



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

**JOÃO MARTINS DE MELLO NETO**

**PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM  
RATAS DIABÉTICAS SUBMETIDAS AO TRATAMENTO  
COM DOSE ONCOLÓGICA DE ZOLEDRONATO**

**ARAÇATUBA-SP**

**2018**

**JOÃO MARTINS DE MELLO NETO**

**PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM  
RATAS DIABÉTICAS SUBMETIDAS AO TRATAMENTO  
COM DOSE ONCOLÓGICA DE ZOLEDRONATO**

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  
Coorientadora: Profa. Dra. Adj. Letícia Helena Theodoro

**ARAÇATUBA-SP**

**2018**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M527p Mello Neto, João Martins de.  
Progressão da periodontite experimental em ratas diabéticas submetidas ao tratamento com dose oncológica de zoledronato / João Martins de Mello Neto. – Araçatuba, 2018  
100 f. : 6il.; 1tab.

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

Orientador: Prof. Edilson Ervolino

Coorientadora: Profa. Leticia Helena Theodoro

1. Difosfonatos 2. Osteonecrose 3. Periodontite crônica  
4. Progressão da doença 5. *Diabetes mellitus* I. T.

Black D6  
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto  
CRB-8/5550

# Dados Curriculares

*João Martins de Mello Neto*

*Nascimento: 15.03.1993. Cachoeira Paulista - SP*

*Filiação: Lucimara de Jesus Veiga*

*Albertino Martins de Melo*

*2011- 2015: Curso de Graduação em Odontologia*

*Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba*

*Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”*

*- UNESP*

*Dedicatória*

*A Deus*

*Por me amparar em todos os momentos difíceis e me guiar pelo caminho da verdade, nunca me aconselhando coisas vãs e abençoando cada dia da minha vida...*

*A minha mãe Lucimara*

*Por ser minha luz e referência de mulher. Obrigado por me ensinar o verdadeiro sentido da palavra humildade e amor. Obrigado também pelo seu carinho especial e dedicação, você é meu maior motivo de querer ser cada dia melhor, eu te amo mais que tudo! Esta vitória também é sua mãe!*

*Ao meu irmão e irmã*

*Matheus e Mariane, vocês são presentes de Deus. Obrigado por simplesmente existirem e dividir comigo tantos momentos. Obrigado por ser conforto para o que me amedronta tanto, a passagem do tempo. Ainda viveremos muitas coisas especiais juntos e me encho*

*de alegria e coragem quando lembro que vocês estarão sempre ao meu lado. Onde quer que estejam sempre contem com meu carinho e ombro amigo, vibrarei como se fossem minhas todas as vitórias de vocês dois.*

*À minha Avó Angelina*

*Obrigado por ser esta avó tao especial, um anjo que Deus me deu para me guiar. Sempre que tenho algum momento difícil é na senhora que penso para continuar. Obrigado por este amor sem tamanho, pelo carinho e orações. Muito do seu amor eu carrego sempre comigo vó querida! Amo você mais que tudo.*

*À meu Pai Albertino*

*Obrigado por ser meu exemplo de trabalho duro e por ter me apoiado chegar até aqui. Amo você!*

*À meu amor*

*Letícia, obrigado por ser minha amiga e companheira de todos os momentos, me escutar quando eu precisava e me apoiar quando as*

*vezes até eu duvida de mim. Sonha que se sonha junto é um começo de realidade e com certeza e este é só mais uma das muitas conquistas que ainda viveremos juntos. Obrigado por me apoiar em todas minhas decisões e sonhar junto comigo! Desculpe-me pela ausência em alguns momentos e falta de paciência em tantos outros. Dedico mais esta vitória a você. Obrigado meu amor!*



