examinadora deste

trabalho e, claro, por ter tido a oportunidade de ser orientado por este grande professor que o senhor é, durante boa parte da minha graduação e pelos momentos de air soft que pude aprender como funcionam os campos de batalha! Muito obrigado pela sua amizade Professor!

*Ao meu orientador **Professor Dr. Juliano Milanezi de Almeida**, por ter me acolhido e aceitar-me como orientado e por estar presente e envolvido durante todo o período da minha Iniciação Científica. Sempre disponível e humildade. Você é além de um professor, clínico, pesquisador, um cidadão sempre presente, disposto a ajudar os que estão à sua volta a qualquer momento. Seus atributos de exequibilidade foram fundamentais para que esse trabalho fosse concluído. Muito obrigado pelo conhecimento transmitido, pelas dicas, pelos conselhos.*

BONFIETTI, LHFS. **“Terapia Coadjuvante com Alendronato de Sódio no Tratamento da Doença Periodontal Experimental em Ratos.” Projeto de Pesquisa.** Trabalho de Conclusão de Curso – Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2013.

Resumo

Constitui propósito do presente estudo avaliar histomorfometricamente, o uso do alendronato de sódio como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico de Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) da doença periodontal (DP) experimental em ratos. A DP foi induzida pela adaptação de um fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores de 90 ratos machos. Decorridos 7 dias, a ligadura foi removida e os animais foram divididos em 3 grupos experimentais de 30 animais e submetidos aos seguintes procedimentos: Grupo ST – sem tratamento periodontal local; Grupo RAR – RAR e irrigação com 1 ml de soro fisiológico; Grupo RAR + AS – RAR e irrigação com 1 ml de alendronato de sódio ($10^{-5}M$). Dez animais de cada grupo foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após remoção da ligadura. As hemimandíbulas foram submetidas ao processamento histológico para análise histológica e histométrica da porcentagem de osso na região de furca (POF). No Grupo ST aos 7 dias, um intenso infiltrado inflamatório estava presente e todos os espécimes apresentavam espículas de osso necrosado na região de furca com grande atividade osteoclástica. Aos 15 e 30 dias a inflamação ainda era intensa e o tecido ósseo interradicular ainda apresentava atividade osteoclástica e áreas reabsortivas no cimento. No Grupo RAR aos 7 dias, o tecido conjuntivo apresentou menor infiltrado inflamatório comparado ao grupo ST. Aos 15 e 30 dias houve uma redução progressiva do volume ocupado pelo infiltrado inflamatório. No grupo RAR + AS, aos 7 dias, o infiltrado inflamatório mostrou-se bastante discreto, o septo interradicular mostrou-se com um contorno regular e raros foram os osteoclastos observados. Aos 15 e 30 dias, o tecido conjuntivo mostrou-se isento de inflamação, com grande quantidade de fibras colágenas, incluindo aquelas que se inseriam no cimento e no osso alveolar. O septo interradicular apresentou-se bastante regular com osteócitos vitais e raros eram osteoclastos. Áreas de reabsorção cementária ativa foram observadas na maioria dos espécimes aos 7 dias pós-tratamento e aos 30 dias, áreas de reabsorção de cimento estavam inativas e sofrendo processo de reparação. Os dados coletados foram avaliados estatisticamente com nível de significância de 5%. Os animais do Grupo ST aos 7 dias ($23,55\% \pm 8,38$), demonstraram menor POF ($p < 0,05$) quando comparados com o período de 15 dias ($38,04\% \pm 7,51$). Nos animais do Grupo RAR +

AS observou-se uma maior POF no decorrer dos períodos com diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparou-se o período de 7 dias ($62,94 \pm 8,11$) com o período de 30 dias ($71,75 \pm 5,38$). Os animais do Grupo RAR + AS apresentaram maior POF ($p < 0,05$) aos 7, 15 e 30 dias, quando comparado com os animais do Grupo RAR nos respectivos períodos. Dentro dos limites do presente estudo, podemos concluir que o AS utilizado como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico (RAR) da DP promoveu melhor reparo periodontal.

Palavras chaves: Doença periodontal. Terapia periodontal. Alendronato de sódio.

BONFIETTI, LHFS. Adjuvant Therapy with Sodium Alendronate for Treatment of Experimental Periodontal Disease in Rats. **Projeto de Pesquisa**. Trabalho de Conclusão de Curso – Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; (2013).

Abstract

The aim of this study is to evaluate histomorphometrically, the use of sodium alendronate (SA) as adjunctive therapy for the treatment of mechanical scaling and root planing (SRP) periodontal disease (PD) in rats. The DP was induced by placing a ligature thread around the first molars of 90 male rats . After 7 days of placing the ligature, the animals were divided into 3 groups of 30 animals and following treatments: Group ST - Only the removal of the ligature; SRP Group - Removal of ligature followed by SRP and irrigation with 1 ml of saline solution; and Group SRP + SA - Removal of ligatur followed by SRP and irrigation with 1 mL of SA (10 - 5M) . Ten animals from each group were euthanized at 7, 15 and 30 days after removal of the ligature. To analyze the results obtained were semi -serial sections with a thickness of 4 μ m for histomorphometric analysis. In the ST group at 7 days, an intense inflammatory infiltrate was present and all specimens showed spicules of necrotic bone in the furcation area with great osteoclastic activity. At 15 and 30 days was still intense inflammation and bone interradicular still had osteoclastic activity and resorptive areas in the cement. In SRP Group to 7 days, the tissue showed less inflammatory infiltrate compared to the ST Group . At 15 and 30 days there was a reduction in the volume occupied by the inflammatory infiltrate progressively. RAR + AS Group , at 7 days , the inflammatory infiltrate was fairly discreet, the septum interradicular showed up with a regular outline and rare osteoclasts were observed . At 15 and 30 days showed the tissue was free of inflammation with collagen, including those which fell within the cementum and alveolar bone. The septum interradicular presented fairly regular with vital osteocytes and osteoclasts were rare. Areas of active resorption were observed in most specimens at 7 days post- treatment and at 30 days, areas of cementum resorption were inactive and undergoing repair process. The data collected were evaluated statistically with a significance level of 5 %. The animals in Group ST at 7 days (23.55 ± 8.38 %) showed less POF ($p < 0.05$) compared with the period of 15 days (38.04 ± 7.51 %). In

SA + SRP Group observed an increase in the POF during periods with significant difference ($p < 0.05$) when compared to the period of 7 days (62.94 ± 8.11) with the period 30 days (71.75 ± 5.38). The animals in SA + SRP Group, POF had higher ($p < 0.05$) after 7, 15 and 30 days compared with the SRP Group of animals in the respective periods. Within the limits of this study, we can conclude that SA used as adjunctive therapy to mechanical treatment (SRP) of PD promoted better periodontal healing.

Keywords: Periodontal disease. Periodontal therapy. Alendronate sodium.

Lista de Figuras

Figura 1	Fotomicrografias evidenciando aspecto histológico dos tecidos periodontais nos grupos ST, RAR, RAR + AS 7 dias após a remoção da ligadura.	50
Figura 2	Fotomicrografias evidenciando aspecto histológico dos tecidos periodontais nos grupos ST, RAR, RAR + AS 30 dias após a remoção da ligadura.	51
Figura 3	Médias e desvios-padrões ($M \pm DP$) dos dados histométricos da POF (%) na região de furca do primeiro molar inferior, nos diferentes grupos experimentais e períodos.	52

Lista de Abreviaturas e Siglas

AF - Área total da furca.

AS - Alendronato de sódio.

ANOVA - Análise de Variância.

AO - Área ocupada por tecido ósseo.

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais.

DP - Doença Periodontal.

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético.

g – Grama.

Grupo RAR - Grupo Raspagem e Alisamento Radicular.

Grupo ST - Grupo Sem tratamento.

H&E - Expressa a técnica de coloração das lâminas. Hematoxilina e Eosina.

M – Mol.

mg - Miligramas.

mg/Kg - Miligramas por quilogramas.

mm² - Milímetros quadrado.

mM – Milimolar.

mL - Mililitros, equivalente à milésima parte do litro.

µm - Micrômetros.

PE – Periodontite experimental.

POF - Porcentagem de Osso na região de Furca.

