

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**



NATHÁLIA JANUARIO DE ARAUJO

**PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS
TRATADOS COM DOSE ONCOLÓGICA DE
ZOLEDRONATO: ANÁLISE DA PROGRESSÃO DA
DOENÇA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA
PERIODONTAL AO TRATAMENTO MECÂNICO
CONVENCIONAL**

ARAÇATUBA -SP

2017

NATHÁLIA JANUARIO DE ARAUJO

Periodontite experimental em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato: análise da progressão da doença e avaliação da resposta periodontal ao tratamento mecânico convencional

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coorientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

ARAÇATUBA -SP

2017

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A663p

Araujo, Nathália Januario de.

Periodontite experimental em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato: análise da progressão da doença e avaliação da resposta periodontal ao tratamento mecânico convencional / Nathália Januario de Araujo. – Araçatuba, 2017.

100 f.: 4 il.; 2 tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Edilson Ervolino

Coorientador: Prof. Juliano Milanezi de Almeida

1. Osteonecrose 2. Bifosfonatos 3. Ratos wistar 4. Raspagem Subgengival I. T.

CDD 612

Dados Curriculares

Nathália Januario de Araujo

Nascimento: 27.04.1991. São Paulo - SP

Filiação: Maria Madalena Januario de Araujo

Roberto Claro de Araujo

2010- 2014: Curso de Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

- UNESP

2016-2016: Curso de atualização em Cirurgia Oral Menor

Núcleo de Educação Continuada – NEC – Araçatuba

Dedicatória

A Deus

Por me amparar em todos os momentos, me guiar em toda minha caminhada e me abençoar cada dia da minha vida...

A minha mãe

Por ser meu maior exemplo na vida, meu espelho, meu orgulho, o motivo para eu querer ser cada dia melhor, eu te amo mais que tudo minha mãe querida...

As minhas tias

Tia Bel e Tia Bela, eu percebo o quanto Deus é bom na minha vida, quando lembro que eu não tenho apenas

uma mãe, eu tenho três, obrigada por vocês me apoiarem em todos os momentos da minha vida, eu amo vocês...

Ao meu irmão

Samuca, você é a pessoa que Deus me deu para ser meu companheiro, amigo e protetor para o resto da vida, eu te amo irmão, e só quero o seu melhor sempre...

Ao meu irmão

Digo, obrigada por ser esse primo-irmão tão importante e especial na minha vida, desde pequena eu tenho você como um exemplo, te amo muito irmão de coração...

Ao meu amor

Lucas, obrigada por ser meu companheiro de todas as horas, obrigada por me apoiar e incentivar em tudo. Cada dia aumenta minha certeza e vontade de passar todos os dias da minha vida ao seu lado...

Ao meu avô (in memoriam)

Meu vozão querido, toda vez que eu penso em desistir é em você que eu penso para me dar forças para continuar, você me disse uma vez que era meu fã e onde você estiver eu dedico esta vitória à você. Saudades eterna...

Agradecimentos

Especiais

Aos meus professores...

*Ao meu orientador Prof. **Edilson Ervolino**, que desde o início me recebeu e acolheu como parte da querida “família zol”, obrigada por ter me ajudado em absolutamente todas as etapas do trabalho, pela sua dedicação e paciência comigo, pela sua disponibilidade, nunca se negou em me ajudar, mesmo nos finais de semana, férias e com ligações fora de horário, sempre empenhado em fazer o melhor para meu aprendizado. Sou imensamente grata por todo seu carinho e dedicação e por apesar de tantos compromissos, dedicar grande parte do seu tempo para me ensinar e ajudar. Obrigada por me ouvir todas as vezes que eu precisei de um “ombro amigo”, obrigada pelos conselhos e pela sua alegria contagiante. O senhor tem um coração de ouro e eu tive a honra de ser orientada por um professor tão incrível quanto você, seus ensinamentos vão ficar marcados para sempre no meu coração, querido mestre. Um grande exemplo de professor, orientador e amigo.*

*Ao meu orientador Prof. **Juliano Milanezi de Almeida**, agradeço por ter me recebido e acolhido como orientada desde o terceiro ano da graduação, onde com seu exemplo de professor e dedicação ímpar me*

fizeram escolher seguir o caminho do mestrado. Talvez tudo que eu escreva ou diga ao senhor nunca vão demonstrar toda minha gratidão e todo meu carinho por tudo que já fez e ainda faz por mim, se cheguei até aqui foi porque me deu oportunidades e incentivo para trilhar o meu caminho. Agradeço pelas clínicas de perio, onde compartilha seu conhecimento, com todo carinho e paciência que nos fazem te admirar cada dia mais. Obrigada por toda semana deixar sua família e viajar tantos quilômetros para estar aqui com um sorriso no rosto, disposto a fazer de tudo pelo bem dos seus alunos. Muito obrigada por acreditar em mim e me ajudar a realizar este sonho. Minha eterna gratidão, admiração e respeito por você professor.

*Ao meu professor e grande amigo Prof. **Idelmo Rangel Garcia Junior**, fazer seu agradecimento me fez lembrar toda nossa história, e toda minha trajetória desde a graduação. Algumas vezes, Deus nos tira algo para nos dar algo muito melhor, que nunca poderíamos imaginar e perder uma bolsa de auxílio fez nossos caminhos se cruzarem, desde então inúmeras “portas” se abriram na minha vida, sua ajuda me permitiu terminar minha graduação, começar minha pós graduação, me fez crescer profissionalmente e ter condições de conquistar tudo que eu nem imaginava um dia poder conseguir, mas o mais importante, me fez ter perto de mim uma pessoa*

incrível, um ser humano com o coração mais puro que eu conheço, toda vez que um paciente vem conversar comigo e diz que o senhor mudou a vida deles, meu coração se enche de alegria, porque o senhor também mudou a minha vida, e a de muitas pessoas, peço a Deus que conserve esse coração generoso e bondoso, e que te faça cada dia mais feliz e realizado. Obrigada por ser o pai que eu não tive, o amigo das horas mais difíceis e estar ao meu lado nos momentos de vitórias e alegrias.

*À minha Professora **Maria José Hitomi Nagata**, existem pessoas que nos inspiram, e a senhora com toda certeza é uma delas. Quando entrei na pós graduação, tive o prazer de conhecer melhor aquela professora extremamente competente, inteligente, e que se mostrou uma grande amiga no decorrer do meu curso, conheceu minha história e com grande humildade me contou toda sua trajetória, onde me fez ter muita garra pra continuar no caminho da pós graduação, sofreu comigo a decepção de não conseguir a bolsa no primeiro ano e vibrou comigo a vitória de consegui-la no segundo ano. Quando algo queria me desanimar suas palavras me ajudavam a seguir em frente. Obrigada por todo carinho, por acreditar no meu potencial quando até eu mesma não acreditava. A senhora estará para sempre no meu coração.*

*Ao meu professor e amigo Prof. **Wilson Roberto Poi**, o senhor foi o primeiro professor que tive contato na faculdade, no primeiro dia de aula, me deu um abraço e me desejou boa sorte, quem poderia imaginar que enfrentaríamos juntos tantas batalhas, e em todas elas o senhor agindo além das funções de um professor e na época, vice-diretor, não mediu esforços para me ajudar a continuar realizando meu sonho. E meu presente veio no final, no dia da colação, onde não poderia ser outra pessoa a me entregar o diploma, me abraçar e dizer: “Nós conseguimos, você conseguiu”, consegui sim, com sua ajuda e dedicação. São tantas histórias que passaria o dia te agradecendo e não conseguiria terminar. Peço a Deus que lhe dê muita saúde, paz e felicidade porque o senhor merece tudo de melhor nesta vida.*

*Ao meu professor **Álvaro Francisco Bosco**, dentre as inúmeras dificuldades que enfrentei durante a graduação, o começo do meu terceiro ano foi o momento mais difícil, onde cheguei a parar de frequentar os laboratórios, por dificuldades financeiras e o professor Álvaro, com sua humildade, empatia e sensibilidade, percebeu a minha ausência e perguntou a uma amiga o motivo e então pediu para que eu viesse, me emprestou seu próprio material para eu continuar os laboratórios e pediu a*

empresa Golgran toda lista de material para que eu pudesse continuar, já ouvia falar desse seu jeito e do seu coração bondoso, mas vivenciar isso é uma honra e um prazer imenso, pessoas como o senhor nos fazem acreditar que o mundo pode ser melhor e meu mundo foi melhor depois do senhor, desde então me apaixonei pela periodontia, e hoje estou aqui terminando meu mestrado nesta área. Obrigada por nos ensinar periodontia. Obrigada também por deixar meu sorriso mais bonito, por duas vezes. Obrigada por tudo querido e amado professor Álvaro.

*A minha grande amiga e professora **Paula Lazilha Faleiros**, nossa Paulinha, que honra ter você na minha vida, você me acolheu e me mostrou tantas coisas boas, tantos conselhos bons que eu levo para sempre comigo, quantas vezes desabafei meus problemas com você e com toda doçura me ouviu, aconselhou e me ajudou, obrigada por todas as risadas e momentos de alegria. Agradeço por se disponibilizar em todas etapas do meu trabalho. Eu sei que sempre posso contar com você, minha querida amiga, e saiba que também estarei aqui para o que precisar.*

*A professora **Leticia Helena Theodoro**, por toda dedicação, por todos ensinamentos, tanto na graduação quanto no mestrado, minha primeira*

aula de laboratório na periodontia, fui orientada pela senhora, que com muita paciência e carinho me ensinou todos os passos, os instrumentais, e me fez começar a gostar desta disciplina maravilhosa, a periodontia, admiro sua determinação, inteligência e competência. Obrigada por tudo professora.

*Ao professor **Valdir Garcia**, tenho muito carinho e uma lembrança muito boa do senhor, meu primeiro SBPqO, em Águas de Lindóia, primeira vez que viaja para um congresso, e ainda sozinha, estava muito nervosa para apresentar o trabalho e de repente o senhor foi até meu painel me deu um abraço, disse que iria ficar tudo bem e que apresentaria muito bem o trabalho, deu certo, apresentei mais tranquila e se já o admirava, naquele dia eu me encantei com sua bondade e generosidade, Um professor de corpo e alma. Muito obrigada, professor.*

*Ao meu grande amigo e professor **Leonardo Perez Faverani**, desde quando o conheci já senti que era alguém muito especial, com toda sua bondade e generosidade, com o passar do tempo tive o prazer de te conhecer melhor e apenas confirmar tudo que já senti desde o primeiro dia, seu coração bondoso, seu jeito carinhoso de tratar todos ao seu redor, te*

fazem uma pesosa tão querida e especial que enche de orgulho todos ao seu redor. Obrigada por sempre me estender a mão quando precisei, de sempre estar disposto a me ajudar, nunca vou esquecer cada gesto de amizade e generosidade deste meu grande amigo, eu te admiro cada dia mais e tenho a honra de poder te chamar de amigo e irmão.

*À Professora **Roberta Okamoto**, minha querida professora, um dia eu estava na moradia e chegaram umas alunas comentando da nova professora de Anatomia que era uma excelente professora e muito boazinha, fiquei curiosa para conhecer essa professora e não só tive o prazer de conhece-la como de compartilhar muitas horas de boas conversas, risadas e desabafos, então minha admiração só aumentou, aquela mulher elegante, não é só linda por fora é linda por dentro, coração de ouro, que encanta e ilumina cada pessoa ao seu redor.*

*Ao Professor **Francisley Ávila**, turma 56, turma professor Francisley Ávila, bom, não é à toa que minha turma o nomeou 'nome de turma', pois com seu jeito único, nos fez te admirar cada dia mais, desde a primeira aula teórica até as últimas clínicas de cirurgia, como eu tenho muita sorte de encontrar e conviver com pessoas maravilhosas, eu tive a honra de*

encontrar o senhor novamente no mestrado e poder desfrutar de boas conversas e muitas risadas, com seu jeito de tornar tudo mais divertido. Obrigada por toda ajuda nos cursos de especialização, obrigada por sempre estar disposto a me ajudar com trabalhos para os congressos, mesmo eu não entregando os certificados depois, mas fica aqui a promessa de entregar todos. Brincadeiras à parte, eu sou muito grata ao senhor. Meu muito obrigada por tudo.

*Ao professor **Roberto Botacin**, primeira festa da faculdade que fui, festa a fantasia, tinha um professor de conde drácula, pedi para tirar uma foto com ele e achei o máximo um professor ali no nosso meio, na nossa festa e então nas aulas de anatomia fui conhecendo melhor o senhor e minha admiração só aumentou, excelente professor e ainda uma pessoa extremamente divertida, acabou o ano, a graduação e então no mestrado tive o prazer de conviver bons momentos com meu querido professor Botacin. Obrigada por todo carinho que tem por mim, por torcer pelo meu sucesso, por estar presente em momentos tão importantes para mim, e pela companhia agradável nos almoços na Dora. Eu te admiro muito professor.*

Agradecimentos especiais

Aos meus professores: Prof. José Vitor, Prof. Dinho, Prof. Claudio Maçon, Prof. Roelf, Prof. Américo, Prof. Claudio Casatti, Prof. Adriana, Prof. Ana Paula, prof. Chicão, prof. Renato, por serem exemplos de professores, onde eu me inspiro e também agradeço por todo carinho e dedicação. Contribuíram imensamente para minha formação. Muito obrigada por tudo queridos e amados professores.

Aos meus queridos amigos...