*Agradecimentos*

*Especiais*

## *Aos meus professores...*

*Ao meu orientador Prof. **Edilson Ervolino**, que desde o início da minha graduação me recebeu e acolheu. Obrigado por ter me ajudado e construído todos estes momentos de alegria comigo. Lembro-me com muito carinho da nossa primeira bolsa de Iniciação Científica juntos e da alegria com que comemoramos! Dos nossos relatórios, desesperos para apresentações, noites ansiosas e o senhor sempre disposto a fazer o melhor por mim. Obrigado pela sua dedicação, paciência e disponibilidade. Ser orientado de uma pessoa como o senhor foi uma grande honra e junto com ela um grande desafio. Com sua mania de deixar tudo o mais perfeito possível me mostrou que na vida tudo deve ser feito com muito capricho. Obrigado por ser esta pessoa sempre empenhada em fazer o melhor para meu aprendizado. Sou imensamente grato por todo seu carinho e dedicação e por apesar de tantos compromissos, dedicar grande parte do seu tempo para me ensinar e ajudar. Obrigado por me ouvir todas as vezes que eu precisei e ser um grande amigo. Eu tive a honra de ser orientado por um professor tão especial quanto você, seus ensinamentos vão ficar marcados para sempre no meu coração, querido mestre, mestre não Doutor! Um grande exemplo*

*de professor, orientador, amigo e pessoa. Direi sempre com muito orgulho por aí que sou seu orientado.*

*A minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> **Letícia Helena Theodoro**, saiba que a senhora foi muito mais que uma coorientadora, foi uma verdadeira orientadora e amiga. Desde o início da minha graduação ouvi falar muito da senhora, mas com a convivência de perto pude enxergar que a senhora vai muito além de tudo que ouvi. Você é o meu grande exemplo de competência! Seu exemplo de professora e dedicação ímpar me motivam a continuar nesta caminhada. Talvez tudo que eu escreva ou diga para senhora 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 mais do que apenas trilhar, acreditar no meu caminho. Mesmo quando estava ausente a senhora foi presente para mim. Agradeço pelas clínicas de extensão onde compartilhamos bons momentos, com todo carinho e paciência a senhora me fez te admirar cada dia mais. Muito obrigado por acreditar em mim e me ajudar a realizar este sonho. Me ouvir, aconselhar, ensinar e sorrir comigo! É muito bonito ver a forma como a senhora conduz seus alunos e poder estar por perto para assirtir o quão competente a senhora é foi uma honra. Sempre que perguntava alguma coisa a senhora dificilmente me*

*dava uma resposta, me dava um artigo. Obrigado por construir em mim esta vontade de buscar sempre com muito critério científico. Minha eterna gratidão, admiração e respeito por você professora.*

*Ao meu professor **Valdir Gouveia Garcia**, aquele professor de corpo e alma! Costumo dizer que nunca sentei para um conversa com o senhor e não aprendi alguma coisa. Com sua humildade o senhor me ensinou que de tudo que a pós-graduação tem a oferecer as amizades são na verdade o que levaremos. Tenho muito orgulho de poder estar perto do senhor e aprender um pouco do mundo que o senhor tem para ensinar. Você é uma pessoa inspiradora e se um dia conseguir ser metade de tudo aquilo que o senhor é para mim pode ter certeza que estarei realizado. Obrigado por me orientar, pelas palavras, pelo respeito e amizade. Tenha certeza que carrego no meu coração muito carinho e gratidão pelo senhor. Meu muito obrigado por ser esta pessoa incrível, da qual contarei com muito orgulho que esteve ao meu lado.*

*Ao meu professor e amigo Prof. **Juliano Milanezi de Almeida**, obrigado por ser esta pessoa de portas sempre abertas para mim. Por me trazer para perto de você e me chamar de um dos seus. O senhor é um grande exemplo de como ser um verdadeiro periodontista. Sempre criterioso e empenhado em fazer o melhor pelos seus alunos e pacientes.*