RAR - Raspagem e Alisamento Radicular.

ST - Sem tratamento.

Lista de Anexos

Anexo

A Normas de publicação segundo o Periódico “Journal of Periodontology”.

Anexo

B Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Anexo

C Figura representativa dos frascos de anestésicos utilizados na fase experimental da pesquisa.

Anexo

D Figura representativa da indução da PE, do procedimento de RAR e irrigação com AS.

Anexo

E Figura representativa da metodologia adotada para análise histométrica.

Sumário

Introdução	19
Materiais e Métodos	22
Resultados	26
Discussão	29
Conclusão	33
Referências	34
Anexos	45

*Manuscrito para
Publicação¹*

¹Normalização Segundo a Revista *Journal of Periodontology*. (Anexo A)

Título:

Terapia Coadjuvante com Alendronato de Sódio no Tratamento da Doença Periodontal Experimental em Ratos.

Autores:

Luiz Henrique Ferreira dos Santos Bonfietti ¹, Juliano Milanezi de Almeida ^{1,*}, Glauco Issamu Miyahara ².

¹UNESP - Univ Estadual Paulista; Department of Surgery and Integrated Clinic - Division of Periodontics; Araçatuba, São Paulo, Brazil.

²UNESP Univ Estadual Paulista; Department of Pathology and Clinical Exam - Division of Stomatology; Araçatuba, São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:**

Juliano Milanezi de Almeida

Address: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP:

Rua Jose Bonifácio 1193, Centro.

CEP: 16050-300 Araçatuba, SP, Brasil.

Tel/Fax 55- 1836363239

E-mail: jumilanezi@hotmail.com

Número de figuras: 3.

Número de tabelas: 0.

Running title: Alendronato de Sódio como coadjuvante no tratamento da doença periodontal.

Resumo

Constitui propósito do presente estudo avaliar histomorfometricamente, o uso do alendronato de sódio como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico de Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) da doença periodontal (DP) experimental em ratos. A DP foi induzida pela adaptação de um fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores de 90 ratos machos. Decorridos 7 dias, a ligadura foi removida e os animais foram divididos em 3 grupos experimentais de 30 animais e submetidos aos seguintes procedimentos: Grupo ST – sem tratamento periodontal local; Grupo RAR – RAR e irrigação com 1 ml de soro fisiológico; Grupo RAR + AS – RAR e irrigação com 1 ml de alendronato de sódio ($10^{-5}M$). Dez animais de cada grupo foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após remoção da ligadura. As hemimandíbulas foram submetidas ao processamento histológico para análise histológica e histométrica da porcentagem de osso na região de furca (POF). No Grupo ST aos 7 dias, um intenso infiltrado inflamatório estava presente e todos os espécimes apresentavam espículas de osso necrosado na região de furca com grande atividade osteoclástica. Aos 15 e 30 dias a inflamação ainda era intensa e o tecido ósseo interradicular ainda apresentava atividade osteoclástica e áreas reabsortivas no cimento. No Grupo RAR aos 7 dias, o tecido conjuntivo apresentou menor infiltrado inflamatório comparado ao grupo ST. Aos 15 e 30 dias houve uma redução progressiva do volume ocupado pelo infiltrado inflamatório. No grupo RAR + AS, aos 7 dias, o infiltrado inflamatório mostrou-se bastante discreto, o septo interradicular mostrou-se com um contorno regular e raros foram os osteoclastos observados. Aos 15 e 30 dias, o tecido conjuntivo mostrou-se isento de inflamação, com grande quantidade de fibras colágenas, incluindo aquelas que se inseriam no cimento e no osso alveolar. O septo interradicular apresentou-se bastante regular com osteócitos vitais e raros eram osteoclastos. Áreas de reabsorção cementária ativa foram observadas na maioria dos espécimes aos 7 dias pós-tratamento e aos 30 dias, áreas de reabsorção de cimento estavam inativas e sofrendo processo de reparação. Os dados coletados foram avaliados estatisticamente com nível de significância de 5%. Os animais do Grupo ST aos 7 dias ($23,55\% \pm 8,38$), demonstraram menor POF ($p < 0,05$) quando comparados com o período de 15 dias ($38,04\% \pm 7,51$). Nos animais do Grupo RAR + AS observou-se uma maior POF no decorrer dos períodos com diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparou-se o período de 7 dias ($62,94 \pm 8,11$) com o período de 30

dias ($71,75 \pm 5,38$). Os animais do Grupo RAR + AS apresentaram maior POF ($p < 0,05$) aos 7, 15 e 30 dias, quando comparado com os animais do Grupo RAR nos respectivos períodos. Dentro dos limites do presente estudo, podemos concluir que o AS utilizado como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico (RAR) da DP promoveu melhor reparo periodontal.

Palavras chaves: Doença periodontal. Terapia periodontal. Alendronato de sódio.

1. Introdução

A doença periodontal (DP) é caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte ao redor dos dentes. Está associada à liberação de substâncias por microorganismos que agredem diretamente os tecidos periodontais e induzem a destruição tecidual por meio da resposta inflamatória e imunológica do próprio hospedeiro (Page et al., 1997). É amplamente aceito que a iniciação e progressão da DP são causadas pela presença de microorganismos patogênicos que invadem o hospedeiro. Estes microorganismos podem causar danos diretos ao periodonto e danos indiretos por ativar uma variedade de respostas imune-inflamatórias no hospedeiro que resultam em destruição dos tecidos periodontais (Deas et al 2003). Além disso, fatores sistêmicos como o diabetes (Lalla, et al., 1998, 2000) tabaco (McGuire, et al. 1989, Haffajje & Socransky, 2001) estresse (Breivik et al., 2006) e o álcool (Szabo, 1999; Kongstad et al, 2008; Tomofuji et al., 2008; Irie et al., 2008; Jansson et al., 2008; Souza et al 2009) podem influenciar no desenvolvimento e progressão da doença periodontal.

A DP afeta negativamente a qualidade de vida do indivíduo (Aslund et al., 2008; Shanbhag et al., 2012). Por outro lado, a terapia periodontal pode melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela DP (Shanbhag et al., 2012). O tratamento da DP baseia-se na eliminação da microbiota subgengival patogênica pelo procedimento de raspagem e alisamento radicular (RAR) (Kaldahl et al., 1993; Listgarten et al., 1975). Resultados de pesquisas clássicas (Lövdal et al., 1961; Axelsson & Lindhe et al., 1978; Morrison et al., 1980; Axelsson & Lindhe et al., 1981; Badersten et al., 1984; Cobb, 1996), demonstraram que a RAR subgengival cuidadosa é um meio eficaz para eliminar a gengivite e reduzir a profundidade das bolsas periodontais. Entretanto, a literatura tem demonstrado que fatores como o cigarro (Rivera-Hidalgo, 1986; Scabbia 2001; Javed et al., 2012), o diabetes mellitus (Caton et al., 2000; Almeida et al., 2008b; Lalla and Papapanou, 2011), e imunossupressão (Garcia et al., 2010) prejudicam o reparo periodontal frente à RAR, o que leva a necessidade de terapias coadjuvantes ao tratamento de RAR. A prevenção da perda óssea associada com a DP pela modulação da resposta do hospedeiro, pode ser um tratamento coadjuvante eficiente associado a RAR (Tani-Ishii et al., 2003). Assim, a utilização de drogas antirreabsortivas podem ser

uma alternativa eficaz como terapia coadjuvante para o tratamento da doença periodontal.