*Ao meu amigo **Luan Toro**, Lulis, Luh, Luanzito, o que seria de mim sem sua ajuda? Bom, provavelmente não estaria escrevendo os agradecimentos da dissertação, pois não estaria nesta etapa, você com sua humildade, me acolheu, me fez sentir parte da “família Zol” desde o primeiro dia, fez questão de me ensinar, ajudar em todas as etapas, mesmo sendo nosso orgulho e “vice Rei”, nunca deixou de ter humildade para passar seu conhecimento da melhor forma possível, obrigada por tudo, por todas as vezes que me ajudou com as apresentações dos congressos, no EGQ, na histometria, na dissertação enfim em tudo. Obrigada por permitir que participasse de momentos tão importantes da sua vida como sua formatura, me marcou muito seu carinho comigo, e foi uma honra partilhar esta grande vitória ao seu lado, e por isso que nos meus momentos de vitórias também quero você ao meu lado. Agradeço principalmente por ser esse amigo maravilhoso, que me escuta, aconselha, puxa orelha, porque quer o meu melhor, assim como eu quero sempre o seu melhor e cada dia ver os frutos do seu sucesso.*

*Ao meu amigo **David Gusman**, Dede, no dia que sai da prova de seleção e conversamos, já percebi que era diferenciado, muito inteligente, muito paciente, e quando passamos na prova e tivemos a oportunidade de trabalharmos juntos, pude perceber a jóia rara que estava ao meu lado, quantos domingos, feriados até véspera de Natal, estava lá, eu e você, trabalhando juntos, e não importava se era o meu ou o seu trabalho, nós só queríamos ajudar um ao outro e permaneceu assim, mesmo quando eu fui para a família Zol, não teve uma etapa que não me ajudou, não tenho palavras para agradecer seu carinho comigo, desde o início nas aplicações dos meus animais estava lá, e até quando percebeu meu desespero que não estava conseguindo cortar as peças no micrótomo, sentou vários dias e noites comigo com toda sua paciência e me ensinou, e muitas outras ajudas que em palavras não consigo descrever meu sentimento de gratidão por você meu querido amigo, de todas coisas boas que o mestrado nos proporciona a melhor parte que eu levo é a amizade de pessoas maravilhosas como você, de coração puro, sincero e verdadeiro. Sei que seu sucesso é certo, e eu estarei te aplaudindo. Que nossa amizade continue por toda a vida. Meu irmão pretinho de coração.*

*Ao meu amigo **João Martins**, Migo, quem diria que depois de sermos vizinhos por 2 anos, somente no mestrado iria conhecer o verdadeiro João, que não se tornou apenas um amigo de pós graduação, se tornou um irmão, a pessoa que nos momentos bons e ruins esteve comigo lado a lado, que se preocupa comigo assim como eu me preocupo com você, que torce pelo meu sucesso assim como eu vibro com cada vitória sua, e irmão que não briga não é irmão, eu sei que todas as vezes que chamou minha atenção foi para o meu bem. Miguinho, eu sou muito abençoada por ter você na minha vida, essa pessoa maravilhosa, divertida e com seu carisma conquista todos ao seu redor, cada gesto de amizade seu fica guardado no meu coração, desde minha festinha surpresa no meu aniversário, até pedir marmitta para sua amiga que come pouquinho, quero que saiba que estou aqui para o que precisar, mesmo que eu vá ver a mensagem depois das 8 da noite, eu nunca vou medir esforços para te ver bem, e estarei aplaudindo de pé todas as suas vitórias.*

*A minha amiga **Daniela de Sá**, Danizinha, obrigada por ser minha parceira nesta caminhada, sem sua ajuda, tudo seria mais difícil, obrigada por sempre estar disposta a me ajudar, quantas lâminas, quantos bloquinhos, quanto trabalho e você se disponibilizou a me ajudar em tudo,*

obrigada por ser esta amiga tão especial, que torce por mim, vibra com minhas vitórias, esteve presente em tantos momentos bons comigo, lado a lado, e nos momentos difíceis estava ali me ouvindo, aconselhando e orando para que tudo se ajeitasse, eu sei que sempre posso contar com você assim como você sempre pode contar comigo, pra tudo. Você é muito importante e especial para mim.

*A minha amiga **Sabrina Ferreira**, Sassa, quando eu te conheci, já senti que era uma pessoa muito querida e especial, depois com a convivência apenas confirmei minhas suspeitas Você foi um presente de Deus na minha vida, que me ajudou e ajuda no meu desafio de assumir a responsabilidade de cursos tão importantes, onde entrei tão despreparada e com toda sua paciência e dedicação foi me ensinando, orientando e hoje sei que devo muito a você. Quando precisei de trabalhos, não se importou de sentar horas comigo, procurando os casos, sempre com toda doçura e delicadeza que me fazem ter tanta admiração por você. Já te falei que tenho você como um espelho, e estarei sempre torcendo para seu sucesso, pois com sua trajetória brilhante, o fruto da sua dedicação é o sucesso tanto como profissional como pessoal.*

À família ZOL, meus queridos: Luan, João, Daniela, Letícia, Fernanda, Thamires, Luy, Tiago e Cristian, gostaria que soubessem que sem o apoio e ajuda de todos vocês a realização desse trabalho não seria possível, obrigada por estarem comigo, nas eutanásias, nas imunos, vocês são realmente uma família para mim. Obrigada por todo apoio.

Aos meus amigos da pós-graduação:

***Fred**, obrigada por sua alegria contagiante, seu jeito único de deixar tudo mais alegre e divertido, você torna nossos dias mais leves, eu tenho muito admiração por você, meu querido amigo,*

***Vivian**, obrigada por toda ajuda no meu TCC que foi fundamental para eu começar a me interessar pela pós graduação e hoje, terminando mais um ciclo, posso dizer que tudo valeu a pena. Obrigada pela amizade, pelo carinho, pelos conselhos e “puxões de orelha” que me fizeram crescer cada vez mais.*

***Henrique**, obrigada por sempre estar disponível quando precisei de ajuda e por toda amizade nestes anos de convívio. Agradeço os momentos de boas conversas e descontração que deixam nossos dias na periodontia muito mais divertidos.*

Breno, obrigada por toda amizade e carinho neste tempo de convívio, espero que todos nos possamos contribuir para que sua escolha por Araçatuba tenha valido a pena.

Nati Campos, obrigada por desde a graduação me ajudar com caronas para a faculdade, bons conselhos e boas conversas e agora no mestrado ter se tornado uma grande amiga, muito querida que admiro cada dia mais.

Carol, nunca vou esquecer que com sua ajuda, realizei meu sonho de fazer a cirurgia com o Prof. Álvaro, e desde então não sai mais da periodontia, você é uma amiga muita querida e especial que levo no meu coração.

Marta, Marina, Marcinho, Daniela, queridos orientados da Prof. Letícia, obrigada pela amizade e carinho, cada um do seu jeito e todos muito queridos e especiais para mim

*Aos queridos amigos **Giovani e Clara**, obrigada pela parceria, por toda ajuda, cada um da sua forma me ajudou muito, nas intermináveis eutanásias e nos momentos de boas conversas e descontração que tornaram esta jornada muito mais leve e agradável. Meu muito obrigada a vocês queridos amigos.*

*Às minhas amigas do coração, **Priscila, Adriele, Flavinha, Luisa, Tamires, Bárbara, Amanda, Camila, Paulinha, Denise, Marcela, Dani,***

Aniele, por mesmo com minha ausência em tantos aniversários, confraternizações, encontros, não deixaram de me apoiar e incentivar, entenderam minha escolha e me ajudaram cada uma com seu jeito, mas todas muito importantes e especiais na minha vida.

*Às minhas amigas **Michelle e Fran**, obrigada por me acolherem e me fazerem sentir tão especial, desde quando cheguei pela primeira vez no consultório IRG, a Mih já me recebeu com sua alegria contagiante, fazendo brincadeiras de tudo, o mundo podia estar desabando, mas eu sabia que tinha você ali para desafabar meus problemas, e o principal, me aconselhar, orar por mim, não tenho palavras para expressar toda minha gratidão e carinho por você Mih. Fran, você com seu jeitinho único me ajudou em tudo, com toda paciência me ensinou tantas coisas, me aconselhou, quando você chega no curso, parece que trás toda paz e luz, tudo fica mais fácil, mais tranquilo. Você é uma pessoa iluminada que Deus colocou no meu caminho. Obrigada por tudo, meninas, vocês moram no meu coração.*

*Às minhas amigas do NEC, **Marina, Juliani, Cris, Aline, Gabi, Flavinha, Fernandinha, Katia, Dora, Lu, Bê, Camila**, meus amores, minha caminhada não seria a mesma sem a amizade e ajuda de todas vocês, cada*

uma de um jeito, mas todas muito queridas e especiais na minha vida, quando os dias estavam difíceis e parecia que não ia conseguir, cada uma de vocês tinha uma palavra amiga, um conselho, uma oração, que me ajudavam a continuar com mais força e garra. Obrigada por tudo, lindas “guerreiras do Nec”.

*Às minhas queridas amigas e companheiras **Claudia e Rose**, obrigada por me acolherem de forma tão carinhosa, obrigada pela humildade em passar o conhecimento de como agir com nossos “anjos”, obrigada pela amizade e companheirismo, pelos conselhos, eu admiro muito vocês, mulheres guerreras, batalhadoras, mães exemplares, tenho muita sorte por ter vocês na minha vida, presente de Deus. Obrigada por tudo, meus amores.*

A minha família...

*Aos meus sogros **Eva e Junior Munhoz**, obrigada por me acolherem como uma filha, por sempre me apoiarem em tudo, obrigada por torcerem pelo meu sucesso e por estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida. Obrigada pelos conselhos, eu me sinto realizada por poder fazer parte desta família tão querida e especial, amo vocês.*

*Aos meus primos **Maira, José Nilson, kauê e kainã**. As minhas primas **Elem, Joici**, e suas princesinhas **Julia e Nicole**, tia **Iraci**. Aos meus tios **Sebastião e Esli**, minha prima **Elisana** e **Marquinhos**, obrigada por todo incentivo e motivação que sempre me deram, obrigada pelo apoio e por torcerem por mim, vocês são muito importantes na minha vida.*

*Meu cunhado **Matheus Munhoz**, Cunha, obrigada por me receber como parte da família, desde o primeiro dia que conheci vocês, obrigada pelas boas conversas, pelos momentos divertidos e por estar presente em momentos tão importantes para mim, como na minha formatura, sempre torcendo pelas minhas vitórias.*

*À minha cunhada **Michelli Menezes**, Mih, obrigada por todo carinho que sempre teve comigo e por sempre me apoiar em tudo, obrigada por estar presente nos momentos de alegria e nos momentos difíceis, nunca vou*

Agradecimentos especiais

esquecer todo apoio que me deu nos congressos, torcendo por mim, incentivando, eu te considero uma irmã de coração. Obrigada por tudo.

À Família do meu namorado, vó Geni, Vô Toninho, vó Maria, Tia Claudia, Lúcia, Paulo, Larissa, toda família de Brotas: Ângela, Beto, Fernando, Simone, Carol, Marcelo, Ariana, Valen e Catarina, Heloisa, Thiago, Ercília, Saito, Vanessa, obrigada por me receberem na família, por todo carinho que sempre tiveram comigo, eu tenho muito carinho por cada um de vocês.

A toda minha família que sempre me apoiou em todos os momentos, torceu pelas minhas vitórias, meu muito obrigada!!!

Agradecimientos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

*Ao departamento de **Cirurgia e Clínica Integrada, Ciências Básicas**, e a disciplina de **Periodontia** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP.*

*Ao professor **André Briso**, coordenador do programa de pós-graduação em odontologia e a professora **Maria José** ex coordenadora do programa, por toda dedicação em fazer o melhor por nosso programa.*

*À **Valéria, Cristiane e Lilian** da seção de pós-graduação, por todo carinho e paciência, obrigada por sempre que precisei, vocês estarem dispostas a me ajudar, sempre um um sorriso no rosto e alegria.*

*Aos amigos e colaboradores **Dada, Renato, Paulão, Marquinhos e Jolison**, por sempre nos ajudar, por toda alegria, disposição com todos nos, vocês tornam nossos dias na faculdade mais alegres e divertidos.*

*Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Ana Cláudia, Cláudio, Luzia, Denise, Luís Claudio, Ana Paula, Maria Cláudia**, agradeço toda atenção e carinho que sempre me receberam.*

*Ao **Arnaldo**, pelo cuidado com meus animais, nunca vou esquecer o carinho que teve comigo, o cuidado com meus animais, a disposição e o amor com seu trabalho, você é muito querido para todos nós.*

*Aos Funcionários do Biotério, **Camilo, Arnaldo e João**, agradeço pela disponibilidade e pela contribuição na parte experimental deste trabalho.*

*Ao **Marcio**, por nos receber na faculdade com sua alegria, que já deixa nosso dia mais feliz, obrigada por se tornar um verdadeiro amigo, obrigada pelas horas de conversas, pelos conselhos e obrigada por torcer por mim.*

*A todos os **porteiros** da faculdade de Odontologia de Araçatuba, por todo carinho e alegria que nos recebe, todos os dias.*

*Aos meus amigos do curso de especialização de implante, que tive o prazer de conviver, em especial a minha amiga **Ana “Diva”, Alcides, Paulinha, Juliana** que se tornaram grandes amigos no decorrer dessa jornada. Obrigada por todo carinho de vocês, meus queridos amigos.*

*Aos meus amigos do Hospital “**Ritinha Prates:**” **Cida, José Américo, Bê, Liliane, Dani, Marcela, Rafa, César, Janaína, Valéria, Carla** e aos nossos anjos por tornarem meus dias mais felizes desde quando comecei meu voluntariado neste hospital. Vocês moram no meu coração.*

Agradecimentos

*Aos **pacientes atendidos**, obrigada pela confiança depositada em nossas mãos, com a ajuda dos nossos professores, sempre iremos fazer o melhor por todos nossos pacientes.*

*Aos **animais da pesquisa**, meu eterno respeito por todos os animais das nossas pesquisas.*

*À todos os **professores, técnicos, assistentes e amigos** que influenciaram de maneira direta na minha trajetória e contribuíram de forma imensurável para minha informação.*

Muito Obrigada!

Epígrafe

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

Resumo

Araujo, NJ. **Periodontite experimental em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato: análise da progressão da doença e avaliação da resposta periodontal ao tratamento mecânico convencional.** 2017. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a progressão da periodontite experimental (PE) e a resposta tecidual periodontal frente à raspagem e alisamento radicular (RAR) durante tratamento com dose oncológica de zoledronato. Foram utilizados 100 ratos (6 meses de idade) distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: SAL (n=30), ZOL (n=30), SAL-RAR (n=20) e ZOL-RAR (n=20). O plano de tratamento medicamentoso teve duração de 8 semanas. Os ratos receberam injeções intraperitoneais de 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (Grupos SAL e SAL-RAR) ou 0,45 ml da mesma solução acrescida de 100 µg/Kg de zoledronato (ZOL e ZOL-RAR) com um intervalo de três dias entre as aplicações. Decorridas duas semanas de tratamento medicamentoso, foi instalada uma ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. Nos grupos SAL e ZOL essa ligadura permaneceu até o final do experimento. Nos grupos SAL-RAR e ZOL-RAR após outras duas semanas a ligadura foi removida, e foi efetuada a RAR. A eutanásia foi efetuada nos grupos SAL e ZOL aos 14, 21 e 42 dias pós instalação da ligadura e nos grupos SAL-RAR e ZOL-RAR aos 7 e 28 dias pós tratamento local com RAR. Foi executado o processamento histológico das hemi-mandíbulas e os cortes histológicos foram submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina (HE). Na região de furca do primeiro molar inferior foram efetuadas: análise histopatológica dos tecidos peridontais e análise histométrica da porcentagem de osso na região de furca (POF) e da porcentagem de osso necrótico na região de furca (PON). Os resultados foram submetidos a análise estatística. O grupo ZOL apresentou uma resposta inflamatória local mais exacerbada, maior POF e maior PON aos 14d, 21d e 42 pós instalação da ligadura em relação ao grupo SAL. Em ZOL-RAR a resposta inflamatória se mostrou mais exacerbada, não houve alteração da POF, e a PON se mostrou maior ao longo do tempo e em relação ao grupo que não recebeu tratamento periodontal. Conclui-se

que o tratamento com dose oncológica de zoledronato reduz a perda óssea alveolar induzida pela PE, todavia, aumenta a quantidade de tecido ósseo alveolar necrótico, exacerba e prolonga a resposta inflamatória local, tanto nos sítios sem tratamento periodontal quanto nos sítios submetidos à RAR, ou seja, a doença periodontal e o tratamento mecânico periodontal convencional são importantes fatores de risco local para a ONM-M.