*Queria agradecer-lo por me permitir estar perto de uma pessoa como o senhor. Tenho muita admiração por você e poder estar por perto para aplaudi-lo foi uma grande honra para mim. Obrigado pelas conversas, pelas brincadeiras e principalmente pelos conselhos, guardo todas suas palavras com muito carinho. Toda vez que sento na cadeira e visto minhas luvas é do senhor que me lembro e me encho de alegria. Obrigada por ser o amigo das horas mais difíceis e estar ao meu lado nos momentos de vitórias e alegrias. O senhor é um daqueles professores que quero sempre por perto, contribuindo para minha formação, puxando minha orelha, rindo comigo e participando das etapas mais importantes da minha vida.*

*À minha Professora querida **Maria José Hitomi Nagata**, quem iniciou meu caminho na periodontia, como orientadora nas clínicas de perio do meu terceiro ano da faculdade. Ensinou-me a respeitar minha profissão e todos os pacientes em que toco sempre com muito critério e rigor científico. Costumo dizer que você me ensinou muito mais que periodontia, conversar com a senhora e assisti-la conduzir seus alunos me inspiram a trilhar os caminhos da vida acadêmica. A senhora é um grande exemplo de dedicação e cuidado, sempre extremamente gentil, educada e de portas abertas para mim. Obrigado pelas suas palavras de conforto e por acreditar em mim algumas vezes mais que a mim mesmo.*

*Obrigado por acreditar mais em pessoas do que em nomes e estar sempre tão disposta a encorajar e ensinar os alunos da pós-graduação. Quando entrei na pós-graduação, tive o prazer de conhecer melhor a senhora e minha admiração só aumentaram a cada dia. A senhora é um exemplo a ser seguido, uma luz no mundo que muito tem para ensinar. Agradeço a Deus todos os dias por colocar pessoas da grandeza da senhora em meu caminho e me permitir estar perto de pessoas como você. Guardo suas palavras e o cuidado em meu coração e minha admiração por você são eternas. Muito obrigado por me mostrar o quão bonito é assistir a professora Maria José ensinando!*

*Ao meu professor **Álvaro Francisco Bosco**, que com seu bom humor e ao mesmo tempo seriedade me ensinou com paciência como ser um periodontista de verdade. Sempre ouvi falar de sua humildade e competência, mas poder assisti-lo de perto e vibrar com suas cirurgias aumentam em mim vontade e coragem de ser melhor a cada dia. Obrigado por nos ensinar o verdadeiro sentido da palavra humildade, foi uma honra poder te-lo por perto.*

*À Professora **Roberta Okamoto, Mariza Akemi e Roberto Botacin** meu muito obrigado pelas risadas, tive o prazer de conviver bons momentos com vocês três. Muito obrigada por todo carinho que tem por*

*mim, por torcerem pelo meu sucesso, por estarem presentes em momentos tão importantes na minha vida, pela companhia agradável no departamento e almoços divertidos na Dora. Eu admiro muito vocês!*

### *Aos meus queridos amigos...*

*A meu grande amigo e irmão que a faculdade me deu **Luan Toro**, que honra ter você na minha vida, quantas histórias, momentos difíceis e conquistas tivemos juntos! Você me mostrou tantas coisas boas, e dividimos tantas histórias e vitórias que levarei você para sempre comigo com muito carinho. Quantas vezes desabafamos um com o outro e seguramos a barra sempre um ao lado do outro, quando um tidubiava o outro estava ali para dizer “Calma, estamos juntos como sempre e vai dar certo!”. Obrigado por todas as risadas e momentos de alegria, pelo apoio que vai muito além de nossas pesquisas juntos. Agradeço por se disponibilizar em todas etapas do nosso trabalho. Eu sei que sempre posso contar com você, meu amigo, e saiba que também estarei aqui para o que precisar. Sempre estarei torcendo pelo seu sucesso e estarei te aplaudindo de pé, vibrando muito forte com todos as suas conquistas como se fossem minhas. Você muito mais que um aluno nota 10 é um*

*amigo que vale ouro. Guardo sua amizade com muita honra e muito obrigado por ser quem você é para mim.*