Os bifosfonatos (BPs) são uma classe de fármacos análogos dos pirofosfatos com alta afinidade a hidroxiapatita (Bradaschia-Correa et al., 2007), que atuam sobre o metabolismo ósseo e são normalmente utilizados na prevenção e tratamento da osteopenia e condições osteoporóticas tais como a osteoporose, doença de Paget e hipercalcemia relacionada a malignidade (Russell et al., 2007). O alendronato de sódio (AS), à semelhança de outros BPs nitrogenados, tais como, pamidronato, neridronato, olpadronato, ibandronato, risedronato e zoledronato ligam-se fortemente aos cristais de apatita, especialmente na superfície de remodelação (Russell et al., 2008). Esses BPs alteram o metabolismo ósseo atuando pela inibição da via do mevalonato, através de sua interação e consequente inativação da enzima farnesil difosfato sintase (Dunford et al, 2001). A interrupção desta via ao nível da referida enzima impede a formação de farnesil difosfato e geranylgeranyl difosfato, os quais são essenciais para prenilação de proteínas, dentre as quais estão Ras, Rho e Rac (Luckman et al, 1998), que atualmente são tidas como os alvos do efeito dessa classe de BPs. Tais proteínas estão relacionadas com a inibição da osteoclastogênese (Abe et al, 2012), com a indução de apoptose prematura em osteoclastos ativos e com significativas alterações na dinâmica do citoesqueleto destas células, impossibilitando a interação da célula com a matriz óssea e a formação do microambiente propício para o início da atividade reabsortiva (Rogers et al, 2011; Ebetino et al, 2011; Coxon et al, 2003; Ory et al, 2008).

O AS é utilizado como droga farmacológica antirreabsortiva que tem se mostrado benéfica em reduzir a reabsorção óssea em mulheres osteopênicas, no aumento da densidade óssea e na diminuição da incidência de fratura (Bone et al., 1997). Estudos têm demonstrado que o AS pode diminuir significativamente a reabsorção óssea sem interferir com a mineralização e qualidade óssea (Yaffe et al., 1999, Tenenbaum et al., 2002), além das suas propriedades antimicrobianas (Hsu et al., 1995; Montalvetti et al., 2001; Menezes et al., 2005).

Na odontologia existem estudos relacionando o uso do AS com a redução da reabsorção óssea após extração dental (Graziani et al, 2008) ou cirurgia periodontal (Binderman ET AL, 2000). Semelhante aos achados de Iizuka et al (1992), Kim et al (2011) encontraram projeções ósseas três dias após extração de dentes inferiores, com a

utilização de AS sistêmico (administração subcutânea) em ratos. Além disso, para abordagens cirúrgicas em odontologia onde materiais de enxerto ósseo e/ou implantes dentais são necessários, o uso dos BPs podem atingir uma nova dimensão para a terapia periodontal (Veena e Prasad, 2012). Segundo Anuj Sharma e Pradeep (2012) a aplicação tópica ou sistêmica foi altamente eficaz na redução da reabsorção do osso alveolar. Porém, houve uma relação entre o uso sistêmico do AS e ocorrência de osteonecrose dos maxilares, deixando claro que existe uma limitação em sua administração sistêmica para o tratamento da doença periodontal.

Estudos que avaliaram os efeitos dos BPs na DP, administrados de forma sistêmica (Brunsvold et al., 1992; Cetinkaya et al, 2008; Wang et al., 2011; Bargman et a., 2012; Weinreb et al., 1994; Menezes et al., 2005; Alencar et al., 2002; Tani-Ishii et al., 2003; Reddy et al., 1995; Lane et al., 2005; Rocha et al., 2001), demonstraram que os BPs são efetivos na prevenção da perda óssea alveolar na DP experimental. Adicionalmente, outros estudos avaliaram o uso dos BPs administrado de forma tópica, com a finalidade de inibir a perda óssea alveolar tanto no tratamento da DP (Goya 2006; Rocha et al., 2001; Lane et al., 2005; Veena & Prasad 2010; Sharma & Pradeep 2012a,b) como após elevação de retalhos (Yaffe et al 1995, e 1997, Binderman et al 2000; Kayanak et al. 2000). Assim, estudos recentes (Shibata et al., 2004; Goya et al., 2006; Sharma et al., 2012 a,b; Pradeep et al., 2012) relatam que a utilização local pode ter mais sucesso terapêutico, controle da concentração da droga, regular ou inibir a reabsorção óssea alveolar e evitar os efeitos indesejáveis do uso sistêmico dos BPs.

Além disso, a dose administrada tem sido frequentemente relatada como um fator muito importante e que afeta a eficácia dos BPs em relação a inibição da perda óssea alveolar (Cetinkaya et al 2008). Estudo experimental ao comparar diferentes concentrações de BPs na DP mostrou que uma baixa concentração de AS inibiu a perda óssea em DP induzida, o que não ocorreu quando comparado a uma alta concentração (Weinreb et al.1994).

Diante do exposto e necessidade de estudos experimentais que afirmam o uso tópico dos BPs no tratamento da DP, constitui propósito do presente estudo avaliar do ponto de vista histomorfométrico, o uso tópico do AS como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico de raspagem e alisamento radicular da doença periodontal experimental em ratos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados no presente estudo 90 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250 a 300g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP – Araçatuba. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 5 dias. Todos os protocolos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA–UNESP, (protocolo nº 01299/2012). A pesquisa foi realizada seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a legislação em vigor (Anexo B).

2.2 Sedação e Anestesia

Inicialmente os animais foram pesados para proporcionar corretamente a dose do anestésico a ser administrado. Os animais receberam anestesia geral, obtida pela associação de 70 mg/kg de Cloridrato de quetamina* e 6 mg/kg de Cloridrato de xilazina** (Anexo C), aplicados intramuscular no *biceps femoris* da pata direita. Nos casos em que não se obteve o necessário efeito do anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

* Vetaset – Fort Dodge Iowa – USA.

** Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil.

*** Sigma, St. Louis, MO, USA.

2.3 Indução da Doença Periodontal

2.3.1 Indução da Periodontite Experimental

Após anestesia geral, todos os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos, facilitando o

acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma sonda e pinça modificada, foi adaptado um fio de algodão número 24****(Anexo D) ao redor dos primeiros molares inferiores, distribuído randomicamente entre o lado direito e esquerdo, ao nível do sulco gengival, e mantidos por meio de nós cirúrgicos. Esta ligadura atuou como irritante gengival favorecendo o acúmulo de placa bacteriana (Johnson, 1975).

**** Corrente Algodão no 24; Coats Corrente, SP, Brasil.

2.4 Grupos Experimentais

Decorridos 7 dias da colocação da ligadura esta foi removida e os ratos foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos experimentais:

Grupo ST (n=30): Animais portadores de DP induzida e sem tratamento mecânico local.

Grupo RAR (n=30): Animais portadores de DP induzida e tratados com RAR, seguida pela irrigação com soro fisiológico.

Grupo RAR + AS (n=30): Animais portadores de DP induzida e tratados com RAR, seguida pela irrigação com alendronato de sódio (10^{-5} Molar).

2.5 Procedimento de Raspagem

O tratamento local com RAR foi realizado com curetas manuais mini – five 1-2 (Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, EUA), através de 10 movimentos de tração disto-mesial nas faces vestibular e lingual. As áreas interproximais e de furca foram raspadas com as mesmas curetas através de movimentos de tração cérvico-oclusais (de Almeida et al. 2008) (Anexo D). Os procedimentos de RAR foram realizados por um mesmo operador experiente, treinado e cego aos grupos experimentais. Os animais do Grupo RAR, após a RAR, foram irrigados com 1ml de soro fisiológico e os animais do Grupo RAR + AS, após a mesma, foram irrigados com 1ml de alendronato de sódio na concentração de 10^{-5} Molar. As soluções (Soro e Alendronato de Sódio) foram irrigadas no interior da bolsa periodontal, de forma lenta, utilizando uma seringa de insulina e agulha sem bisel (Anexo D).

2.6 Períodos Experimentais

Aos 7, 15 e 30 dias após o tratamento preconizado, 10 ratos de cada grupo experimental foram eutanasiados por meio de superdosagem anestésica (Thiopental 50mg/kg). Logo após a eutanásia, a mandíbula de cada animal foi removida, separada em duas partes, para fixação em formol tamponado a 10% por um período mínimo de 48 horas.

2.7 Processamento Histológico

Após fixação das peças por um período mínimo de 48 horas, estas foram lavadas em água corrente por 12 horas e, colocadas para descalcificação em solução de 10% EDTA por um período de aproximadamente 8 semanas, com trocas semanais. Estando as peças suficientemente descalcificadas, estas foram reduzidas, lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, com a face vestibular paralela ao plano de corte. Os cortes foram realizados no sentido mésio-distal, com o cuidado de sempre estarem no longo eixo do dente. Os cortes seriados com 4 µm de espessura foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (H&E).