Palavras chave: Osteonecrose, Bifosfonatos, Ratos wistar, Raspagem Subgengival

Abstract

Araujo, NJ. **Experimental periodontitis in rats treated with oncological dose of zoledronate: analysis of disease progression and assessment of periodontal response to conventional mechanical treatment.** 2017. 101p Essay (Master's Degree) – São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

The present study aims to assess the progression of experimental periodontitis (EP) and the periodontal tissue response to scaling and root planing (SRP) during treatment with oncological dose of zoledronate. A total of 100 rats were used (6 months old) randomly distributed into 4 experimental groups: SAL (n=30), ZOL (n=30), SAL-SRP (n=20) e ZOL-SRP (n=20). Drug treatment plan lasted for 8 weeks. Intraperitoneal injections of 0,45 ml of sodium chloride solution 0,9% (Groups SAL and SAL-SRP) or 0,45 ml of the same solution adding 100 µg/Kg of zoledronate (ZOL and ZOL-SRP) were given to the rats within intervals of three days between injections. A cotton ligature was installed around the first left lower molar after two weeks of medicative treatment. At SAL and ZOL groups such ligature endured until the end of the experiment. At the groups SAL-SRP and ZOL-SRP ligature was removed two more weeks later and SRP was executed. Euthanasia was done at the groups SAL and ZOL after 14, 21 and 42 days from the ligature installation and at the groups SAL-SRP and ZOL-SRP after 7 and 28 days after local treatment with SRP. Hemimandibula was histological processing and executed and histological sections went under Hematoxylin and eosin staining (HE). At the furcal region of the first lower molar were executed: histopathological analysis of periodontal tissues and histometric analysis of bone percentage at the furcal region (BPF) and necrotic bone percentage at the furcal region (NPF). Results went under statistical analysis. ZOL group presented increased local inflammatory response, higher BPF and higher NPF at days 14, 21 and 42 after ligature installation in relation to SAL group. At ZOL-SRP, inflammatory response was increased, there was no BPF alteration, and NPF was higher throughout time in comparison to the group that had not received periodontal treatment. It can be concluded that treatment with oncological dose of zoledronate decreases alveolar bone loss induced by EP, on the other hand, it increases the amount of alveolar necrotic bone tissue, increases and extends local inflammatory response, either at

sites with no periodontal treatment or the ones that went under SRP, in other words, periodontal disease and conventional mechanical periodontal treatment are important local risk factor for medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ).

Keywords: jaw osteonecrosis; bisphosphonates; wistar rats; dental scaling

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma evidenciando os procedimentos experimentais executados em seus respectivos intervalos de tempo nos grupos SAL e ZOL (A) e SAL-RAR e ZOL-RAR (B). Os grupos SAL-RAR aos 7 dias e aos 28 dias pós-operatórios correspondem aos 21 dias e 42 dias pós instalação da ligadura. Abreviações: IP, via de administração intraperitoneal. 81

Figura 2: Aspectos histológicos quantitativos e qualitativos da região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais. **A e F:** Gráficos apresentando a porcentagem de osso na região de furca, POF (A), e a porcentagem de osso necrótico na região de furca, PON (F) nos grupos SAL e ZOL aos 14, 21 e 42 dias pós instalação da ligadura. **B-E e G-J:** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico da região de furca do primeiro molar inferior em um sítio saudável nos grupos SAL (B) e ZOL (G) e no sítio com periodontite experimental aos 14 (C e H), 21 (D e I) e 42 (E e J) dias pós instalação da ligadura nos grupos SAL (C-E) e ZOL (H-J). Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-14d; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-21d; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-42d; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-14d; |, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-21d. Coloração: HE. Aumento original: 50x (B-E e G-J). Barras de escala: 200 µm (B-E e G-J). 82

Figura 3: Aspectos histológicos detalhado da região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais. **A-J:** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico da região de furca do primeiro molar inferior em um sítio saudável nos grupos SAL (B) e ZOL (G) e no sítio com periodontite experimental aos 14 (C e H), 21 (D e I) e 42 (E e J) dias pós instalação da ligadura nos grupos SAL (C-E) e ZOL (H-J). Em A e F 83

observar as características histológicas do tecido ósseo alveolar vital (A) e do tecido ósseo alveolar necrótico (F). As figuras de B-E e G-J correspondem a ampliação dos quadros observados nos respectivos grupos na Figura 2. Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar; lp, ligamento periodontal; setas brancas, osteócitos, setas azuis, restos apoptóticos de osteócitos; setas pretas, lacunas vazias; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-14d; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-21d; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-42d; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-14d; |, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-21d. Coloração: HE. Aumento original: 400x (A e F); 200x (B-E e G-J). Barras de escala: 25 µm (A e F); 50 µm (B-E e G-J).

Figura 4: Aspectos histológicos quantitativos e qualitativos da região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais submetidos ou não ao tratamento de raspagem e alisamento radicular. **A e F:** Gráficos apresentando a porcentagem de osso na região de furca, POF (A), e a porcentagem de osso necrótico na região de furca, PON (F) nos grupos SAL e ZOL aos 21 e 42 dias pós instalação da ligadura e nos grupos SAL-RAR e ZOL-RAR aos 7 e 28 dias pós-operatórios. Os grupos SAL-RAR aos 7 dias e aos 28 dias pós-operatórios correspondem aos 21 dias e 42 dias pós instalação da ligadura. **B-E e G-J:** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico da região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental e tratado com raspagem e alisamento radicular aos 7 (B-C e G-H) e 28 (D-E e I-J) dias pós operatórios nos grupos SAL-RAR (B-E) e ZOL-RAR (G-J). As figuras de C, E, H e J correspondem a ampliação dos quadros observados nos em B, D, G e I, respectivamente. Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar; setas brancas, osteócitos, setas azuis, restos apoptóticos de osteócitos; setas pretas, lacunas vazias; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-21d; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-42d; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-

RAR-7d; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-RAR-28d; |, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-21d; ≡, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-42d; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-RAR-7d. Coloração: *HE*. Aumento original: 50x (B, D, G e I); 200x (C, E, H e J). Barras de escala: 200 µm (B, D, G e I); 50 µm (C, E, H e J).

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais durante a progressão da PE ao longo do tratamento com veículo ou zoledronato. 86
- Tabela 2** - Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais sem terapia local ou tratados com RAR ao longo do tratamento com veículo ou zoledronato. 87

*Lista de
Abreviaturas*

LISTA DE ABREVIATURAS

%: porcentagem

°C: graus Celsius

±: mais ou menos

<: menor

µg/kg: microgramas por quilograma

µg: micrograma

µl: microlitro

µm: micrômetro

AAOMS: Associação Americana de Cirurgiões Buco-Maxilo-Faciais

AF: área de osso na furca

AM: Amazonas

ANOVA: Análise de Variância

AO: área de osso alveolar

BPs: bisfosfonatos

cm²: centímetro quadrado

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA: Estados Unidos da América

FOA: Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g: gramas

HE: hematoxilina e eosina

J: joule

J/cm²: joules por centímetro quadrado

Kg: quilograma

M: molar

mg: miligrama

ml: mililitros

mm²: milímetros quadrados

mW: miliwatts

n°: número

NaCl: cloreto de sódio

OCN: osteocalcina

ONM-M: osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa

PBS: tampão fosfato salino

PE: periodontite experimental

pH: potencial hidrogeniônico

POF: porcentagem de osso na furca

PON: Porcentagem de osso necrótico

RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B

RS: Rio Grande do Sul

s: segundos

SP: São Paulo

Lista de Anexos

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Normas para publicação segundo o periódico <i>Journal of periodontology</i>	89
ANEXO B: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	101

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAIS E MÉTODO	60
2.1 Delineamento experimental.....	60
2.1.1 Anestesia.....	60
2.1.2 Protocolo medicamentoso	60
2.1.3 Grupos experimentais	60
2.1.4 Periodontite induzida por ligadura	61
2.1.5 Raspagem e aplainamento radicular	61
2.1.6 Eutanásia e obtenção das amostras	61
2.2 Processamento histológico das amostras	61
2.3 Análise dos resultados	62
2.3.1 Análise da condição geral de saúde e exame clínico intrabucal ..	62
2.3.2 Análise histopatológica dos tecidos periodontais	62
2.3.3 Análise histométrica da POF e da PON	62
2.3.4 Análise estatística dos dados	63
3. RESULTADOS	64
3.1 Condição geral de saúde e exame clínico intrabucal.....	64
3.2 Condição dos tecidos periodontais 14 dias após a instalação da ligadura ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato.....	64
3.3 Progressão da PE ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato.....	65
3.4 Resposta dos tecidos periodontais à RAR ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledroanato	66
4. DISCUSSÃO	67

AGRADECIMENTOS	72
REFERÊNCIAS	73
FIGURAS	79
TABELAS.....	84
ANEXOS.....	88

Manuscrito para Publicação



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

Normatização segundo a revista **Journal of Periodontology**

Título: Periodontite experimental em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato: análise da progressão da doença e avaliação da resposta periodontal ao tratamento mecânico convencional

Autores:

Nathália Januario de Araujo¹ DDS

Juliano Milanezi de Almeida² DDS, MS, PhD

Edilson Ervolino³ DDS, MS, PhD

¹ MS Student in Dentistry at Araçatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista-UNESP, Department of Surgery and Integrated Clinic. Brazil.

² Assistant Professor at Araçatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista-UNESP, Department of Surgery and Integrated Clinic. Brazil.

³ Assistant Professor at Araçatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista-UNESP, Department of Basic Sciences. Brazil.

Autor correspondente: Edilson Ervolino

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

CEP: 16015-050

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

E-mail: eervolino@foa.unesp.br

1. INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BPs) são medicamentos que apresentam grande efetividade no tratamento de osteopatias que desencadeiam osteólise, tais como osteoporose, doença de Paget, osteogênese imperfeita, mieloma múltiplo, paratireoidismo primário, dentre outras (Drake et al., 2008). Além disso, são empregados no controle da progressão de metástase óssea, hipercalcemia e dor óssea em neoplasias malignas osteotrópicas, tais como tumores de mama, próstata, pulmão e rim (Drake et al., 2008). Os BPs são potentes inibidores do processo de reabsorção óssea. O bisfosfonato com a maior potência é o zoledronato, este atua através da inibição da via do mevalonato, inibindo a enzima farnesil difosfato sintase (Dunford et al., 2001). A interrupção desta via altera a 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. Além disso, o bloqueio desta via promove inibição parcial da osteoclastogênese (Abe et al., 2012) e desencadeia apoptose prematura em osteoclastos ativos (Coxon & Rogers, 2003; Ebetino et al., 2011; Ory et al., 2008; Rogers et al., 2011).

Dentre as reações adversas ocasionadas pelo uso dos BPs constitui um grande desafio para a osteonecrose dos maxilares a qual tem sido observada atualmente com mais frequência em função da crescente utilização desta classe de fármacos (Russell, 2011). Outros medicamentos também são capazes de desencadear a osteonecrose dos maxilares, tais como o inibidor de RANKL, denosumab, e drogas com potente ação antiangiogênica. A osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M) é definida como presença de osso exposto na região buco-maxilo-facial, por um período maior que oito semanas, em pacientes submetidos à tratamento prévio ou atual com droga anti-reabsortiva ou anti-angiogênica e que não possuem história prévia de radioterapia nos maxilares (Ruggiero et al., 2014). Os estadiamentos da ONM-M são: **estágio I:** osso necrótico exposto com ausência de dor ou sinais de infecção (assintomático); **estágio II:** osso necrótico exposto com presença de dor ou sinais de infecção (sintomático); **estágio III:** osso necrótico exposto com presença de dor e/ou sinais de infecção juntamente com um ou mais dos seguintes sinais: fratura patológica, fístula oro-cutânea, envolvimento do seio maxilar ou extensão da necrose para a borda inferior ou ramo da mandíbula. Além disso, um

estágio 0 precede os descritos anteriormente, onde há ausência de osso exposto, no entanto, há presença de sinais clínicos, radiográficos ou histológicos de osteonecrose (Ruggiero et al., 2014).

Ainda que as primeiras descrições de ONM-M tenham sido publicadas em 2003 sua etiopatogenia é pobremente compreendida, o que dificulta a prevenção e o tratamento. Dentre os supostos fatores etiopatológicos que atualmente são apontados como os desencadeadores da ONM-M estão: a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos, o que resulta no acúmulo de microfraturas no tecido ósseo e conseqüentemente áreas de tecido ósseo não vital, o que seria capaz de favorecer o estabelecimento de necrose; o potente efeito antiangiogênico dos BPs, o que resultaria em necrose avascular do tecido ósseo; o favorecimento à infecção induzido pelos BPs, os quais aumentam sobremaneira a capacidade de adesão e colonização de bactérias ao tecido ósseo exposto; e o efeito citotóxico dos BPs, o que resulta na diminuição da capacidade de reparo tanto dos tecidos moles quanto dos tecidos duros da região buco-maxilo-facial (para revisão Ruggiero et al., 2014; Allen & Burr, 2009).

Em pacientes que fazem uso de BPs pela via intravenosa, como é o caso do zoledronato ou sua associação com outros BPs, prescritos para complementação da terapia oncológica, a incidência da ONM-M atinge de 1 a 12% dos pacientes, e como os BPs tem efeito cumulativo esta incidência pode atingir 21% dos pacientes após o terceiro ano de uso deste tipo de fármaco (Gomez Font et al., 2008). Otto et al. (2011) reportaram que a ONM-M acomete com maior frequência o gênero feminino (73%), com idade avançada (em média 66 anos e uma variação entre 42-90 anos de idade), que fazem ou fizeram uso crônico de BPs administrado por via intravenosa (96,8%), especificamente o zoledronato (47,6%) ou este em associação com outros BPs (24,6%). Há uma predileção pela ocorrência na mandíbula, especificamente na região dos premolares e molares (70,6%) e a extração dentária (63,6%) é tida como um dos principais fatores desencadeadores da ONM-M (Otto et al., 2011). Recentemente, estudos clínicos tem atentado para o fato de que a exodontia de dentes com comprometimento periodontal e/ou periapical é o principal fator de risco local, ou seja, a presença prévia de inflamação e infecção local exercem um papel crucial no desencadeamento da ONM-M pós exodontia (Ruggiero & Dodson, 2014; Kang et al., 2013). Diante disso, a compreensão exata de como a doença periodontal participa da patofisiologia da ONM-M é de extrema importância, uma vez que a manutenção da

saúde periodontal pode ser um dos caminhos para se evitar o desencadeamento da doença na maioria dos pacientes.