*Ao meu grande amigo **David Gusman**, não tenho palavras para agradecê-lo por tudo que passamos nestes 2 anos juntos. Foram momentos de alegria, de luta, de noites sem dormir e com certeza de muitas risadas. Sempre com muito bom humor estávamos ali um pelo outro. Queria agradecer pela sua amizade sincera, por sempre me estender a mão quando precisei e cada gesto de irmão. Saiba que torço muito pelo seu sucesso e espero poder sempre ouvir boas notícias do meu amigo Dr. Gusman. Conte sempre comigo meu amigo, para bons e maus momentos estarei sempre de portas abertas para você onde quer que esteja. Guardo sua amizade com muito carinho.*

*Ao meu amigo **Breno Edson**, aquele irmão que a pós-graduação me deu. Agradeço por ser esse amigo sincero, de um coração enorme e muita competência. Gostaria de agradecê-lo pelo convívio sempre agradável, por me aconselhar quando precisei, pelas risadas que demos juntos e pela torcida sempre. Você é um grande homem e um exemplo para mim poder ter certeza. Vivemos grandes momentos juntos e obrigado por me permitir tê-lo por perto. Você é um daqueles amigos que espero ter na minha vida sempre. Conte sempre comigo meu amigo, estarei sempre torcendo por*



*você e de portas abertas para darmos boas risadas juntos e comemorarmos juntos as conquistas um dos outros.*

*A minha amiga **Nathalia Januário**, Mis, quem diria que nossa amizade fosse se transformar em tudo que se tornou. Você é muito mais que uma amiga de pós-graduação você é um presente. Tenho muita alegria em poder chama-la de minha amiga. Você é um grande exemplo de vida para mim, por toda sua luta e modo de ver a vida. Sempre me identifiquei muito com sua história de luta e superação e pessoas como você merecem chegar muito longe. Nunca se esqueça de quem você é e não deixe nada nem ninguém mudar aquilo que você tem de melhor, sua humildade. Só Deus sabe tudo que passamos para conseguir chegar até aqui e com certeza sem o apoio e ombro amigo um do outro a caminhada seria muito mais dura. Só tenho que te agradecer pelas risadas, pelas brincadeiras, pelos almoços, jantares, cafés da tarde que o David desaparecia, mensagens de conforto e saídas fora de hora. Sempre estarei torcendo pelo seu sucesso, pois sei que você é uma menina de ouro que ainda vai longe. Queria pedir desculpa se algum momento fui duro demais com você, mas é que sempre espero seu melhor. Conte sempre comigo mis, sua amizade fica guardada para sempre.*

*A minha amiga **Daniela de Sá**, obrigado por ser minha parceira nesta caminhada, sem sua ajuda, tudo seria mais difícil. Obrigado por sempre estar disposta a me ajudar e aconselhar. Quantas lâminas, quantos bloquinhos, quanto trabalho e você se disponibilizando sempre a me ajudar em tudo, obrigada por ser esta amiga tão especial, que torce por mim e vibra com minhas vitórias. Você esteve presente em grandes momentos, 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. Obrigado por ser esta menina dedicada, de coragem e muita fé. Você muito me ensina todos os dias e obrigado por me permitir ser seu parceiro em tantos momentos importantes da sua vida. Estarei sempre torcendo pelo seu sucesso e tenho certeza que você ainda vai muito longe!*

*À **família ZOL**, meus queridos: Luan, Daniela, Letícia, Fernanda, Thamires, Luy, Tiago, Jéssica Freire e Jéssica Santana, 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 imunossupressões, e tantos outros momentos. Vocês são realmente uma família para mim. Obrigada por todo apoio e estarei sempre torcendo pelo*

*sucesso de vocês. Quando precisarem saibam que sempre estarei de braços abertos para rirmos e dividirmos histórias juntos.*