2.8 Calibração do Examinador

Antes da análise histométrica ser iniciada, o examinador foi treinado medindo duas vezes a porcentagem de tecido ósseo na região de furca (POF). As medidas obtidas foram estatisticamente analisadas para verificar o grau de concordância com nível de significância de 5% e adicionalmente o coeficiente de correlação de Pearson foi calculado entre ambas as medidas.

2.9 Análise Histológica

Os cortes corados pela técnica de H&E foram analisados para verificar as características histológicas do cimento, ligamento periodontal e osso alveolar dos primeiros molares inferiores.

2.10 Análise Histométrica

Para a determinação da POF foi utilizado um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany). Foi mensurada a área total da furca (AF) e em seguida a área ocupada por tecido ósseo (AO), ambas em mm². Posteriormente foi calculada a POF. A AF foi demarcada apicalmente por uma linha reta traçada a partir do ápice da raiz mesial em direção ao ápice da raiz distal. A partir desta linha seguiu-se todo o contorno da superfície externa do cimento situado entre as raízes. A AO teve o mesmo limite apical da AF e partir deste seguiu-se todo o contorno da superfície externa do tecido ósseo entre as raízes. A POF foi calculada multiplicando-se AO por 100 e dividindo-se por AF ($POF = (AO \times 100) / AF$) (Anexo E). A POF de cada espécime foi mensurada três vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados (Anexo E).

2.11 Análise Estatística dos Resultados

A análise estatística dos dados coletados foram testados pelo programa BioEstat 5.0 (Bioestat 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil). A análise da normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Shapiro Wilk ($p < 0,05$).

A hipótese de não haver diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na POF entre os diferentes grupos e períodos foi testada. A análise intragrupo e intergrupo para POF foi realizada pela análise de variância a dois critérios ANOVA. Quando o ANOVA detectou diferença estatística, as comparações múltiplas foram realizadas e complementadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Análise Histológica

No grupo ST aos 7 dias, um intenso infiltrado inflamatório composto por polimorfonucleares neutrófilos estava presente em todo o tecido conjuntivo da região de furca (Figura 1A, D). Todos os espécimes deste grupo apresentavam espículas de osso necrosado envoltas por células inflamatórias nesta região. O septo interradicular mostrou-se com um contorno bastante irregular e com trabéculas ósseas bastante delgadas (Figura 1G), em cuja superfície se observava grande quantidade de osteoclastos. Aos 15 e 30 dias a inflamação ainda era intensa, no entanto, comparativamente, houve uma redução no volume ocupado pelo infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e linfócitos (Figura 2A, D). O tecido conjuntivo nas imediações do septo interradicular mostrou-se menos inflamado (Figura 2D). O septo interradicular apresentou-se com trabéculas ósseas delgadas, de contorno externo bastante irregular e com osteoclastos ativos (Figura 2G). O cimento apresentou inúmeras áreas de reabsorção, especialmente aos 30 dias, as quais não mostraram sinais de reparação.

No grupo RAR, aos 7 dias pós-tratamento, uma grande quantidade de células inflamatórias, especialmente neutrófilos, ocupava o tecido conjuntivo na região da furca (Figura 1B, E). Nas imediações do septo interradicular foi observada uma margem de tecido conjuntivo bem menos inflamado, composto por uma grande quantidade de fibroblastos e vasos sanguíneos, entremeados em uma delicada rede de fibras colágenas (Figura 1E). O tecido ósseo do septo interradicular mostrava-se constituído por trabéculas ósseas de contorno externo irregular, em função da presença de muitas lacunas de reabsorção e osteoclastos ativos (Figura 1H). Poucos espécimes apresentaram espículas de osso necrosado. Aos 15 dias pós-tratamento as características histopatológicas mantiveram-se similares às descritas anteriormente, no entanto, houve uma redução do volume ocupado pelo infiltrado inflamatório. Aos 30 dias pós-tratamento, o infiltrado inflamatório apresentou uma redução ainda maior no volume ocupado por células inflamatórias (Figura 2B, E) que neste período, além de neutrófilos, era composto por grande quantidade de linfócitos e macrófagos. Uma ampla faixa de tecido conjuntivo desprovido de células inflamatórias estava situado nas adjacências do

osso do septo interradicular. Este tecido exibiu uma quantidade moderada de fibroblastos e fibras colágenas (Figura 2E). O tecido ósseo mostrava-se composto por trabéculas ósseas mais espessas e com contorno superficial mais regular (Figura 2H). O cimento apresentou áreas de reabsorção cuja maioria mostrava-se ativa aos 7 dias pós-tratamento e inativa aos 30 dias pós-tratamento, inclusive exibindo sinais de reparação neste período.

No grupo RAR + AS, aos 7 dias pós-tratamento, o infiltrado inflamatório na região de furca mostrou-se bastante discreto (Figura 1C, F), composto por poucos polimorfonucleares neutrófilos, que estavam sustentados em um tecido conjuntivo fibroso bem organizado (Figura 1F). Nenhum espécime deste grupo apresentou espículas de osso necrosado na região de furca. O septo interradicular mostrou-se com um contorno regular e raros foram os osteoclastos observados neste local (Figura 1I). Aos 15 e 30 dias pós-tratamento, as características histológicas mostraram-se muito similares. O tecido conjuntivo mostrou-se isento de inflamação na maioria dos espécimes (Figura 2C, F), com um reestabelecimento completo da estrutura do ligamento periodontal, com riqueza de fibroblastos, vasos sanguíneos e fibras colágenas, incluindo aquelas que se inseriam no cimento e no osso alveolar (Figura 2F). Aqueles em que a inflamação persistia, esta se mostrou muito discreta e restrita a pequenos focos isolados de neutrófilos e linfócitos. O septo interradicular apresentou-se com contorno externo bastante regular e raros eram osteoclastos observados. Suas trabéculas ósseas se mostravam espessas, repletas de osteócitos vitais, e recobertas por osteoblastos ou células de revestimento ósseo (Figura 2I). Áreas de reabsorção cementária ativa foram observadas na maioria dos espécimes aos 7 dias pós-tratamento. Aos 30 dias pós-tratamento a quase totalidade destas áreas de reabsorção de cimento estavam inativas e sofrendo processo de reparação.

3.2. Análise Histométrica

O poder do estudo foi calculado e demonstrou 80% de confiabilidade dos dados obtidos. Os dados histométricos estão demonstrados na Figura 3. Na análise intergrupo os animais do Grupo ST ($23,55 \pm 8,38$, aos 7 dias; $38,04 \pm 7,51$, aos 15 dias; $36,73 \pm 10,15$, aos 30 dias) apresentaram em todos os períodos experimentais menor POF

($p < 0,05$) quando comparado com os animais dos Grupos RAR ($52,55 \pm 5,09$, aos 7 dias; $56,72 \pm 7,12$, aos 15 dias; $53,35 \pm 1,05$, aos 30 dias) e RAR + AS ($62,94 \pm 8,11$, aos 7 dias; $67,94 \pm 4,82$, aos 15 dias; $71,75 \pm 5,38$, aos 30 dias). Os animais do Grupo RAR + AS apresentaram maior POF ($p < 0,05$) aos 7, 15 e 30 dias quando comparado com os animais do Grupo RAR nos respectivos períodos. Na análise intragrupo os animais do Grupo ST aos 7 dias, demonstraram menor POF ($p < 0,05$) quando comparados com o período de 15 dias. Nos animais do Grupo RAR + AS foi observado uma maior POF no decorrer dos períodos com diferença significativa ($p < 0,05$) quando se comparou o período de 7 dias com o período de 30 dias.

4. Discussão

A utilização de modelos animais em estudos na evolução, prevenção e tratamento da doença periodontal tem tido um aumento substancial nos últimos anos. O modelo de periodontite experimental em ratos utilizado no presente estudo tem sido extensivamente utilizado, sendo um modelo de alta reprodutibilidade para avaliação da evolução e tratamento da doença periodontal (Bezerra et al., 2000, Almeida et al., 2007, 2008, Dalcico et al., 2013; Garcia et al., 2013). Estudos em periodontite experimental têm demonstrado aumento na de células inflamatórias (Almeida et al., 2007), dos níveis das interleucinas IL-1 β /IL-1ra, IL-6/IL-10 (Meulman et al., 2011) e alterações no sistema RANK/RANKL/OPG (Garcia et al., 2011, Garcia et al., 2013) quando comparado com áreas sem periodontite experimental.