Estudos clínicos demonstraram que a doença periodontal é um fator de risco para a ONM-M, no entanto, outros estudos descartam tal correlação. Estudos em animais mostraram que a terapia com zoledronato exacerba a resposta inflamatória e o dano tecidual e em alguns casos desencadeou a manifestação clínica da ONM-M. O padrão ouro para o tratamento da doença periodontal é a instrumentação mecânica (raspagem e alisamento radicular) das superfícies radiculares removendo depósitos bacterianos e fatores retentivos de placa bacteriana (Hung & Douglass 2002). Estudos clássicos da literatura demonstram que a raspagem e alisamento radicular resulta na melhora de todos os parâmetros clínicos, incluindo profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e inflamação gengival (Hill et al., 1981; Lindhe et al., 1984; Ramfjord et al., 1987; Kaldahl et al., 1996; Haffajee et al., 1997). Em um modelo experimental animal de periodontite induzida com ligadura, a remoção da ligadura seguida de RAR para a eliminação da placa bacteriana, agentes microbianos aderidos ao cimento e cimento necrótico tem se mostrado efetivo no tratamento desta condição, similarmente ao que ocorre após a terapia de RAR em humanos. Por se tratar da terapia de escolha para a doença periodontal, mas que apresenta invasibilidade tecidual, analisar a efetividade e o risco do emprego da terapia mecânica convencional durante tratamento com dose oncológica de zoledronato se faz necessário.

Com o envelhecimento da população a utilização dos BPs ou outras drogas com ação antirreabsortiva ou antiangiogênica será cada vez mais frequente, tendo em vista que são alternativas terapêuticas para doenças comuns na terceira idade. Sendo assim, os pacientes que fazem uso crônico de BPs serão cada vez mais comuns no consultório odontológico, tais pacientes quando apresentarem um comprometimento periodontal necessitarão de um tratamento efetivo e acima de tudo seguro. O objetivo do presente estudo foi analisar a progressão da periodontite experimental sem tratamento local e a resposta dos tecidos periodontais frente à RAR ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato, com o intuito de avaliar a efetividade e a segurança da terapia periodontal mecânica convencional.

2. MATERIAIS E MÉTODO

No presente estudo foram utilizados 100 ratos (6 meses de idade) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso corporal compreendido entre 450 – 550g. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (FOA – UNESP) e posteriormente mantidos no Biotério de Experimentação da Disciplina de Periodontia da FOA-UNESP. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “*Guide to the care and use of experimental animals*” e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA - UNESP. (PROCESSO FOA Nº 00623-2015).

2.1 Delineamento experimental

2.1.1 Anestesia

Para a instalação da ligadura e eutanásia os animais foram anestesiados, via injeção intramuscular, de cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil).

2.1.2 Protocolo medicamentoso

O plano de tratamento medicamentoso teve duração total de oito semanas. A administração de veículo ou zoledronato (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) ocorreu pela via intraperitoneal obedecendo um intervalo de três dias entre as injeções. A dose de zoledronato foi de 100µg/Kg, a qual foi diluída em 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%. A dose de zoledronato e o plano de tratamento medicamentoso consistiram em uma adaptação para o rato do protocolo empregado atualmente para terapia oncológica de humanos.

2.1.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: SAL (n=30), ZOL (n=30), SAL-RAR (n=20) e ZOL-RAR (n=20). Nos grupos SAL e ZOL os animais receberam injeção intraperitoneal de 0,45 ml de veículo ou zoledronato, a cada intervalo de três

dias, durante oito semanas. Na segunda semana de tratamento foi instalada uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior esquerdo, a qual permaneceu em posição durante todo o período experimental. Não foi realizado nenhum tratamento periodontal local. A eutanásia nestes grupos foi efetuada aos 14, 21 e 42 dias pós instalação da ligadura (Figura 1A). Nos grupos SAL-RAR e ZOL-RAR foi efetuado um tratamento similar ao supracitado, no entanto, a ligadura permaneceu em posição por duas semanas, foi removida e foi realizada a raspagem e aplainamento radicular. A eutanásia nestes grupos foi efetuada aos 7 e 28 dias pós-tratamento periodontal, ou seja, 21 e 42 dias pós instalação da ligadura, respectivamente (Figura1B).

2.1.4 Periodontite induzida por ligadura

Após 14 dias do início do plano de tratamento medicamentoso foi instalada uma ligadura de algodão (fio de algodão #24; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo, para o acúmulo de placa bacteriana e conseqüentemente indução de periodontite experimental (PE). No primeiro molar inferior direito não foi instalada a ligadura.

2.1.5 Raspagem e aplainamento radicular

A RAR foi realizada com curetas manuais mini-five 1-2 (Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, USA) através de dez movimentos de tração disto-mesial, nas faces vestibular e lingual, e dez movimentos de tração cérvico-oclusais, nas áreas interproximais e de furca.

2.1.6 Eutanásia e obtenção das amostras

Findado o protocolo experimental, os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com solução 0,9% de cloreto de sódio acrescida de 0,1% de heparina (100 ml), seguida de solução fixadora (800 ml) constituída de 4% de formaldeído (Sigma, Saint Louis, MO, USA) em tampão fosfato salino (PBS – Sigma, Saint Louis, MO, USA), 0,1M, 4°C, pH 7,4. As hemimandíbulas foram cuidadosamente dissecadas e submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora durante 72 horas.

2.2 Processamento histológico das amostras

As hemimandíbulas foram submetidas à lavagem em água, e imersas em solução desmineralizadora (constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA, durante 30 dias). Após a desmineralização, as peças foram lavadas em água, desidratadas, diafanizadas, impregnadas e incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo com 4 µm de espessura. A microtomia foi executada seguindo um plano de corte que progrediu de vestibular para lingual. Foram coletados os cortes seriados da região de furca do primeiro molar inferior. As secções histológicas foram montadas em lâminas de vidro e submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina para análise histopatológica e análise histométrica.

2.3 Análise dos resultados

2.3.1 Análise da condição geral de saúde e exame clínico intrabucal

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

2.3.2 Análise histopatológica dos tecidos periodontais

A análise histopatológica foi efetuada por um histologista certificado (Prof. Dr. Edilson Ervolino) avaliando-se os seguintes parâmetros: intensidade da resposta inflamatória local; extensão do processo inflamatório; presença, extensão e natureza de reabsorção de osso, cimento e dentina; padrão de estruturação da matriz extracelular dos tecidos periodontais e padrão de celularidade dos tecidos periodontais.

2.3.3 Análise histométrica da POF e PON

Para a determinação da **Porcentagem de Tecido Ósseo na Região de Furca (POF)** dos primeiros molares 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 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 a 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 ($POF = (AO \times 100) / AF$). A POF foi expressa em mm^2 e como média \pm desvio padrão em cada grupo experimental.

Para a determinação da **Porcentagem de Tecido Ósseo Necrosado na Região de Furca (PON)** dos primeiros molares foi utilizado o sistema de análise descrito acima. Na AF contornou-se a(s) área(s) constituída(s) por tecido ósseo necrosado (ON). PON foi calculada multiplicando-se ON por 100 e dividindo-se por POF ($PON = (ON \times 100) / POF$). A PON foi expressa em mm^2 e como média \pm desvio padrão em cada grupo experimental.

2.3.4 Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados histométricos foi utilizado o programa GraphPad Prism 6. Após a aplicação do Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk, foi empregado o teste estatístico de Análise de Variância ANOVA e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Condição geral de saúde e exame clínico intrabucal

As condições gerais de saúde dos animais utilizados neste estudo se mantiveram constantes durante todo o período experimental. Tais animais toleraram bem todos os procedimentos experimentais. Não houve diferença intragrupo e intergrupos no peso corporal médio dos animais ao longo do experimento.

Ao exame clínico intrabucal não foi constatada nenhuma alteração macroscópica na cavidade bucal. Houve grande acúmulo de placa bacteriana na ligadura instalada no primeiro molar inferior esquerdo. Em SAL aos 14 dias, 21 dias e 42 dias pós instalação da ligadura constatou-se moderado edema e eritema gengival e moderada perda óssea alveolar, a qual se mostrou progressiva. Em ZOL aos 14 dias, 21 dias e 42 dias pós instalação da ligadura constatou-se intenso edema e eritema gengival e discreta perda óssea alveolar. No grupo SAL-RAR aos 7 e 28 dias pós-operatórios observou-se redução gradativa do edema e do eritema gengival e discreta perda óssea alveolar. No grupo ZOL-RAR aos 7 e 28 dias pós-operatórios observou-se intenso edema e eritema gengival e discreta perda óssea alveolar, ou seja, as características clínicas da PE se mantiveram semelhantes aquelas apresentadas pelos grupos que não receberam o tratamento periodontal local. Não foi constatada a manifestação clínica da ONM-M (estágio 1 / estágio 2 / estágio 3) em nenhum grupo experimental.

3.2 Condição dos tecidos periodontais 14 dias após a instalação da ligadura ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato

Aspecto histológico dos tecidos periodontais: As características histológicas dos tecidos periodontais no sítio saudável se mostraram condizentes com um quadro de normalidade tanto em SAL quanto em ZOL (Figuras 2B, 2G, 3B, 3G). Em ZOL, mesmo no sítio saudável, constatou-se a presença de considerável quantidade de tecido ósseo necrótico (Figura 3G). No sítio com PE, onde a ligadura permaneceu instalada por 14 dias tanto em SAL quanto em ZOL, observou-se as características histológicas da periodontite, como presença de inflamação, que se apresentou mais exacerbada em ZOL, e perda óssea alveolar, a qual se mostrou mais discreta em ZOL (Figuras 2C, 2H, 3C, 3H).

POF: Tanto no grupo SAL quanto no grupo ZOL a instalação da ligadura promoveu redução da POF. No sítio saudável (primeiro molar inferior direito) não houve diferença estatisticamente significativa na POF entre SAL e ZOL, todavia, no sítio com PE (primeiro molar inferior esquerdo) a POF se mostrou maior em ZOL quando comparado com SAL ($p < 0,05$).

PON: Em ZOL a PON se mostrou significativamente maior que em SAL tanto no sítio saudável ($p < 0,01$) quanto no sítio com PE ($p < 0,01$). Em SAL a PON no sítio saudável e no sítio com PE não apresentou diferença estatisticamente significativa. A PON em ZOL foi significativamente maior no sítio com PE quando comparado com o sítio saudável ($p < 0,01$).

3.3 Progressão da PE ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato

Aspecto histológico dos tecidos periodontais: Em ZOL a resposta inflamatória local se mostrou consideravelmente mais exacerbada que em SAL em todos os períodos experimentais (Figuras 2C, 2D, 2E, 2H, 2I, 2J). ZOL apresentou pouca perda óssea alveolar, no entanto, muito tecido ósseo necrótico em relação ao SAL em todos os períodos experimentais (Figuras 3C, 3D, 3E, 3H, 3I, 3J). O comprometimento da vitalidade do tecido ósseo alveolar foi crescente ao longo do tempo em ZOL. Os parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais durante a progressão da PE ao longo do tratamento com veículo ou zoledronato estão apresentados na Tabela 1.

POF: Em ZOL a POF se mostrou maior que em SAL aos 14 dias ($p < 0,05$), 21 dias ($p < 0,01$) e 42 dias ($p < 0,01$) pós instalação da ligadura. Em SAL não houve diferença estatisticamente significativa na POF aos 21 dias e 42 dias pós instalação da ligadura, todavia, ambos os períodos apresentaram menor POF em relação aos 14 dias pós instalação da ligadura. Em ZOL não houve diferença estatisticamente significativa na POF entre os períodos experimentais (Figura 2A).

PON: Em ZOL a PON se mostrou significativamente maior que SAL aos 14 dias ($p < 0,01$), 21 dias ($p < 0,01$) e 42 dias ($p < 0,01$) pós instalação da ligadura. Em SAL não houve diferença estatisticamente significativa na PON entre os períodos experimentais. Em ZOL a PON se mostrou significativamente maior aos 42 dias em relação aos 14 dias ($p < 0,01$) e 21 dias ($p < 0,01$) pós instalação da ligadura. Em ZOL

não houve diferença estatisticamente significativa na PON aos 14 dias e 21 dias pós instalação da ligadura (Figura 2F).

3.4 Resposta dos tecidos periodontais à RAR ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato

Aspecto histológico dos tecidos periodontais: Em ZOL e em ZOL-RAR a resposta inflamatória local se mostrou consideravelmente mais exacerbada que em SAL e que em SAL-RAR, em todos os períodos experimentais (Figuras 4B, 4D, 4G, 4I). ZOL e ZOL-RAR apresentaram pouca perda óssea alveolar, no entanto, muito tecido ósseo necrótico em relação ao SAL e ao SAL-RAR em todos os períodos experimentais (Figuras 4C, 4E, 4H, 4J). Após a RAR o comprometimento da vitalidade do tecido ósseo alveolar foi crescente ao longo do tratamento com zoledronato, o que não ocorreu no grupo tratado com o veículo, o qual apresentou melhora nas condições periodontais. Os parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais, sem terapia local ou tratados com RAR ao longo do tratamento com veículo ou zoledronato, estão apresentados na Tabela 2.

POF: Em SAL a POF se mostrou menor que em ZOL tanto aos 21 dias ($p < 0,01$) quanto aos 42 dias ($p < 0,01$) pós instalação da ligadura. Aos 21 dias pós instalação da ligadura não houve diferença estatisticamente significativa na POF entre SAL e SAL-RAR. Aos 42 dias pós instalação da ligadura a POF se mostrou maior em SAL-RAR em relação ao SAL. Não houve diferença estatisticamente significativa na POF em ZOL e ZOL-RAR em ambos os períodos experimentais (Figuras 4A).