*Aos amigos da periodontia,*

*Fred, obrigado por ser esse cara tão especial e de caracter que você é. Tenho uma grande admiração pela sua pessoa e talvez nunca tenha dito, mas me espelho muito em você. Obrigado por me ensinar o importante balanço entre maturidade, respeito, bom humor e dividir momentos tao importantes da sua vida comigo. Tenho muita alegria de ter formado com você e poder assisti-lo conquistar tantas coisas boas. Torço muito por você meu amigo e espero um dia poder ve-lo conquistando tudo que almeija. Você é grande Fred!*

*Nati Campos, obrigada por desde a graduação durante o terceiro ano me ajudar nas clínicas de periodontia. Nunca imaginei que aquela aluna da pós iria se tornar esta amiga tão especial que você se tornou para mim. Gostaria de agradecê-la pelas palavras amigas, por me ouvir quando precisei e me aconselhar sempre com muito cuidado. Você é um dos motivos de ter escolhido a periodontia para seguir e uma grande pessoa. Obrigado por dividir comigo suas vitórias e me apoiar em todas minhas aventuras.*

**Marta Nuernberg**, muito obrigado por ser esta pessoa de alegria contagiante e muita bondade no coração. Por me ajudar nos momentos que precisei e torcer pelo meu sucesso. Tivemos muitos momentos de alegria e desabafos juntos e todos guardarei com muito carinho. Você é uma menina de ouro e vai muito longe. Sempre estarei torcendo por ti guria.

**Marina**, muito obrigado por ser esta pessoa encantadora que você é, sempre disposta a me ajudar e dividir comigo suas vitórias. Você é um exemplo de aluna e sempre extremamente competente em tudo aquilo que faz. Tenho certeza que vc vai muito longe e espero sempre poder estar por perto para assistir seu sucesso.

**Daniela**, obrigado pela sua amizade especial comigo, pela ajuda nos trabalhos e por estar sempre torcendo por mim. Obrigado pelas nossas conversas e risadas! É muito bom ter pessoas como você por perto.

**Camila, Fiorin e Henrique** meu muito obrigado pelas nossas risadas, pelos momentos que passamos juntos e muita sorte na caminhada de vocês. Torço para que vocês conquistem tudo que sonharem e sigam firmes nos caminhos da pós-graduação.

**Vivian Noronha**, obrigado pelo convívio agradável e pela torcida

*sempre por mim. Queria te agradecer pelas palavras de conforto nos desesperos e por estar sempre ali disposta a ajudar.*

*Aos amigos da pós graduação:*

*Aos queridos amigos **Fábio Roberto e Gestter**, obrigado pela parceria, por toda ajuda, cada um da sua forma me ajudaram muito, nos longos dias de trabalho e nos momentos de boas conversas e descontração que tornaram esta jornada muito mais leve e agradável. Meu muito obrigado meus queridos amigos.*

### *A minha família...*

*Aos meus primos **Diego, Vinícius, Gustavo e Bruna**, obrigado por todo incentivo e motivação que sempre me deram, obrigada por torcerem por mim, vocês são muito importantes na minha vida.*

*Aos meus tios **Robson e Valtinho** e tias **Mara e Leninha**, gostaria de agradecê-los por todo carinho comigo, por vibrarem em cada conquista minha e estarem sempre dispostos a me ajudar em tudo que precisei.*

*À Família da minha namorada, **vó Leide, Cassileide e Ceará** obrigado por me receberem como família e por todo carinho que sempre tiveram comigo, eu tenho muito carinho por cada um de vocês.*

*Agradecimentos especiais*

*A toda minha família que sempre me apoiou em todos os momentos, torceu pelas minhas vitórias e acreditou na concretização deste momento. Muito obrigado, amo vocês!*

# *Agradecimientos*

*À Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas do Diretor Prof. Wilson Roberto Poi e Vice-Diretor Prof. João Eduardo Gomes Filho pela oportunidade de realizar esta pesquisa que permitiu meu crescimento profissional.*

*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 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 Renato, Paulão, Marcos, Eliseide e André por sempre nos ajudar, por toda alegria, disposição com todos nos, vocês tornam nossos dias na faculdade mais alegres e divertidos.*



## *Agradecimentos*

*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.*

*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 **pacientes atendidos**, obrigada pela confiança depositada em minhas mãos.*

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

## *Agradecimentos*

*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 Obrigado!*

*Epígrafe*

Aquilo que você faz...