No presente estudo foi observado que a ausência do tratamento mecânico (RAR) da PE promoveu intensa reabsorção do osso alveolar e inflamação periodontal na região de furca, como demonstrado pela análise histomorfométrica em todos os períodos experimentais, em decorrência da manutenção dos agentes etiológicos primários da DP. A doença periodontal é caracterizada pela migração epitelial, destruição do tecido conjuntivo e osso alveolar (Cochran 2008) e o seu tratamento é baseado na redução do número de bactérias presentes em áreas subgingivais, assim, a ausência do tratamento mecânico contribuiu com a progressão e evolução da PE no presente estudo.

Foi demonstrado que o uso da terapia mecânica resulta em maior POF ($p < 0,05$) nos animais do grupo RAR como demonstrado pelos dados histométricos. Observou-se pela análise histológica neste grupo uma ampla faixa de tecido conjuntivo interposto entre o teto da furca e as adjacências do tecido ósseo, diminuição da inflamação periodontal no decorrer dos períodos com presença de neutrófilos, linfócitos e macrófagos na área.

O uso de terapias coadjuvantes ao tratamento periodontal tem por objetivo reduzir ou eliminar os microorganismos que contribuem com a iniciação ou progressão da doença periodontal. Agentes farmacológicos de uso sistêmico (Loesche et al., 1992; Lopez et al., 2000), bem como de uso tópico (Jeffcoat et al., 1998; Fernandes et al., 2010) são

utilizados com esta finalidade. Estudos recentes (Han et al, 2007; Lekic et al, 1997) têm abordado a utilização de substâncias que interferem na atividade dos osteoclastos, devido estas células serem conhecidas como as causadoras das destruições do osso alveolar durante a doença periodontal (Lekic et al., 1997). Neste contexto, os bifosfonatos são drogas que inibem a ação dos osteoclastos, sendo considerado um potente agente no controle da reabsorção óssea (Tanenbaum et a., 2002; Tani-Ishii et al., 2003). Estas drogas são utilizadas no tratamento de doenças metabólicas caracterizadas pela perda de tecido mineral (Tanenbaum et al., 2002; Fleisch 1987; McClung 1996; Van Beek et al., 1997).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito local da irrigação com AS como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico da PE. Os dados obtidos demonstraram que o uso do AS como terapia coadjuvante foram efetivos no tratamento da DP.

Muitos estudos têm sido realizados para avaliar o efeito do uso sistêmico dos bifosfonatos no osso alveolar afetado pela doença periodontal (Weinreb et al., 1994; Reddy et al., 1995; Rocha et al., 2001; Alencar et al., 2002; Tani-Ishii et al., 2003; Menezes et al., 2005; Lane et al., 2005; Goes et al., 2012). Weinreb et al, 1994, avaliaram a eficácia da administração sistêmica do alendronato de sódio em reduzir a perda óssea alveolar em macacos com PE. Foi demonstrado que altas doses de alendronato não foram efetivas no controle da perda óssea alveolar. Outros estudos (Tani-Ishii, et al., 2003; Menezes et al., 2005; Centinkaya et al., 2008; Goes et al., 2012) demonstraram que a aplicação subcutânea de AS em ratos portadores de PE foi efetiva na prevenção da resposta inflamatória e perda de osso alveolar. Cetinkaya et al., 2008 demonstraram que a administração sistêmica de resindronato em ratos na concentração de 0.5 mg/Kg/semana por 3 semanas, promoveu uma significativa inibição da perda óssea alveolar enquanto altas doses 5 mg/Kg/semana por 8 semanas não foram efetivas.

Por outro lado, pouco são os estudos (Mitsuta et al., 2002; Goya et al., 2006) que avaliam o efeito da administração local dos bifosfonatos na preservação da perda óssea. Goya et al., (2006) realizaram uma avaliação histomorfométrica da administração tópica de olpadronato (4 aplicações de 150mM) no tratamento da PE em ratos. Em contraste, ao presente estudo, os autores compararam o olpadronato tópico com o grupo controle

(NaCl 0,9%), mas em ambos os grupos não houve o tratamento mecânico (RAR) da PE. No presente estudo, as bolsas periodontais foram irrigadas com 1 ml de AS (10^{-5} M) após a RAR. Os resultados histomorfométricos demonstram uma significativa preservação e ganho de tecido ósseo na área de furca, com discreto processo inflamatório aos 7 dias e ausência aos 15 e 30 dias após tratamentos com áreas de cimento reabsorvidas sofrendo processo de reparo. Quando comparados ao grupo RAR em todos os períodos, observou-se no grupo RAR + AS maior POF, menor inflamação e maior organização tecidual.

Os resultados deste estudo experimental estão de acordo com estudos em humanos (Rocha et al., 2001; Lane et al., 2005; Veena & Prasad 2010 Sharma & Pradeep 2012a,b) nos quais demonstram que a aplicação tópica de AS combinada com o tratamento convencional da DP foi significativamente efetivo na prevenção da perda óssea alveolar e na melhora dos parâmetros clínicos e radiográficos, quando comparado com o grupo controle (Veena & Prasad 2010).

Estudos (Yaffe et al., 1997; Yaffe et al., 2000; Binderman et al., 2000; Kaynak et al., 2000) com diferentes metodologias, evidenciaram que a aplicação tópica do AS demonstrou redução na perda óssea após cirurgia com elevação de retalho de espessura total (mucoperiosteal). Os resultados do presente estudo, são similares aos encontrados por estes estudos, os quais demonstraram que os tecidos periodontais apresentavam características de normalidade, e sem sinais de inflamação periodontal.

O principal mecanismo de ação do AS é a inibição da função dos osteoclastos (Nakaya et al., 2000; Tenenbaum et al., 2002). Tem sido demonstrado também que o AS causa diminuição dos níveis de cálcio intracelular em células da linhagem clástica (Colucci et al., 1998). Estes achados são de grande interesse e podem sugerir a presença de receptores para os bifosfonatos nos osteoclastos (Tenenbaum et al., 2002). Outra possível ação é que os bifosfonatos não nitrogenados causam apoptose dos osteoclastos via caspase (Benford et al., 2001).

De acordo com a literatura, os resultados deste estudo também podem estar relacionados com a atividade antimicrobiana do AS (Hsu et al., 1995; Kruszewska et al., 2002), e propriedades antiinflamatórias (Matsuo et al., 2003; Monkkonen et al., 1998; Giuliani et

al., 1998). A ausência de perda óssea neste estudo pode ser justificada pela alta afinidade do bifosfonato pelo tecido ósseo e inibição da reabsorção óssea promovida pelos osteoclastos (Nakaya et al., 2000; Tenenbaum et al., 2002). Eles também agem diretamente sobre as enzimas do hospedeiro, como as metaloproteinases da matriz, liberadas pelos osteoclastos e outras células no periodonto (Nakaya et al., 2000). Outra possível explicação de nossos resultados pode ser pelo recrutamento de células indiferenciadas do ligamento periodontal como os osteoblastos e cementoblastos (Lekic et al., 1997).

Desta forma, os resultados do presente estudo reforçam o interesse do uso clínico do AS como nova possibilidade de tratamento coadjuvante ao tratamento da DP. O interesse e a necessidade de novas possibilidades de terapias coadjuvantes são importantes em áreas de difícil acesso como áreas de furca, depressões, concavidades e reentrâncias que comprometem o sucesso da terapia periodontal, além de podermos adotar terapias que possam modular a resposta celular do hospedeiro e substâncias anti-reabsorbitivas.

Por outro lado, o uso sistêmico de AS tem sido apresentado em muitos estudos (Bonnet et al, 2013; Khullar et al, 2012), principalmente sobre os efeitos adversos, como esofagites, úlceras gástricas e osteonecrose dos maxilares. Estes efeitos adversos são mais comuns em pacientes que recebem altas doses por longos períodos (Lo et al., 2010). No entanto, o uso de baixas doses não tem apresentado esta relação (Lo et al., 2010), principalmente quando utilizado de forma tópica.