PON: Em ZOL a PON se mostrou significativamente maior que em SAL aos 21 dias ($p < 0,01$) e 42 dias ($p < 0,01$) pós instalação da ligadura. A PON se mostrou significativamente maior em ZOL-RAR em relação ao SAL-RAR tanto aos 21 dias ($p < 0,01$) quanto aos 42 dias ($p < 0,01$) pós instalação da ligadura. Em SAL-RAR aos 28 dias pós operatórios a PON se apresentou menor que em SAL aos 21 dias e 42 dias pós instalação da ligadura e que SAL-RAR aos 7 dias pós operatórios. Em ZOL aos 42 dias a PON foi maior que aos 21 dias pós instalação da ligadura. A maior PON foi observada em ZOL-RAR aos 28 dias pós operatórios. Neste grupo a PON se mostrou maior que ZOL, em ambos os períodos experimentais, e que ZOL-RAR aos 7 dias operatórios (Figuras 4B).

4. DISCUSSÃO

O zoledronato é um medicamento empregado no tratamento de doenças ou condições que desencadeiam osteólise. Por ser o bisfosfonato de maior potência, seu uso tem sido associado com a maioria dos casos de ONM-M (Drake et al., 2008). A etiopatogenia da doença ainda é pobremente compreendida, o que dificulta sua prevenção e tratamento (Allen & Burr, 2009). Estudos mostram que o principal fator de risco local para a ONM-M é a exodontia (Otto et al., 2011). Todavia, na maioria dos casos a exodontia é motivada por severo comprometimento periodontal e/ou periapical do dente, ou seja, há presença local de infecção/inflamação. Alguns estudos mostram que grande parte dos pacientes que desenvolveram ONM-M pós exodontia haviam sido submetidos à exodontia de dentes com comprometimento periodontal severo, o que coloca a presença prévia de infecção/inflamação periodontal desempenhando um importante papel na ONM-M (Song et al., 2016; Ruggiero & Dodson, 2014; Kang et al., 2013; Aguirre et al., 2012; Mawardi et al., 2009). Alguns estudos experimentais mostraram uma correlação entre a doença periodontal e a ONM-M (Li et al., 2016; Aguirre et al., 2012; Aghaloo et al., 2011). Alguns estudos clínicos sugeriram tal correlação, no entanto, outros não correlacionam as duas condições (Nicolatou-Galitis et al., 2015; Vahtsevanos et al., 2009; Marx et al., 2005).

É consenso que boa saúde bucal é fundamental para diminuir o risco de desenvolvimento de ONM-M, no entanto, o emprego da terapia mecânica periodontal convencional ao longo do tratamento com potentes drogas com ação antirreabsortiva ainda não foi investigado. Como a terapia periodontal é um procedimento invasivo e requer posteriormente grande remodelação tecidual, a qual é significativamente reduzida com o uso de dose oncológica de drogas com ação antirreabsortiva, analisar se a terapia mecânica convencional, via RAR, é efetiva e/ou segura durante este tipo de tratamento é de grande importância, uma vez que poderia evitar o desencadeamento da ONM-M.

Em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato o presente estudo analisou a progressão da PE sem tratamento local e avaliou a efetividade e a segurança da RAR como tratamento da PE. Foi constatado que o zoledronato reduziu a perda óssea alveolar induzida pela PE, todavia, aumentou significativamente a quantidade de tecido ósseo alveolar necrótico, exacerbou e prolongou a resposta

inflamatória local, o que coloca a PE como um importante fator de risco local para a ONM-M. Ainda foi verificado que a RAR, como terapia para a PE em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato, promoveu um aumento ainda maior da quantidade de tecido ósseo alveolar necrótico e não foi capaz de reduzir a resposta inflamatória periodontal, todavia, não ocasionou alteração na perda óssea alveolar. Tais achados colocam o tratamento da PE exclusivamente com RAR como um risco para o desencadeamento da ONM-M.

A análise histopatológica da progressão da PE efetuada no presente estudo evidenciou um intenso infiltrado inflamatório nos tecidos periodontais e, além disso, a análise histométrica mostrou que embora a POF tenha se mantido inalterada, a PON se mostrou grandemente aumentada, o que corrobora com achados anteriores (Li et al., 2016; Aguirre et al., 2012; Aghaloo et al., 2011). Aguirre et al. (2012) realizaram um estudo onde avaliaram a progressão da periodontite experimental durante tratamento crônico com zoledronato. Todavia, tais autores utilizaram uma linhagem de ratos bastante susceptível e o modelo de indução da doença periodontal foi baseado em uma dieta específica, ou seja, deixando de mimetizar a condição que ocorre em humanos. Aghallo et al. (2013) e Li et al. (2014) empregaram o modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos tratados com zoledronato, no entanto, tais autores restringiram significativamente a duração do protocolo medicamentoso, condição esta que não ocorre no tratamento em humanos. Em todos os trabalhos citados verificou-se que a terapia com zoledronato exacerba a resposta inflamatória e o dano tecidual e em alguns casos induziu o desencadeamento da osteonecrose.

O zoledronato altera o metabolismo ósseo atuando predominantemente nos osteoclastos através da inibição da via do mevalonato (Dunford et al., 2001). A interrupção de tal via metabólica provoca alterações na dinâmica do citoesqueleto destas células, impossibilitando a formação da zona clara e da zona preguçada, as quais são essenciais para a interação da célula com a matriz óssea e para a formação do microambiente propício para a atividade reabsortiva. Além disso, promove inibição da osteoclastogênese e indução de apoptose prematura em osteoclastos ativos (Ebetino et al., 2011; Rogers et al., 2011; Ory et al., 2008; Coxon & Rogers, 2003).

As ações sobre os osteoclastos explicam concomitantemente tanto a maior POF como a maior PON nos grupos tratados com dose oncológica de zoledronato e cuja PE progrediu sem tratamento local. A inibição da reabsorção óssea minimiza a perda óssea alveolar, o que explicaria a maior POF observada no grupo ZOL, mas

também compromete a remodelação óssea, que é composta por uma etapa onde ocorre a reabsorção óssea, e por uma outra onde ocorre a neoformação óssea. O efeito sobre a remodelação óssea impede que ocorra a eliminação do tecido ósseo inviável e das microfraturas ósseas, comuns no tecido ósseo alveolar, que apresenta uma alta taxa de renovação especialmente em função da atividade mastigatória, que para promover a dissipação das forças, necessita de uma resposta adaptativa constante do osso alveolar.

No presente estudo provavelmente o acúmulo de tecido ósseo necrótico tenha favorecido a contaminação do tecido ósseo, especialmente onde houve acúmulo de placa bacteriana em função da presença da ligadura. O acúmulo de tecido ósseo necrótico aliado à presença da infecção periodontal e à ação negativa do zoledronato sobre variadas linhagens de células que compõem os tecidos periodontais supostamente torna o processo inflamatório local mais intenso e prolongado. O exacerbado processo inflamatório/infeccioso nos tecidos periodontais associado a um comprometimento da renovação tanto dos tecidos moles quanto dos tecidos duros coloca a doença periodontal como um importante fator de risco para o desencadeamento da ONM-M (Katsareliset al., 2015). Supostamente com a progressão de tais eventos o comprometimento tecidual torna-se cada vez maior e, por esta razão, ocorre a manifestação clínica da ONM-M.

O principal achado do presente estudo, que consiste em algo alarmante, e que torna ainda mais difícil a assistência de pacientes que fazem uso de potentes drogas com ação antirreabsortiva, é a resposta insatisfatória dos tecidos periodontais frente à RAR nos grupos tratados com dose oncológica de zoledronato. Nesta situação, provavelmente a ação indesejável mais significativa do zoledronato seja sua interferência negativa sobre o processo de reparação tecidual, algo essencial no pós operatório da RAR. O processo de reparo dos tecidos periodontais é um evento complexo que envolve o tecido epitelial e o tecido conjuntivo, que compõem o periodonto de proteção, o cemento, o ligamento periodontal e o osso alveolar, que compõem o periodonto de inserção.

Estudos demonstraram que os BPs exercem um efeito negativo sobre os queratinócitos da mucosa bucal. Estes estudos mostraram que os BPs são capazes de diminuir significativamente a proliferação (Donetti et al., 2014; Saito et al., 2014; Ohnuki et al., 2012; Saracino et al., 2012; Scheller et al., 2011), capacidade de migração (Anavi-lev et al., 2013; Fromigué & Body, 2002), adesão intercelular e

maturação de queratinócitos (Basso et al., 2013), eventos essenciais para o processo de regeneração do tecido epitelial. Além disso, a viabilidade dos queratinócitos maduros é consideravelmente prejudicada pelos BPs, uma vez que tais fármacos são capazes de induzir apoptose e senescência prematura em tais células, o que comprometeria a integridade da estrutura do tecido epitelial. Da mesma forma, estudos demonstraram efeitos negativos dos BPs sobre a proliferação de fibroblastos da lâmina própria da mucosa bucal (Pansani et al., 2014; Acil et al., 2012; Ravosa et al., 2011; Scheper et al., 2009). Além disso, a função de fibroblastos maduros é comprometida pelos BPs, assim como a motilidade e a produção de elementos da matriz extracelular (Acil et al., 2012; Ravosa et al., 2011; Simon et al., 2010), em especial do colágeno, são reduzidos na presença de BPs. Mawardi et al. (2011) verificaram que a exposição concomitante de fibroblastos gengivais humanos ao ácido pamidônico, (que também é um N-BP), e ao *Fusobacterium nucleatum* é capaz de regular negativamente a expressão do fator de crescimento de queratinócitos, uma molécula produzida por células conjuntivas para regular a proliferação e migração de células epiteliais durante o processo de regeneração deste tecido (Mawardi et al., 2011). Diante do exposto verifica-se que o zoledronato é capaz de interferir com a capacidade de regeneração do tecido epitelial e de reparação do tecido conjuntivo, assim como, atuar sobre a interação entre tais tecidos, o que também é essencial para o reparo da mucosa bucal após a RAR.

Um outra ação do zoledronato que compromete a capacidade de reparação periodontal pós RAR é aquela sobre os osteoblastos do osso alveolar. Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) mostram que na dose oncológica o zoledronato compromete severamente o processo de reparação tecidual pós exodontia. BMP-2/4 é um dos principais fatores de crescimento que induzem a diferenciação de osteoblastos (Salazar et al., 2016). Huang et al. (2016), em estudo in vitro, reportaram que em baixas concentrações o zoledronato compromete o processo de diferenciação osteoblástica via redução do nível de BMP-2, o que também foi mostrado em estudo in vivo de nosso laboratório (dados não publicados). Células ósseas maduras também são afetadas pelo zoledronato, Huang et al. (2016), demonstraram que a expressão gênica de colágeno tipo I, o principal elemento da matriz óssea orgânica, e de fosfatase alcalina e OCN, essenciais para o processo de biomineralização da matriz, são drasticamente reduzida em osteoblastos tratados com zoledronato. Tais autores reportaram inclusive que em altas concentrações o

zoledronato exercem um potente efeito citotóxico sobre os osteoblastos maduros. Efeitos negativos do zoledronato sobre os osteoblastos maduros também são reportados por vários outros autores (Basso et al., 2013; Orris et al., 2009; Pozzi et al., 2009; Naidu et al., 2008; Anavi-lev et al., 2003). Sendo assim, a resposta do tecido ósseo alveolar diante da terapia mecânica convencional com RAR é comprometida pelo zoledronato, impossibilitando a reparação do periodonto e até exerce um efeito iatrogênico em tais tecidos. Com isso, a susceptibilidade à infecção aumenta, especialmente em sítio com doença periodontal, o que coloca o emprego exclusivo da RAR como um risco para o desencadeamento da ONM-M.

Diante dos resultados do presente estudo é imprescindível que outras estratégias terapêuticas periodontais sejam avaliadas ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato. O emprego de terapias adjuvantes à RAR, em especial aquelas com ação bioestimulatória e/ou antimicrobiana, poderia se constituir em uma maneira de tornar a terapia periodontal efetiva e segura ao longo do tratamento com drogas com ação antirreabsortiva. Conclui-se que o tratamento com dose oncológica de zoledronato reduz a perda óssea alveolar induzida pela PE, todavia, aumenta a quantidade de tecido ósseo alveolar necrótico, exacerba e prolonga a resposta inflamatória local, tanto nos sítios sem tratamento periodontal quanto nos sítios submetidos à RAR, ou seja, a doença periodontal e o tratamento mecânico periodontal convencional são importantes fatores de risco locais para o desencadeamento da ONM-M.

AGRADECIMENTOS

À Disciplina de Periodontia e ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERÊNCIAS

Abe K, Yoshimura Y, Deyama Y, Kikuri T, Hasegawa T, Tei K, Shinoda H, Suzuki K, Kitagawa Y. 2012. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* 29(6):1007-1015.

Acil Y, Moller B, Niehoff P, Rachko K, Gassling V, Wiltfang J (2012) The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Craniomaxillofac Surg* 40:229-35.

Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, Bezouglaia O, Dry SM, Tetradis S: Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res* 2011, 26(8):1871-1882.

Aghaloo TL1, Cheong S, Bezouglaia O, Kostenuik P, Atti E, Dry SM, Pirih FQ, Tetradis S. RANKL inhibitors induce osteonecrosis of the jaw in mice with periapical disease. *J Bone Miner Res*. 2014 Apr;29(4):843-54.

Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, Pingel JE, Williams A, Jorgensen M, Kesavalu L, Wronski TJ: Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res*. 2012, 27:2130-43.

Allen MR, Burr DB. 2009. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg* 67(5 Suppl):61-70. 2009.

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

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

Coxon FP, Rogers MJ. 2003. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 72(1):80-84. 2003.

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

Drake MT, Clarke BL, Khosla S. 2008. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 83(9):1032-1045. 2008.

Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, Ebetino FH, Rogers MJ. 2001. 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* 296(2):235-242.

Ebetino FH, Hogan AM, Sun S, Tsoumpra MK, Duan X, Triffitt JT, Kwaasi AA, Dunford JE, Barnett BL, Oppermann U, Lundy MW, Boyde A, Kashemirov BA, McKenna CE, Russell RG. 2011. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone* 49(1):20-33.

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

Gomez Font R, Martinez Garcia ML, Olmos Martinez JM. 2008. Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments. Update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13(5):E318-324.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1997 May;24(5):324-34.

Hill RW, Ramfjord SP, Morrison EC, Appleberry EA, Caffesse RG, Kerry GJ, Nissle RR. Four types of periodontal treatment compared over two years. *J Periodontol*. 1981 Nov;52(11):655-62.

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

Hung HC, Douglass CW. Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss. *J Clin Periodontol*. 2002 Nov;29(11):975-86.

Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Molvar MP, Dyer JK. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol*. 1996 Feb;67(2):93-102.

Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Atti E, Dry SM, Pirih FQ, Aghaloo TL, Tetradis S: Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res*. 2013, 28:1631-40.

Katsarelis H, Shad NP, Dhariwall DK, Pazinas M. Infection and Medication-related Osteonecrosis of the Jaw. *J Dent. Research*. 2015, 94(4) 534-539.