Em muitos estudos, os bifosfonatos foram avaliados com relação aos seus efeitos inibitórios na reabsorção óssea. No entanto, as suas propriedades nas terapias regenerativas não foram avaliadas, sendo esta uma nova possibilidade de uso, visando formação de novo osso, ligamento periodontal e cimento. Desta forma, novas opções terapêuticas coadjuvantes podem ser consideradas para o tratamento da DP. Assim, dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que a aplicação tópica do AS otimizou os resultados no tratamento da PE com formação de novo osso alveolar e cimento. Entretanto, novos estudos devem ser conduzidos para elucidar não somente a ação do AS, mas também de diferentes concentrações da aplicação tópica e especialmente sua interação com os tecidos periodontais em humanos.

5. Conclusão

Dentro dos limites do presente estudo, podemos concluir que o AS utilizado como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico (RAR) da DP promoveu melhor reparo periodontal.

Referências:

1. ABE K, YOSHIMURA Y, DEYAMA Y, KIKUIRI T, HASEGAWA T, TEI K, SHINODA H, SUZUKI K, KITAGAWA Y. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* 2012;29:1007-1015.
2. ALENCAR VB, BEZERRA MM, LIMA V, et al. Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2002;73: 251-256.
3. ALMEIDA JM, THEODORO LH, BOSCO AF, NAGATA MJ, OSHIWA M, GARCIA VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2007;78:566-575.
4. ALMEIDA JM, THEODORO LH, BOSCO AF, NAGATA MJ, OSHIWA M, GARCIA VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol* 2008;79: 1081-1088.
5. ALMEIDA JM, THEODORO LH, BOSCO AF, NAGATA MJ, BONFANTE S, GARCIA VG. Treatment of Experimental Periodontal Disease by Photodynamic Therapy in Rats With Diabetes. *J Periodontol* 2008;79:2156-2165.
6. ANUJ SHARMA AND A.R. PRADEEP. Clinical Efficacy of 1% Alendronate Gel as a Local Drug Delivery System in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Randomized, Controlled Clinical Trial. *J Periodontol*. 2012; 83.
7. ASLUND M, PJETURSSON BE, LANG NP. Measuring oral health-related quality-of-life using OHQoL-GE in periodontal patients presenting at the University of Berne. *Oral Health & Preventive Dentistry* 2008;6: 91–197.
8. AXELSSON P, LINDHE J. Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol*. 1978;5:133-51.
9. AXELSSON P, LINDHE J. The significance of maintenance care in the treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1981 Aug;8:281-94.

10. BADERSTEN A, NILVEUS R, EGELBERG J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. II. Severely advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1984;11:63-76.
11. BARGMAN R, POSHAM R, BOSKEY AL, DICARLO E, RAGGIO C, PLESHKO N. Comparable outcomes in fracture reduction and bone properties with RANKL inhibition and alendronate treatment in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Osteoporos Int*. 2012;23:1141-1150.2.
12. BENFORD HL, MCGOWAN NW, HELFRICH MH, NUTTALL ME, ROGERS MJ. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone*. 2001;28:465-473.
13. BEZERRA MM, DE LIMA V, ALENCAR VB, VIEIRA IB, BRITO GA, RIBEIRO RA, ROCHA FA. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats *J Periodontol* 2000;71:1009-14.
14. BINDERMAN I, ADUT M, YAFFE A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. *J Periodonto*. 2000;71:1236-1240.
15. BONE HG, DOWNS RW JR., TUCCI JR, HARRIS ST, WEINSTEIN RS, LICATA AA, MCCLUNG MR, KIMMEL DB, GERTZ BJ, HALE E, POLVINO WJ. Dose-response relationships for alendronate treatment in osteoporotic elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:265–274.
16. BONNET N, LESCLOUS P, SAFFAR JL, FERRARI S. Zoledronate effects on systemic and jaw osteopenias in ovariectomized periostin-deficient mice. *PLoS One* 2013;8:e58726.
17. BRADASCHIA-CORREA V, MASSA LF, ARANA-CHAVEZ VE. Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in young growing rats. *Cell Tissue Res*. 2007;330:475-485.
18. BREIVIK T, GUNDERSEN Y, OSMUNDSSEN H, FONNUM F, OPSTAD P K. Neonatal dexamethasone and chronic tianeptine treatment inhibit ligature-induced periodontitis in adult rats. *J Periodontal Res* 2006; 41: 23–32.

19. BRUNSVOLD MA, CHAVES ES, KORNMANN KS, AUFDEMORTE TB, WOOD R. Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontol* 1992;63:825-830.
20. BUDUNELI, E., VARDAR-SENGÜL, S., BUDUNELI, N., ATILLA, G., WAHLGREN, J., SORSA, T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 gamma2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol* 2007;78:127-134.
21. CATON JG, CIANCIO SG, BLIEDEN TM, et al. Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;71:521-532.
22. CETINKAYA BO, KELES GC, AYAS B, GURGOR P. Effects of risendronate on alveolar bone loss and angiogenesis: a stereologic study in rats. *J Periodontol* 2008;79:1950-1961.
23. COBB CM. Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann Periodontol* 1996;1:443-90.
24. COCHRAN DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of Periodontol* 2008;79:1569-1576.
25. COLUCCI S, MINIELLI V, ZAMBONIN G, CIRULLI N, MORI G, SERRA M, PATELLA V, ZAMBONIN ZALLONE A, GRANO M. Alendronate reduces adhesion of human osteoclast-like cells to bone and bone protein-coated surfaces. *Calcif Tissue Int* 1998;63:230-235.
26. COXON FP, ROGERS MJ. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 2003;72:80-84.
27. DALCICO R, DE MENEZES AM, DEOCLECIANO OB, ORIÁ RB, VALE ML, RIBEIRO RA, BRITO GA. Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. *J Periodontol* 2013;84:1145-57.
28. DEAS DE, MACKAY SA, MCDONNELL HT. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontol* 2000 2003;32:82-104.

29. DUNFORD JE, THOMPSON K, COXON FP, LUCKMAN SP, HAHN FM, POULTER CD, EBETINO FH, ROGERS MJ. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296:235-242.
30. EBETINO FH, HOGAN AM, SUN S, TSOUMPRA MK, DUAN X, TRIFFITT JT, KWAASI AA, DUNFORD JE, BARNETT BL, OPPERMANN U ET AL. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone* 2011;49:20-33.
31. FERNANDES LA, MARTINS TM, ALMEIDA JM, NAGATA MJ, THEODORO LH, GARCIA VG, BOSCO AF. Experimental periodontal disease treatment by subgingival irrigation with tetracycline hydrochloride in rats. *J Appl Oral Sci.* 2010;18:635-640.
32. FLEISCH H. Experimental basis for the use of bisphosphonates in Paget's disease of bone. *Clin Orthop Res* 1987:72-8.
33. GARCIA VG, FERNANDES LA, DE ALMEIDA JM, BOSCO AF, NAGATA MJ, MARTINS TM, OKAMOTO T, THEODORO LH. Comparison between laser therapy and non-surgical therapy for periodontitis in rats treated with dexamethasone. *Lasers Med Sci.* 2010;25:197-206.
34. GARCIA VG, FERNANDES LA, MACARINI VC, DE ALMEIDA JM, MARTINS TM, BOSCO AF, NAGATA MJ, CIRELLI JA, THEODORO LH. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol* 2011;38:1106-14.
35. GARCIA VG, GUALBERTO JÚNIOR EC, FERNANDES LA, BOSCO AF, HITOMI NAGATA MJ, CASATTI CA, ERVOLINO E, THEODORO LH. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol* 2013;84:556-65.
36. GIULIANI N, PEDRAZZONI M, PASSERI G, GIRASOLE G. Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol* 1998; 27:38-41.
37. GOES P, MELO IM, DUTRA CS, LIMA AP, LIMA V. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Arch Oral Biol.* 2012;57:1537-44.