Li CL, Lu WW, Seneviratne CJ, Leung WK, Zwahlen RA, Zheng LW. Role of periodontal disease in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats. *Clin Oral Implants Res* 2016, 27(1): 1-6

Li Y, Lu Z, Zhang X, Yu H, Kirkwood KL, Lopes-Virella MF, Huang Y. Metabolic syndrome exacerbates inflammation and bone loss in periodontitis. *J Dent Res*. 2015 Feb;94(2):362-70.

Lindhe J, Nyman S. Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1984 Sep;11(8):504-14.

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005, 63(11):1567-75

Mawardi H, Treister N, Richardson P, Anderson K, Munshi N, Faiella RA, Woo SB: Sinus tracts - an early sign of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws? *J Oral Maxillofac Surg* 2009, 67:593-601.

Mawardi H1, Giro G, Kajiya M, Ohta K, Almazrooa S, Alshwaimi E, Woo SB, Nishimura I, Kawai T. A role of oral bacteria in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res*. 2011 Nov;90(11):1339-45.

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

Nicolatou-Galitis O et al., Periodontal disease preceding osteonecrosis of the jaw (ONJ) in cancer patients receiving antiresorptives alone or combined with targeted therapies: report of 5 cases and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015 Dec;120(6):699-706.

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

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

Ory S, Brazier H, Pawlak G, Blangy A. 2008. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *Eur J Cell Biol* 87(8-9):469-477.

Otto S, Sotlar K, Ehrenfeld M, Pautke C. 2011. Osteonecrosis of the jaw as a possible rare side effect of annual bisphosphonate administration for osteoporosis: A case report. *J Med Case Rep* 5:477.

Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi C, Hebling J, De Souza Costa CA (2014) Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg* 43:1030-34.

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

Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrison EC, Hill RW, Kerry GJ, Appleberry EA, Nissle RR, Stults DL. 4 modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol*. 1987 Sep;14(8):445-52.

Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS (2011) Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Arch Oral Biol* 56:491-98.

Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Monkkonen J. 2011. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 49(1):34-41.

Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O'Ryan F (2014) American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws - 2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg* 72:2381-2

Ruggiero SL, Dodson TB: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws- 2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014, 72:2381-2.

Russell RG. 2011. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* 49(1):2-19.

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

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

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

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

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

Simon MJ, Niehoff P, Kimmig B, Wiltfang J, Acil Y (2010) Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Investig* 14:51-8.

Song M, et al., Preexisting Periapical Inflammatory Condition Exacerbates Tooth Extration-induced Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw Lesions in Mice. *J Endod* 2016, Nov;42(11):1641-1646.

Vahtsevanos K, Kyrgidis A, Verrou E, Katodritou E, Triaridis S, Andreadis CG, Boukovinas I, Koloutsos GE, Teleioudis Z, Kitikidou K, Paraskevopoulos P, Zervas K, Antoniadis K. Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Clin Oncol* 2009, 27(32):5356-62

Figuras

Figura 1: Fluxograma evidenciando os procedimentos experimentais executados em seus respectivos intervalos de tempo nos grupos SAL e ZOL (A) e SAL-RAR e ZOL-RAR (B). Os grupos SAL-RAR e ZOL-RAR aos 7 dias e aos 28 dias pós-operatórios correspondem aos 21 dias e 42 dias pós instalação da ligadura. Abreviações: IP, via de administração intraperitoneal.

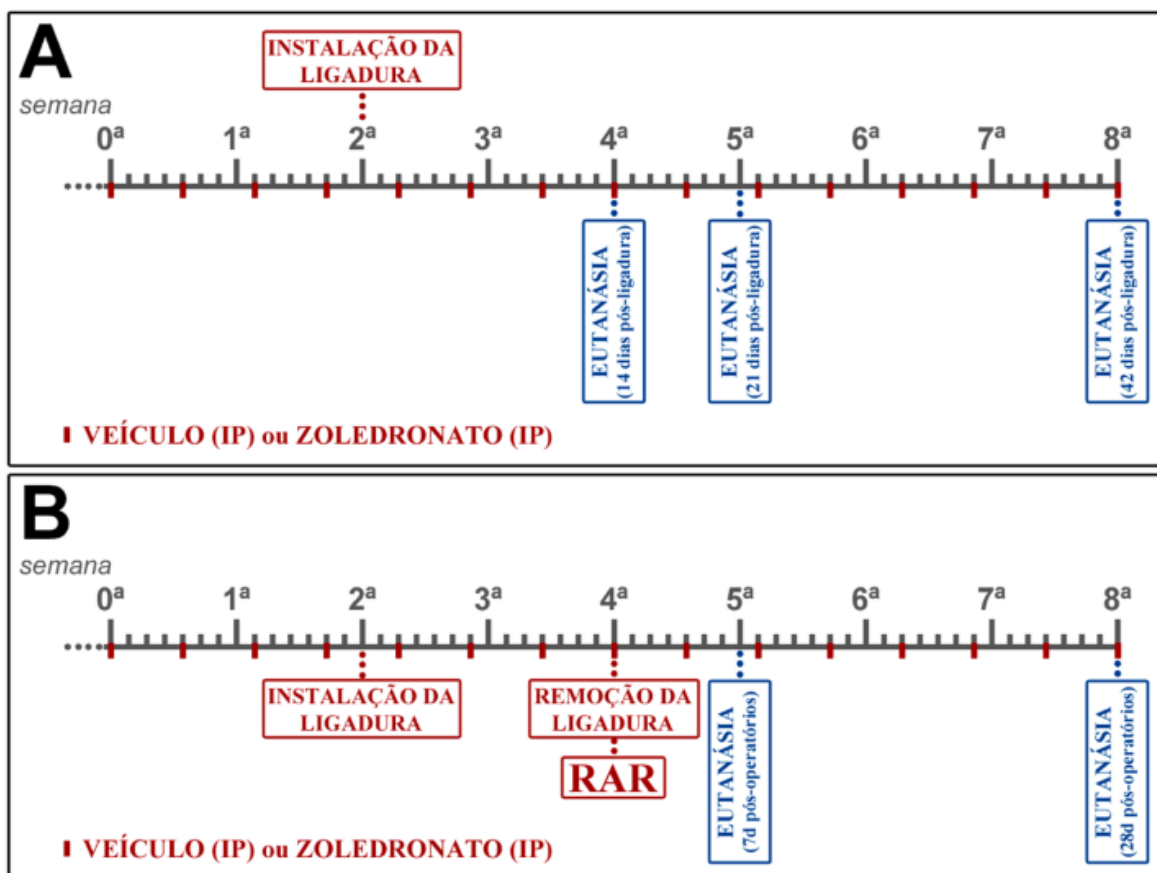


Figura 2: Aspectos histológicos quantitativos e qualitativos da região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais. **A e F:** Gráficos apresentando a porcentagem de osso na região de furca, POF (A), e a porcentagem de osso necrótico na região de furca, PON (F), nos grupos SAL e ZOL aos 14, 21 e 42 dias pós instalação da ligadura. **B-E e G-J:** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico da região de furca do primeiro molar inferior em um sítio saudável nos grupos SAL (B) e ZOL (G) e no sítio com periodontite experimental aos 14 (C e H), 21 (D e I) e 42 (E e J) dias pós instalação da ligadura nos grupos SAL (C-E) e ZOL (H-J). Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-14d; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-21d; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-42d; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-14d; |, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-21d. Coloração: HE. Aumento original: 50x (B-E e G-J). Barras de escala: 200 µm (B-E e G-J).

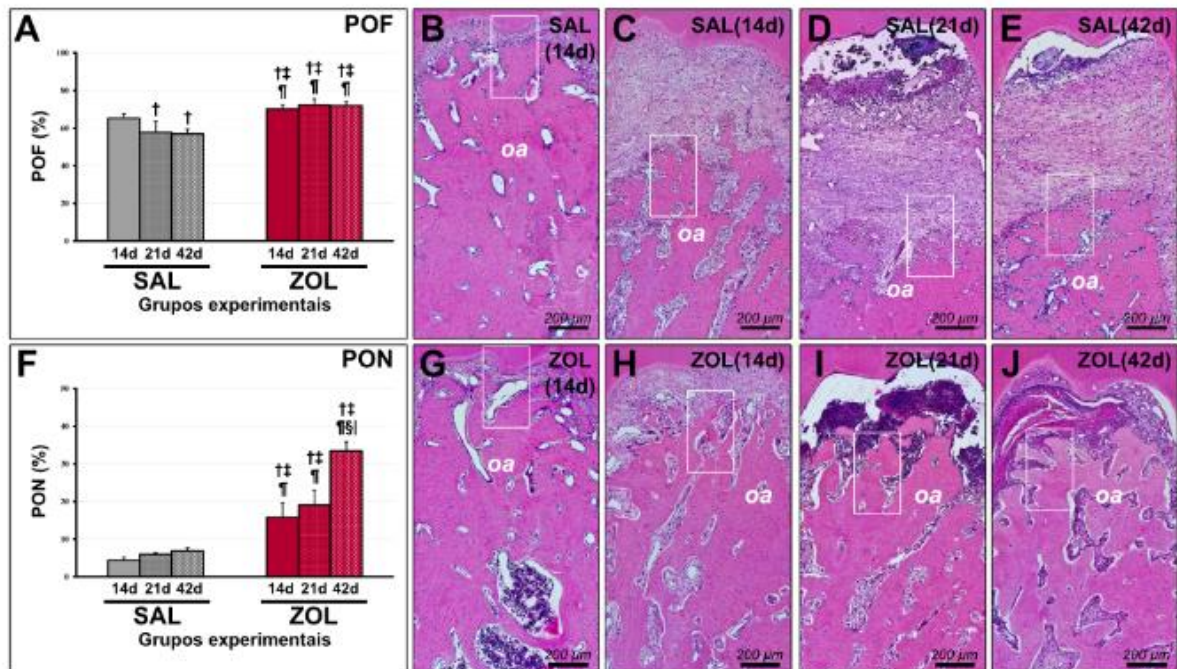


Figura 3: Aspectos histológicos detalhado da região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais. **A-J:** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico da região de furca do primeiro molar inferior em um sítio saudável nos grupos SAL (B) e ZOL (G) e no sítio com periodontite experimental aos 14 (C e H), 21 (D e I) e 42 (E e J) dias pós instalação da ligadura nos grupos SAL (C-E) e ZOL (H-J). Em A e F observar as características histológicas do tecido ósseo alveolar vital (A) e do tecido ósseo alveolar necrótico (F). As figuras de B-E e G-J correspondem a ampliação dos quadros observados nos respectivos grupos na Figura 2. Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar; lp, ligamento periodontal; setas brancas, osteócitos, setas azuis, restos apoptóticos de osteócitos; setas pretas, lacunas vazias; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-14d; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-21d; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-42d; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-14d; |, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-21d. Coloração: *HE*. Aumento original: 400x (A e F); 200x (B-E e G-J). Barras de escala: 25 µm (A e F); 50 µm (B-E e G-J).

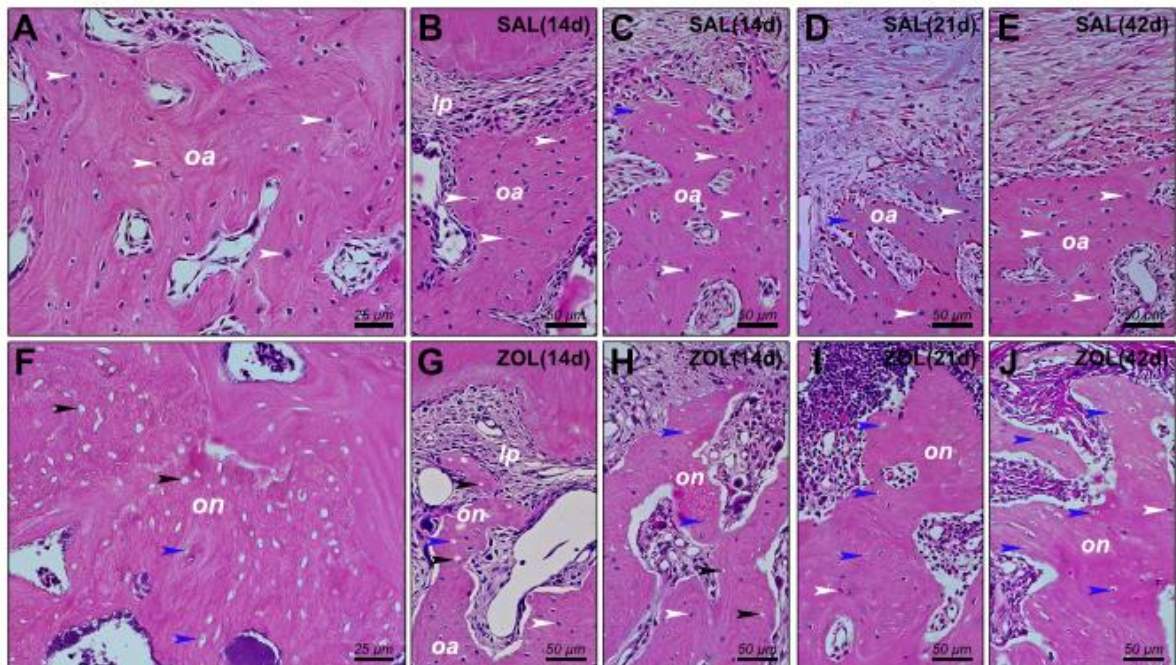
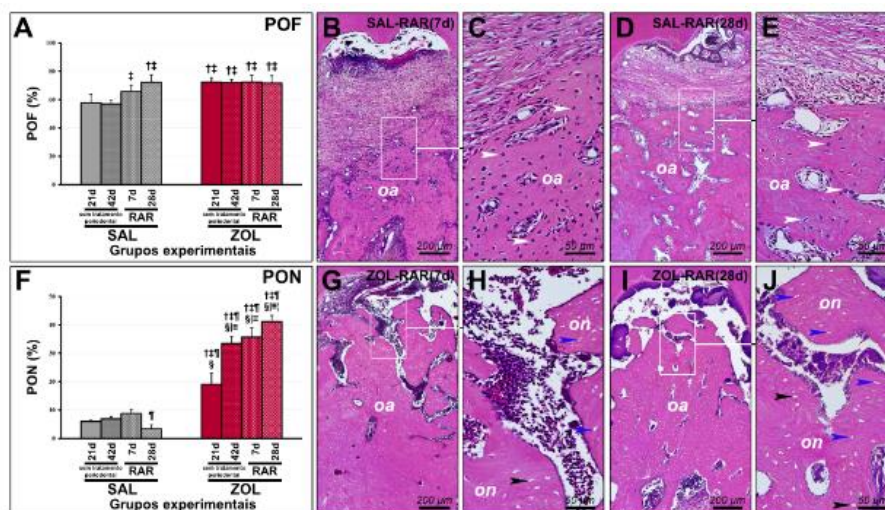


Figura 4: Aspectos histológicos quantitativos e qualitativos da região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais submetidos ou não ao tratamento de raspagem e alisamento radicular. **A e F:** Gráficos apresentando a porcentagem de osso na região de furca, POF (A), e a porcentagem de osso necrótico na região de furca, PON (F) nos grupos SAL e ZOL aos 21 e 42 dias pós instalação da ligadura e nos grupos SAL-RAR e ZOL-RAR aos 7 e 28 dias pós-operatórios. Os grupos SAL-RAR aos 7 dias e aos 28 dias pós-operatórios correspondem aos 21 dias e 42 dias pós instalação da ligadura. **B-E e G-J:** Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico da região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental e tratado com raspagem e alisamento radicular aos 7 (B-C e G-H) e 28 (D-E e I-J) dias pós operatórios nos grupos SAL-RAR (B-E) e ZOL-RAR (G-J). As figuras de C, E, H e J correspondem a ampliação dos quadros observados nos em B, D, G e I, respectivamente. Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar; setas brancas, osteócitos, setas azuis, restos apoptóticos de osteócitos; setas pretas, lacunas vazias; †, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-21d; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-42d; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-RAR-7d; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao SAL-RAR-28d; |, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-21d; ≡, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-42d; !, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-RAR-7d. Coloração: HE. Aumento original: 50x (B, D, G e I); 200x (C, E, H e J). Barras de escala: 200 µm (B, D, G e I); 50 µm (C, E, H e J).



Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais durante a progressão da PE ao longo do tratamento com veículo ou zoledronato.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA						
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES					
	GRUPOS EXPERIMENTAIS					
	SAL			ZOL		
	14d	21d	42d	14d	21d	42d
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL						
(0) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-
(1) pequena quantidade de células inflamatórias	-	-	17	-	-	-
(2) moderada quantidade de células inflamatórias	83	100	83	-	-	-
(3) grande quantidade de células inflamatórias	17	-	-	100	100	100
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO						
(0) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-
(1) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca	-	-	17	-	-	-
(2) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca	83	100	83	-	-	-
(3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca	17	-	-	100	100	100
REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA (CEMENTO E DENTINA)						
(0) ausência	-	-	-	50	50	60
(1) apenas áreas de reabsorção inativas	-	-	-	33	25	40
(2) poucas áreas de reabsorção ativas	50	67	67	17	25	-
(3) muitas áreas de reabsorção ativas	50	33	33	-	-	-
REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR						
(0) dentro dos padrões de normalidade	-	-	-	-	-	-
(1) pequena quantidade de áreas de reabsorção	-	-	-	100	100	100
(2) moderada quantidade de áreas de reabsorção	67	83	100	-	-	-
(3) grande quantidade de áreas de reabsorção	33	17	-	-	-	-
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA						
(0) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso)	-	-	-	-	-	-
(1) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	-	-	-	-
(2) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	83	100	100	-	-	-
(3) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose	17	-	-	100	100	100
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO DA REGIÃO DE FURCA						
(0) trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea	-	-	-	-	-	-
(1) trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos	-	-	-	-	-	-
(2) trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos	100	100	100	-	-	-
(3) muitas áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos	-	-	-	100	100	100

Tabela 2 - Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais sem terapia local ou tratados com RAR ao longo do tratamento com veículo ou zoledronato.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA								
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES							
	GRUPOS EXPERIMENTAIS							
	SAL		SAL-RAR		ZOL		ZOL-RAR	
	21d	42d	7d	28d	21d	42d	7d	28d
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL								
(1) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-
(2) pequena quantidade de células inflamatórias	-	17	83	100	-	-	-	-
(3) moderada quantidade de células inflamatórias	100	83	17	-	-	-	-	-
(4) grande quantidade de células inflamatórias	-	-	-	-	100	100	100	100
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO								
(1) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-
(2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca	-	17	83	100	-	-	-	-
(3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca	100	83	17	-	-	-	-	-
(4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca	-	-	-	-	100	100	100	100
REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA (CEMENTO E DENTINA)								
(1) ausência	-	-	-	-	50	60	44	50
(2) apenas áreas de reabsorção inativas	-	-	50	50	25	40	28	50
(3) poucas áreas de reabsorção ativas	67	67	50	50	25	-	28	-
(4) muitas áreas de reabsorção ativas	33	33	-	-	-	-	-	-
REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR								
(1) dentro dos padrões de normalidade	-	-	-	50	-	-	-	-
(2) pequena quantidade de áreas de reabsorção	-	-	100	50	100	100	100	100
(3) moderada quantidade de áreas de reabsorção	83	100	-	-	-	-	-	-
(4) grande quantidade de áreas de reabsorção	17	-	-	-	-	-	-	-
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA								
(1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso)	-	-	-	33	-	-	-	-
(2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	83	67	-	-	-	-
(3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	100	100	17	-	-	-	-	-
(4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose	-	-	-	-	100	100	100	100
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO DA REGIÃO DE FURCA								
(1) trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea	-	-	-	67	-	-	-	-
(2) trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos	-	-	100	33	-	-	-	-
(3) trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos	100	100	-	-	-	-	-	-
(4) áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos	-	-	-	-	100	100	100	100

Anexos

ANEXO A: NORMAS PARA PUBLICAÇÃO SEGUNDO O PERIÓDICO “JOURNAL OF PERIODONTOLOGY”

Journal of Periodontology Author Instructions

Updated April 2015

This update includes a general reorganization of the author guidelines as well as improved navigation. Other changes include online-only publication, conflict of interest form collection, and updates to clinical trial registration requirements.

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.

The *Journal of Periodontology* accepts manuscript submissions online at [ScholarOne Manuscripts](#). To start a new submission, enter the Author Center and click "Click here to submit a new manuscript." Details regarding each submission step are located at the top of the page in ScholarOne Manuscripts. Authors should prepare manuscripts in accordance with the instructions below. Failure to do so may result in delays or manuscript unsubmission.

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 [General Format](#) and [Style](#). All manuscripts will be reviewed by the Editors for novelty, potential to extend knowledge, and relevance to clinicians and researchers in the field. Some manuscripts will be returned without review, based on the Editors' judgment of the appropriateness of the manuscript for the *Journal of Periodontology*.

ORIGINAL ARTICLES

These are papers that report significant clinical or basic research on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the different forms of periodontal disease. Papers dealing with design, testing, and other features of dental implants are also included.

Format

Original articles must be limited to 4,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

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 with reference to tables, figures, and supplemental material as appropriate.

Discussion

New and possible important findings of the study should be emphasized, as well as any conclusions that can be drawn. The Discussion should compare the present data to previous findings. Limitations of the experimental methods should be indicated, as should implications for future research. New hypotheses and clinical recommendations are appropriate and should be clearly identified. Recommendations, particularly clinical ones, may be included when appropriate.

Publication of Accepted Original Articles

Please note that accepted manuscripts which are classified by the Editors as "Discovery Science" will be placed on an accelerated schedule for **online-only publication**. See [Online-Only Publication](#) below.

REVIEW ARTICLES

These are focused reviews of basic and clinical science related to periodontics and implant dentistry. These reviews should be concise and address an important and timely clinical question. Authors should discuss clinical relevance and the impact on future understanding and practice. The review should be based on a critical assessment of the literature and should use the format and methods of a "systematic review." Detailed descriptions of the systematic review methodology are available in the [Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions](#).¹ There are many excellent published examples of systematic reviews, including "Periodontal Disease and Coronary Heart Disease Incidence: A Systematic Review and Meta-Analysis" by Humphrey et al.²

Authors of systematic reviews that include a meta-analysis should refer to the QUOROM statement.³ Authors of systematic reviews without meta-analysis should refer to the papers by Cook et al.⁴ and Mulrow et al.⁵

1. Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* [serial on the Internet]. September 2008; version 5.0.1. Available at: www.cochrane-handbook.org.

2. Humphrey L, Fu R, Buckley D, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: A systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med* 2008;23:2079-2086.
3. Moher D, Cook D, Eastwood S, Olkin I, Rennie D, Stroup D. Improving the quality of reports of meta-analyses of randomized controlled trials: The QUOROM statement. *Lancet* 1999;354:1896-1900.
4. Cook D, Mulrow C, Haynes R. Systematic reviews: Synthesis of best evidence for clinical decisions. *Ann Intern Med* 1997;126:376-380.
5. Mulrow C, Langhorne P, Grimshaw J. Integrating heterogeneous pieces of evidence in systematic reviews. *Ann Intern Med* 1997;127:989-995.

Format

The abstract should summarize the main conclusions of the review in 350 words or less. Systematic review articles should: define a clear and clinically relevant research question; retrieve and describe the limitations of previously published reviews on this topic; and justify the need for a systematic review. The review should then define the search strategy used to identify primary articles; describe the methods used to select primary studies; specify inclusion and exclusion criteria (criteria for selecting primary studies should be based on population studied, intervention or exposure, study outcomes, and study methodology); perform a blinded assessment of the quality of the selected articles; describe the reliability of this process in terms of agreement between two evaluators; account for all studies identified by the search and justify exclusions; state their conclusions; compare their conclusions to the literature and current standard of care; outline the limitations of the review; and suggest areas for future research.

Papers should be balanced, literature-based reviews that are concise (2,000 to 3,000 words) with about 100 key references. Tables and figures should be limited to those essential to convey the results of the review, and the total combined number of figures and tables should not exceed six. Since critical reviews require selection of reports and interpretation of data, authors should disclose financial interest in the companies making products or providing services described in the review.

COMMENTARIES

The purpose of these papers is to provide a forum for discussion of controversies and other issues as they relate to the practice of periodontics and implant dentistry. Full and balanced discussion of controversies on important issues is encouraged. This may result in several authors each presenting a relevant viewpoint. Commentaries should be concise (2,000 to 3,000 words) with no more than 50 references; however, they should be complete and balanced, which may require that the issue or controversy addressed be highly focused.

Introduction

This section should clearly state the clinical question or issues to be discussed and document their importance and timeliness.

Body

The body should present the information supporting all aspects of the issues. This portion of the Commentary may be subdivided as appropriate with headings. Figures, tables, and other illustrative materials may be incorporated. The total combined number of figures and tables should not exceed six.

Summary

The summary should place the issue in perspective and point a way for future directions in addressing the controversy.

Acknowledgment(s)

Since these papers allow authors to express their opinions on a subject, it is extremely important that authors disclose any and all affiliations, financial position, or any other information that constitutes a real or perceived conflict of interest.

CASE SERIES

The *Journal of Periodontology* no longer publishes Case Reports. Authors are encouraged to submit Case Reports to *Clinical Advances in Periodontics*. The *Journal of Periodontology* publishes selected Case Series that describe unusual case presentations, complex diagnoses, and novel approaches to treatment within the scope of practice of periodontology. These Case Series provide valuable information for clinicians and teachers in the field.

Case Series report a sufficient number of consecutive or randomized cases to make a persuasive argument for or against the procedure, technique, or concept under discussion. Cases should be relatively homogeneous so that a systematic evaluation of one type of disease, lesion, or condition is made for the procedure under consideration. Also, treatment and documentation should be consistent and standardized for all cases. It is recognized that definitive evidence for the safety and efficacy of any procedure, drug, or device comes primarily from well-designed, randomized, controlled trials. However, well-executed Case Series may lead to hypotheses about the usefulness of new and innovative procedures, drugs, or devices and may therefore be of value to the progress of clinical science.

The requirements for patient consent, privacy, and institutional approval are well defined for manuscripts describing research on human subjects. These basic requirements are described by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) in their Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (available at: www.icmje.org) and are interpreted in the instructions to authors of all peer-reviewed biomedical journals, including the *Journal of Periodontology*.

Due to the changing ethical and legal environment around the use of patient information, the editorial team has received multiple questions about the need for subject consent from patients described in Case Series submitted for publication.

The following applies to most Case Series. It should be noted that the Editors will determine whether specific Case Series require additional approvals beyond what is described below.

Requirement for Ethics Board Approval

Most Case Series are a retrospective description of clinical findings in cases or an observed course of events that document a new aspect of patient management during the normal course of clinical treatment. Since there is no hypothesis testing, no systematic data collection beyond that which is part of routine clinical practice, no data analysis, and the work has already been done, Case Series do not usually qualify as "research" requiring approval from ethical boards designed to protect humans involved in clinical research.

(U.S. Fed. definition: "RESEARCH is any systematic investigation, including research development, testing and evaluation, designed to develop or contribute to generalizable knowledge.")

Example 1: Series of private practice implant cases in patients who have been taking bisphosphonates. Authors describe the findings in each case, which are collected and reported in a table format.

Example 2: Authors collect series of private practice implant cases in patients who have or have not been taking bisphosphonates. The sample size is sufficient for data analysis, and authors analyze and report the incidence of complications.

Example 1 does not qualify as "research," but example 2 does qualify and requires ethical approval.

Please see "[Does My Case Series Need IRB Approval?](#)" for more information.

Privacy in Case Series

No patient identifiers should be included in Case Series. If the authors choose to include any subject identifiers, the authors must include the patient's informed written consent to publish the information.

Our policy conforms to the Uniform Requirements, which states: "Patients have a right to privacy that should not be violated without informed consent. Identifying information, including names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, or pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that an identifiable patient be shown the manuscript to be published. Authors should disclose to these patients whether any potential identifiable material might be available via the Internet as well as in print after publication."

It should be noted that patients may have given a signed "consent to treat," but that does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript. Likewise, patient consent under government privacy rules, such as the Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA) in the United States, does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript.

Format

Case Series must be limited to 2,000 to 3,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

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

- Background: Describes the clinical situation being discussed.
- Methods: Describes the clinical procedures (surgical and non-surgical) performed.
- Results: Describes the clinical results.
- Conclusion(s): Reports what authors have concluded, specifically clinical implications in practice situations.

Introduction

This section should include a critical review of the pertinent literature.

Case Description and Results

This section describes the cases, including all relevant data. For ease of presentation, tables describing longitudinal data in a chronological form may be useful. Carefully selected, high-quality clinical photographs in full color, as well as radiographs, are encouraged.

Discussion

This should include findings, put into perspective with respect to the field and literature. Unique arguments and new information gained should be summarized. Consideration of the clinical significance of the cases should be emphasized in all sections.

GUEST EDITORIALS

Guest Editorials may be invited or may be submitted from authorities in certain areas as a means of offering their perspective on one or more articles published in the *Journal*, or on other items of interest to the readership.

LETTERS TO THE EDITOR

Letters may comment on articles published in the *Journal* and should offer constructive criticism. If a letter comments on a published article, the author(s) will be provided 30 days to respond to the observations.