38. GOYA JA, PAEZ HA, MANDALUNIZ PM. Effect of topical administration of monosodium olpadronate on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2006;77:1-6.
39. GRAZIANI F, ROSINI S, CEI S, LA FERLA F, GABRIELE M. The effects of systemic alendronate with or without intraalveolar collagen sponges on postextractive bone resorption: a single masked randomized clinical trial. *J Craniofac Surg* 2008;19:1061-6.
40. HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 377-388.
41. HAN X, KAWAI T, TAUBMAN MA. Interference with immune-cell-mediated bone resorption in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007;45:76-94.
42. HSU MT, STURR G, CURRAN TM, MARQUIS RE. Inhibition of streptococcal growth, F-ATPase and pyrophosphatase by diphosphonates. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:47-53.
43. IIZUKA T, MILLER SC, MARKS SC JR. Alveolar bone remodeling after tooth extraction in normal and osteopetrotic (ia) rats. *J Oral Pathol Med* 1992;21:150-5.
44. IRIE K, TOMOFUJI T, TAMAKI N, SANBE T, EKUNI D, AZUMA T, MARUYAMA T, YAMAMOTO T. Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. *J Dent Res*. 2008;87:456-460.
45. JANSSON L. Association between alcohol consumption and dental health. *J clin Periodontol*. 35, 5, 379-84 2008.
46. JAVED F, AL-RASHEED A, ALMAS K, ROMANOS GE, AL-HEZAIMI K. Effect of cigarette smoking on the clinical outcomes of periodontal surgical procedures. *Am J Med Sci*. 2012;343:78-84.
47. JEFFCOAT MK, BRAY KS, CIANCIO SG, DENTINO AR, FINE DH, GORDON JM, GUNSOLLEY JC, KILLOY WJ, LOWENGUTH RA, MAGNUSSON NI, OFFENBACHER S, PALCANIS KG, PROSKIN HM, FINKELMAN RD, FLASHNER M. Adjunctive use of a subgingival controlled-release chlorhexidine chip reduces probing depth and improves attachment level compared with scaling and root planing alone. *J Periodontol*. 1998;69:989-997.

48. JOHNSON, J.H. Effects of local irritation and dextran and sulphat administration on the periodontium of the rat. *J Periodont Res* 1975;10:332-345.
49. KALDAHL WB, KALKWARF KL, PATIL KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol* 1993;64:243-53.
50. KAYNAK D, MEFFERT R, GUNHAN M, GUNHAN O, OZKAYA O. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol* 2000;71:790-796.
51. KHULLAR SM, TVEDT D, CHAPMAN K, HERLOFSON BB. Sixty cases of extreme osteonecrosis and osteomyelitis of the mandible and maxilla in a West African population. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41:978-85.
52. KIM JH, PARK1 Y-B, LI Z, SHIM J-S, MOON H-S, JUNG H-S , CHUNG M-K. Effect of alendronate on healing of extraction sockets and healing around implants. *Oral Diseases* 2011; 17: 705–711.
53. KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J. Periodontol* 1991;62:59-73.
54. KONGSTAD J, HVIDTFELDT UA, GRØNBAEK M, JONTELL M, STOLTZE K, HOLMSTRUP P. Amount and type of alcohol and periodontitis in the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Periodontol* 2008;35:1032-1039.
55. KRUSZEWSKA H, ZAREBA T, TYSKI S. Search of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs. *Acta Pol Pharm.* 2002;59:436-439.
56. LALLA E, LAMSTER IB, FEIT M, HUANG L, SCHMIDT AM. A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *J Periodontal Res* 1998;33:387-399.
57. LALLA E, PAPAPANOU PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol* 2011;28;7:738-748.
58. LANE N, ARMITAGE GC, LOOMER P, et al. Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo-controlled study. *J Periodontol* 2005;76:1113-1122.

59. LEKIC P, RUBBINO I, KRASNOSHTEIN F, CHEIFETZ S, MCCULLOCH CA, TENENBAUM H. Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. *Anat Rec.* 1997;247:329-340.
60. LISTGARTEN M.A. Similarity of relationships in the gingiva of rats and man. *J Periodontol* 1975;46:687-80.
61. LO JC, O'RYAN FS, GORDON NP, ET AL. Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:243-253.
62. LOESCHE WJ, GIORDANO JR, HUJOEL P, SCHWARCZ J, SMITH BA. Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *J Clin Periodontol* 1992;19:103-112.
63. LÓPEZ NJ, GAMONAL JA, MARTINEZ B. Repeated metronidazole and amoxicillin treatment of periodontitis. A follow-up study. *J Periodontol.* 2000;71:79-89.
64. LOVDAL A, ARNO A, SCHEI O, WAERHAUG J. Combined effect of subgingival scaling and controlled oral hygiene on the incidence of gingivitis. *Acta Odontol Scand.* 1961;19:537-555.
65. LUCKMAN SP, HUGHES DE, COXON FP, GRAHAM R, RUSSELL G, ROGERS MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998;13:581-589.
66. MATSUO A, SHUTO T, HIRATA G, ET AL. Antiinflammatory and chondroprotective effects of the aminobisphosphonate incadronate (YM175) in adjuvant induced arthritis. *J Rheumatol* 2003;30:1280-1290.
67. MCCLUNG MR. Current bone mineral density data on bisphosphonates in postmenopausal osteoporosis. *Bone* 1996;19:195-198.
68. MCGUIRE JR, MCQUADE MJ, ROSSMANN JA, et al. Cotinine in saliva and gingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. *J Periodontol* 1989;60:176-181.

69. MENEZES AM, ROCHA FA, CHAVES HV, CARVALHO CB, RIBEIRO RA, BRITO GA. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2005;76:1901-1909.
70. MEULMAN T, PERUZZO DC, STIPP RN, CONÇALVES PF, SALLUM EA, CASATI MZ, GONÇALVES RB, NOCITI FH JR. Impact of *Porphyromonas gingivalis* inoculation on ligature-induced alveolar bone loss. A pilot study in rats. *J Periodontol Res* 2011;46:629-36.
71. MITSUTA T, HORIUCHI H, SHINODA H. Effects of topical administration of clodronate on alveolar bone resorption in rats with experimental periodontitis. *J Periodontol* 2002;73:479-486.
72. MONKKONEN J, SIMILA J, ROGERS MJ. Effects of tiludronate and ibandronate on the secretion of proinflammatory cytokines and nitric oxide from macrophages in vitro. *Life Sci* 1998;62:95-102.
73. MONTALVETTI A, BAILEY BN, MARTIN MB, SEVERIN GW, OLDFIELD E, DOCAMPO R. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase *J Biol Chem* 2001;276:33930-33937.
74. MORRISON EC, RAMFJORD SP, HILL RW. Short-term effects of initial, nonsurgical periodontal treatment (hygienic phase). *J Clin Periodontol* 1980;7:199-211.
75. NAKAYA H, OSAWA G, IWASAKI N, COCHRAN DL, KAMOI K, OATES TW. Effects of bisphosphonate on matrix metalloproteinase enzymes in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 2000;71:1158-1166.
76. ORY S, BRAZIER H, PAWLAK G, BLANGY A. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *Eur J Cell Biol* 2008;87:469-477.
77. PAGE RC, OFFENBACHER S, SCHROEDER HE, SEYMOUR GJ, KORNMAN KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000 1997;14:216-248.
78. PRADEEP AR, SHARMA A, RAO NS, BAJAJ P. "Local Drug Delivery of Alendronate Gel for the Treatment of Chronic Periodontitis Subjects With Diabetes Mellitus : A Double Masked Controlled Clinical Trial" *J Periodontol*. 2012 Jan 20.