Letters to the Editor may also address any aspect of the profession, including education and training, new modes of practice, and concepts of disease and its management.

Letters should be brief (<1,000 words), focused on one or a few specific points or concerns, and can be signed by no more than five individuals.

Citations should be handled as standard references.

GENERAL FORMAT

Manuscripts must be submitted in Microsoft Word. Margins should be at least 1" on both sides and top and bottom and all text should be double-spaced. Materials should appear in the following order:

- Title Page
- Abstract (or Introduction) and Key Words
- Text
- Footnotes
- Acknowledgment(s)
- References
- Figure Legends
- Tables

Figures should not be embedded in the manuscript. Please see the *Journal of Periodontology Digital Art Guidelines* for more information on submitting figures.

Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

TITLE PAGE

The title page should contain:

1. a concise but informative title;
2. first name, middle initial, and last name of each author, with the highest academic degree and the current institutional affiliation, including department, for each (please use footnote symbols in the sequence *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, etc. to identify authors and their corresponding institutions);
3. disclaimers, if any;
4. the name and address (including fax number and e-mail) of the author responsible for correspondence (please indicate whether fax number and e-mail can be published);
5. word count and number of figures, tables, and references in the manuscript;
6. a short running title of no more than 60 characters, including spaces;
7. a one-sentence summary describing the key finding(s) from the study.

KEY WORDS

A maximum of six key words or short phrases, drawn from [MeSH documentation](#), to facilitate indexing should be listed below the abstract.

ACKNOWLEDGMENT(S) AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgment(s)

Following the Discussion, acknowledgments may be made to individuals who contributed

to the research or the manuscript preparation at a level that did not qualify for authorship. This may include technical help or participation in a clinical study. Authors are responsible for obtaining written permission from persons listed by name. Acknowledgments must also include a statement that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author.

Conflicts of Interest

In the interest of transparency and to allow readers to form their own assessment of potential biases that may have influenced the results of research studies, the *Journal of Periodontology* requires that all authors declare potential competing interests relating to papers accepted for publication. Conflicts of interest are defined as those influences that may potentially undermine the objectivity or integrity of the research, or create a perceived conflict of interest.

Authors are required to submit:

1. A statement in the acknowledgments section of the manuscript that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author. If an author has no commercial relationships to declare, a statement to that effect should be included. This statement should include financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include financial support for research (salaries, equipment, supplies, travel reimbursement); employment or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper; and personal financial interests such as shares in or ownership of companies affected by publication of the research, patents or patent applications whose value may be affected by this publication, and consulting fees or royalties from organizations which may profit or lose as a result of publication. An example is shown below.
2. A conflict of interest and financial disclosure form for each author. A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission.

Conflict of interest information will not be used as a basis for suitability of the manuscript for publication.

Example of Conflict of Interest Statement

This study was supported by a grant from the Acme Implant Corporation, Seoul, Korea. Dr. Lee is on the scientific advisory board for Acme Implant Corporation and gives lectures sponsored by the company. Dr. Smith is a consultant and shareholder of the Brownstone Implant Corporation, Boston, Massachusetts. Dr. Wang is employed full-time as chief technical officer of the Acme Implant Corporation. Drs. Able, Kim, and Bruce report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. A journal, magazine, or newspaper article should be given only one number; a book should be given a different number each time it is mentioned, if different page numbers are cited.

All references are identified, whether they appear in the text, tables, or legends, by Arabic numbers in superscript. Journal title abbreviations should be those used by the U.S. National Library of Medicine. If you are uncertain about the correct abbreviation for a journal title, please search for the journal at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>.

The use of abstracts as references is strongly discouraged. Manuscripts accepted for publication may be cited and should include the manuscript's DOI, if known. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as "unpublished observations."

Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references. Please provide the date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual and his/her affiliation. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the *Journal of Periodontology's* preferred reference style.

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, et al. Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res* 2008;87:51-55.
2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report no. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.
3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.
4. Non-English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of peri-implant disease (in German). *Z Zahnärztl Implantol* 1996;12:152-157.

Books and Other Monographs

5. Personal author(s). Tullman JJ, Redding SW. *Systemic Disease in Dental Treatment*. St. Louis: The CV Mosby Company; 1983:1-5.
6. Chapter in a book. Rees TD. Dental management of the medically compromised patient. In: McDonald RE, Hurt WC, Gilmore HW, Middleton RA, eds. *Current Therapy in Dentistry*, vol. 7. St. Louis: The CV Mosby Company; 1980:3-7.
7. Agency publication. Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Loë H. Oral Health of United States Adults. Bethesda, MD: National Institute of Dental Research; 1987. NIH publication no. 87-2868.
8. Dissertation or thesis. Teerakapong A. Langerhans' cells in human periodontally healthy and diseased gingiva. [Thesis]. Houston, TX: University of Texas; 1987. 92 p.

Electronic Citations

Note: DOIs are preferred for journal articles. If a DOI is not available, please provide a URL and access date.

9. Online-only article. Rasperini G, Acunzo R, Limioli E. Decision making in gingival recession treatment: Scientific evidence and clinical experience. *Clin Adv Periodontics* 2011;1:41-52. doi:10.1902/cap.2011.100002.
10. Ahead of print. McGuire MK, Scheyer ET, Nevins M, et al. Living cellular construct for increasing the width of keratinized gingiva. Results from a randomized, within-patient, controlled trial [published online ahead of print March 29, 2011]. *J Periodontol*; doi:10.1902/jop.2011.100671.
11. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Periodontal Disease. Available at: http://www.cdc.gov/OralHealth/topics/periodontal_disease.htm. Accessed September 29, 2010.

TABLES

Tables should be numbered consecutively in Arabic numbers in the order of their appearance in the text. A brief descriptive title should be supplied for each. Explanations, including abbreviations, should be listed as footnotes, not in the heading. Every column should have a heading. Statistical measures of variations such as standard deviation or standard error of the mean should be included as appropriate in the footnotes. Do not use internal horizontal or vertical rules. The submission system will easily read tables created with Word's table utility or when inserted into Word from Excel.

FIGURES

Please see the *Journal of Periodontology* [Digital Art Guidelines](#) for detailed instructions on submitting high-quality images.

Figure Legends

Legends should be typed double-spaced with Arabic numbers corresponding to the figure. When arrows, symbols, numbers, or letters are used, explain each clearly in the legend; also explain internal scale, original magnification, and method of staining as appropriate. Panel labels should be in capital letters. Legends should not appear on the same page as the actual figures.

FOOTNOTES

Footnotes should be used only to identify author affiliations; to explain symbols in tables and illustrations; and to identify manufacturers of equipment, medications, materials, and devices. Use the following symbols in the sequence shown: *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, ††, etc.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The *Journal of Periodontology* includes supplementary material in the online Journal (www.joponline.org). All supplemental material should be called out in the text.

Supplementary Figures and Tables

Journal of Periodontology articles are limited to a combined total of six figures and tables in the print publication. Any additional figures and tables should be submitted as supplementary files. Each supplementary figure or table should be submitted as a separate file. Please follow the guidelines regarding resolution, format, etc. for printed figures (see [Digital Art Guidelines](#)) and tables (see above) when preparing supplementary figures and tables. In summary, each figure, table, or multimedia file should be uploaded separately and the file names should clearly identify the file (i.e., SupplementaryFigure1.tif, SupplementaryTable1.xls, etc.). If file size limitations prevent you from uploading your supplemental material, please e-mail jerry@perio.org.

Supplementary Videos

The *Journal of Periodontology* publishes short videos to supplement a paper when appropriate. Most standard video formats are accepted. Videos should be edited to remove extraneous material. Authors should adhere to OSHA regulations when preparing their videos. Please e-mail bethanne@perio.org for information on how to submit videos. If your video is accepted for publication, all authors will need to submit a video copyright form. This form can be found on [ScholarOne Manuscripts](#) in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms."

STYLE

Please follow the guidelines below when preparing a manuscript:

- Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- Do not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, e.g., or i.e.
- Use a block style; do not tabulate or indent material.
- Refer to the newest edition of the Glossary of Periodontal Terms published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.
- Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the Annals of Periodontology, volume 4 (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).
- Create equations as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.
- Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal/National) numbering system.
- Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

AUTHORSHIP

Individuals identified as authors must meet all of the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition, analysis, or interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published; and 4) agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Once the *Journal* has received a manuscript, any changes in authorship must be faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Jerry Eberle, Editorial Specialist) or e-mailed to jerry@perio.org and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (see below).

Conflict of Interest and Financial Disclosure Forms

A conflict of interest and financial disclosure form must be submitted by each author. A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission. Due to this, **all authors are required to have accounts with valid e-mail addresses in ScholarOne Manuscripts** and be listed as authors for the submitted paper. Submitting authors are able to create accounts for co-authors.

CLINICAL TRIALS

If your manuscript is reporting a randomized clinical trial, you are required to submit a CONSORT checklist with your manuscript. More information can be found at www.consort-statement.org.

All clinical trials must be registered prior to submission to the *Journal of Periodontology* at one of the registration sites listed below. The registration number and date of registration should be included in the Materials and Methods section. **Starting January 1, 2016, all clinical trials must be registered prior to initiation (i.e., recruitment) of the trial.** Please see <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/about-studies/learn#WhatIs> for more information regarding clinical trials.

- U.S. National Institutes of Health Clinical Trials Registry - <http://www.clinicaltrials.gov>
- EU Clinical Trials Register - <https://www.clinicaltrialsregister.eu>
- WHO International Clinical Trials Registry Platform - <http://www.who.int/ictrp/en>

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

All manuscripts reporting the use of human subjects must include a statement that the protocol was approved by the author's institutional review committee for human subjects **AND** that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2013. Do not use any designation in tables, figures, or photographs that would identify a patient, unless written consent from the patient is submitted.

For research involving the use of animals, it is necessary to indicate that the protocol was approved by the author's institutional experimentation committee or was in accordance with guidelines approved by the Council of the American Psychological Society (1980) for the use of animal experiments.

PRODUCT IDENTIFICATION

Use of brand names within the title or text is not acceptable, unless essential when the paper is comparing two or more products. When identification of a product is needed or helpful to explain the procedure or trial being discussed, a generic term should be used and the brand name, manufacturer, and location (city/state/country) cited as a footnote.

REVISED MANUSCRIPTS

Revised manuscripts should be submitted online at ScholarOne Manuscripts by the same author who submitted the original manuscript. Authors have 30 days to submit a revision. Revisions should adhere to the same requirements as original submissions. Additionally:

1. A detailed response to each reviewer comment for the original manuscript should be included. This response should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews.
2. Only the most recent version of each file should be uploaded. You may have to delete older files from the Author Center.
3. **Please upload a version of the manuscript with changes highlighted or track changes enabled. This should be uploaded as a supplemental file.**
4. Figures and tables should be resubmitted with revised manuscripts, even if they were not revised.

REVIEW PROCESS

Peer Review

The *Journal of Periodontology* is a peer-reviewed publication. All manuscripts, including

Reviews, Commentaries, and Case Series are submitted to a minimum of two reviewers and, when appropriate, to a statistical reviewer. Authors are given reviewer comments and additional information or observations as the Editor believes would be helpful. Revised manuscripts are due within 30 days of receipt of the Editor's communication.

Checking the Status of a Manuscript

During the peer-review process, the current status of a manuscript can be found in the Author Center (click "Submitted Manuscripts" or "Manuscripts I Have Co-Authored"). Once a decision has been made, all authors are notified by e-mail. No hard copy letters will be mailed.

MANUSCRIPT ACCEPTANCE

All manuscripts accepted for publication become the property of the American Academy of Periodontology. All authors are required to sign a copyright form. An e-mail with a link to this electronic form will be sent to all authors upon acceptance.

Once all forms are received by the editorial office, an unedited version of the accepted manuscript will appear online ahead of print at <http://www.joponline.org/toc/jop/0/0>. Once a manuscript is online ahead of print, it is fully citable based on the Digital Object Identifier (DOI) assigned to the manuscript. Manuscripts will be copyedited, published online, and printed (unless online-only) in an issue of the *Journal* approximately 4 to 5 months after acceptance. Authors will be notified about a final publication date by the Editorial Office.

Reprints

Corresponding authors may purchase reprints at the time pages are received for proofreading. Reprints can be purchased in 4-color or black and white. Electronic reprints are also available.

Online-Only Publication

Accepted manuscripts that are classified by the Editors as "Discovery Science" will be placed on an accelerated schedule for online-only publication. They will be assigned to an issue, copyedited, and published in the online *Journal*. Online-only manuscripts will be listed in the printed table of contents of the assigned issue but will not appear in the printed issue. Manuscripts are classified as "Discovery Science" if: a) the study is conducted in isolated cells or tissues to explore mechanisms relative to periodontitis/periodontal tissues; or b) the research is not within one step of clinical application.

Funding Agency Requirements

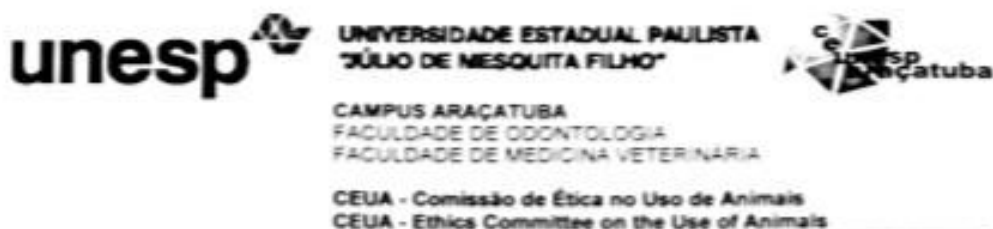
Consistent with current policies, authors who have papers based on funded research accepted for publication in the *Journal of Periodontology* may make their final accepted paper or published article available to agency depositories. However, authors should indicate that the paper may not be released publicly until 12 months following final publication in an issue.

Authors are responsible for complying with all funding agency requirements.

QUESTIONS

Inquiries regarding current submissions should be sent to: Editorial Specialist, Journal of Periodontology, 737 North Michigan Avenue, Suite 800, Chicago, IL 60611-6660. Telephone: 312/573-3255; e-mail: jerry@perio.org.

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



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Periodontite experimental em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato: análise da progressão da doença e avaliação da resposta periodontal ao tratamento mecânico convencional", Processo FOA nº 00623-2015, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 09 de Dezembro de 2015.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 31 de Outubro de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Novembro de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Experimental periodontitis in rats treated with oncology dose of zoledronate: disease progression analysis and evaluation of periodontal tissue response due to conventional mechanical treatment", Protocol FOA nº 00623-2015, under the supervision of Juliano Milanezi de Almeida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 09, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 31, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 30, 2017.



Profa. Adj. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@fos.unesp.br