79. REDDY MS, WEATHERFORD TW , SMITH CA, WEST BD, JEFFCOAT MK, JACKS TM. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol* 1995;66:211-217.
80. RIVERA-HIDALGO F. Smoking and periodontal disease. A review of the literature. *J Periodontol* 1986;57:617- 624.
81. ROCHA M, NAVA LE, VAZQUEZ DE LA TORRE C, et al. Clinical and radiological improvement of periodontal disease in patients with type 2 diabetes mellitus treated with alendronate: a randomized, placebo-controlled trial. *J Periodontol* 2001;72:204-209.
82. ROGERS MJ, CROCKETT JC, COXON FP, MONKKONEN J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 2011;49:34-41.
83. RUSSELL RG, WATTS NB, EBETINO FH, ROGERS MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008:733-59.
84. RUSSELL RG. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics.* 2007;119:S150-162.
85. SCABBIA A, CHO KS, SIGURDSSON TJ, KIM CK, TROMBELLI L. Cigarette smoking negatively affects healing response following flap debridement surgery. *J Periodontol* 2001;72:43-49.
86. SHANBHAG S, DAHIYA M, CROUCHER R. The impact of periodontal therapy on oral health-related quality of life in adults: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2012 (in print).
87. SHARMA A, PRADEEP AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel in adjunct to mechanotherapy in the treatment of aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2012;83:19-26.
88. SHARMA A, PRADEEP AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2012;83:11-18.
89. SHIBATA T, KOMATSU K, SHIMADA A, SHIMODA S, OIDA S, KAWASAKI K, CHIBA M. Effects of alendronate on restoration of

- biomechanical properties of periodontium in replanted rat molars. *J Periodontal Res.* 2004;39:405-414.
90. SOUZA DM, RICARDO LH, KANTOSKI KZ. Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. *Rocha RF. Braz Oral Res* 2009;23:326-32.
91. SZABO G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol* 1999;34:830-841.
92. TANI-ISHII N, MINAMIDA G, SAITOH D, et al. Inhibitory effects of incadronate on the progression of rat experimental periodontitis by porphyromonas gingivalis infection *J Periodontol.* 2003;74:603-609.
93. TENENBAUM HC, SHELEMAY A, GIRARD B, ZOHAR R, FRITZ PC. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. *J Periodont.* 2002;73:813-822.
94. TOMOFUJI T, SANBE T, EKUNI D, AZUMA T, IRIE K, MARUYAMA T, TAMAKI N, YAMAMOTO T. Oxidative damage of rat liver induced by ligature-induced periodontitis and chronic ethanol consumption. *Arch Oral Biol* 2008;53:1113-1118.
95. VAN BEEK ER, LOWIK CW, PAPAPOULOS SE. Effect of alendronate treatment on the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in mice. *Bone* 1997; 20:335-340.
96. VEENA HR, PRASAD D. Evaluation of an aminobisphosphonate (alendronate) in the management of periodontal osseous defects. *J Indian Soc Periodontol.* 2010;14:40-45.
97. WANG Y, HUANG P, TANG PF, CHAN KM, LI G. Alendronate (ALN) combined with osteoprotegerin (OPG) significantly improves mechanical properties of long bone than the single use of ALN or OPG in the ovariectomized rats. *J Orthop Surg Res* 2011;13;6:34.
98. WEINREB M, QUARTUCCIO H, SEEDOR JG, AUFDEMORTE TB, BRUNSVOLD M, CHAVES E, KORNMAN KS, RODAN GA. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate

- on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. J Periodontal Res. 1994;29:35-40.
99. YAFFE A, FINE N, ALT I, BINDERMAN I. The effect of bisphosphonate on alveolar bone resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. J Periodontol. 1995;66:999-1003.
100. YAFFE A, IZTKOVICH M, EARON Y, ALT I, LILOV R, BINDERMAN I. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. J Periodontol 1997;68:884-889.
101. YAFFE A, BINDERMAN I, BREUER E, PINTO T, GOLOMB G. Disposition of alendronate following local delivery in a rat jaw. J Periodontol. 1999;70:893-895.
102. YAFFE A, GOLOMB G, BREUER E, BINDERMAN I. The effect of topical delivery of novel bisacylphosphonates in reducing alveolar bone loss in the rat model. J periodontol 2000;71:1607-1612.

Anexo A – Normas para Publicação segundo o Periódico – Journal of Periodontology.

(http://www.joponline.org/userimages/ContentEditor/1124388816475/Instructions_to_Authors.pdf)

Instructions to Authors

Updated January 2013

This update removes the Case Reports section, as the Journal is no longer accepting these papers. Authors are encouraged to submit Case Reports to Clinical Advances in Periodontics. Figure guidelines have been replaced with a more extensive guide. Please see the Journal of Periodontology Digital Art Guidelines for more information. Other revisions and important items are highlighted in boldface type.

Please see page 8 for requirements when submitting clinical trials to the *Journal of Periodontology*.

CONTENT

The *Journal of Periodontology* publishes articles relevant to the science and practice of periodontics and related areas. Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that text, figures, photographs, and tables have not appeared in any other publication, except as an abstract prepared and published in conjunction with a presentation by the author(s) at a scientific meeting, and that material has been submitted only to this journal.

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

Submissions to the *Journal of Periodontology* should be limited to one of the categories defined below. Specific information regarding length and format is provided for each category. Please also refer to the instructions provided under Manuscript Submission.

Abstract

All original articles should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- * **Background:** Describes the problem being addressed.
- * **Methods:** Describes how the study was performed.
- * **Results:** Describes the primary results.
- * **Conclusion(s):** Reports what authors have concluded from these results, and notes their clinical implications.

Introduction

The Introduction contains a concise review of the subject area and the rationale for the study. More detailed comparisons to previous work and conclusions of the study should appear in the Discussion section.

Materials and Methods

This section lists the methods used in the study in sufficient detail so that other investigators would be able to reproduce the research. When established methods are used, the author need only refer to previously published reports; however, the authors should provide brief descriptions of methods that are not well known or that have been modified. Identify all drugs and chemicals used, including both generic and, if necessary, proprietary names and doses. The populations for research involving humans should be clearly defined and enrollment dates provided.

Results

Results should be presented in a logical sequence

Anexo B - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “**Terapia coadjuvante com alendronato de sódio no tratamento da doença periodontal experimental em ratos**” sob responsabilidade do Pesquisador **JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA** e colaboração de Leticia Helena Theodoro, Valdir Gouveia Garcia e Luiz Henrique Ferreira dos Santos Bonfietti está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **01299-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research “**Adjuvant therapy with alendronate sodium for the treatment of experimental periodontal disease in rats**”, process number **01299-2012**, under responsibility of **JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA** and with collaboration of Leticia Helena Theodoro, Valdir Gouveia Garcia and Luiz Henrique Ferreira dos Santos Bonfietti agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Eryolino
CEUA Vice-Coordenador

Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – CEP 16015-050 – Vila Mendonça – Araçatuba - SP
Tel. (18) 3636-3234

Anexo C - Figura representativa dos frascos de anestésicos utilizados na fase experimental da pesquisa.



Frascos de Xilazina (6mg/Kg) e Quetamina (70 mg/Kg).

Anexo D - Figura representativa da indução da PE, do procedimento de RAR e irrigação com AS.



Fio de algodão (n° 24).

Fio mantido em posição sub-gengival.

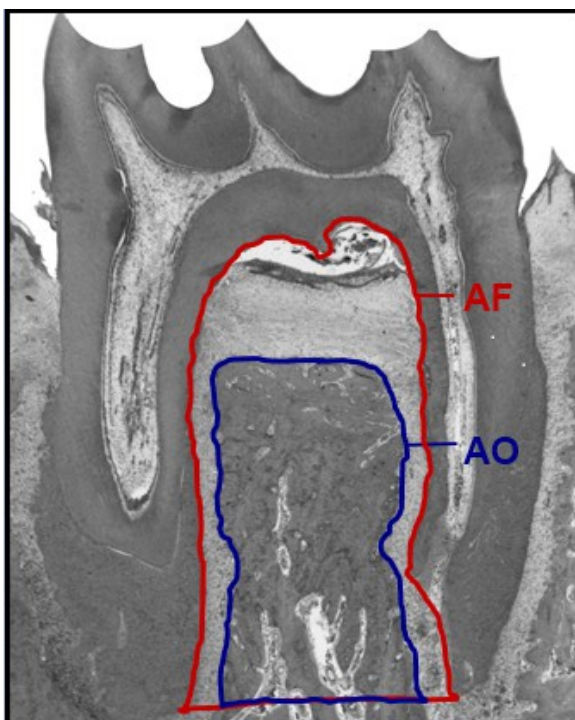
Procedimento de RAR com cureta manual "mini-five" 1-2.



Alendronato de Sódio na concentração de 10^5 M.

Irrigação do sulco gengival com AS 10^5 M.

Anexo E - Figura representativa da metodologia adotada para análise histométrica.



POF - Porcentagem de tecido ósseo na região de furca.
AF - Área total de furca.
AO - Área ocupada por tecido ósseo.

$$\text{POF} = (\text{AO} \times 100) / \text{AF}$$