“Deveríamos ser lembrados pelas coisas que fazemos. Elas importam mais do que tudo. Mais do que aquilo que dizemos ou do que nossa aparência. As coisas que fazemos sobrevivem a nós. São como os monumentos que as pessoas erguem em honra dos heróis depois que eles morrem. Como as pirâmides que os egípcios construíam para homenagear os faraós. Só que, em vez de pedras, são feitas das lembranças que as pessoas têm de você. Por isso nossos feitos são nossos monumentos. Construídos com memórias em vez de pedras.”

**JK. Palácio - Extraordinário**

*Resumo*

*Resumo*

Mello-Neto, JM. **Progressão da periodontite experimental em ratas diabéticas submetidas ao tratamento com dose oncológica de zoledronato.**

2018. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a progressão da periodontite experimental (PE) em ratas diabéticas submetidas à terapia com dose oncológica de zoledronato. **Materiais e métodos:** 120 animais (12 meses de idade) foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: VEI-NG (n=30); VEI-DM (n=30), ZOL-NG (n=30) e ZOL-DM (n=30). Durante 7 semanas, a cada 3 dias, administrou-se pela via intraperitoneal 0,45ml de solução de NaCl 0,9% (VEI-NG e VEI-DM) ou 0,45ml desta solução acrescida de 100 µg/Kg de zoledronato (ZOL-NG e ZOL-DM). No 14º dia todos os animais foram submetidos: 1) indução da PE; 2) indução da diabetes com dose única de 0,3 ml de solução de estreptozotocina (60 mg/kg) diluída em solução de tampão citrato de sódio 0,1M, pH 4,0 (VEI-DM e ZOL-DM) ou apenas o veículo de tampão citrato (VEI-NG e ZOL-NG). As eutanásias foram realizadas aos 14, 21 e 35 dias após indução da PE. Foi realizada análise microtomográfica das hemimandíbulas direitas e histopatológica e imunohistoquímica (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) das hemimandíbulas esquerdas. Os resultados foram analisados em microscopia óptica e submetidos à estatística com nível de significância de 5%. **Resultados:** A análise micro-CT mostrou uma menor perda óssea alveolar (POA), maior volume ósseo na furca (VOF) e maior espessura do trabeculado ósseo em ZOL-NG e ZOL-DM. ZOL-NG e ZOL-DM apresentaram maior

porcentagem de tecido ósseo na furca (PTO) e a porcentagem de tecido ósseo não vital na furca (PON) foi maior em ZOL-DM. A resposta inflamatória periodontal foi maior em ZOL-NG e ainda maior em ZOL-DM, com inflamação mais intensa e nível das principais citocinas com atividade pró-inflamatória (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) maior em ZOL e ainda maior em ZOL-DM. **Conclusão:** O diabetes mellitus promove exacerbação da resposta inflamatória periodontal ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato, o que o coloca, juntamente com a doença periodontal, como um importante fator de risco para a osteonecrose dos maxilares.

**Palavras chaves:** Difosfonatos; osteonecrose; Periodontite Crônica; Progressão da Doença; Diabetes Mellitus.

*Abstract*

*Abstract*



Mello-Neto, JM. **Experimental periodontitis progression in diabetic rats submitted to treatment with zoledronate oncologic dose.**

2018. 100 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

### **ABSTRACT**

The aim of the present study is to evaluate the progression of experimental periodontitis (PE) in diabetic female rats under therapy of oncological dosage of zoledronic acid. 120 female rats (12 months of age) were randomly assigned to four experimental groups: VEI-NG (n = 30); VEI-DM (n = 30), ZOL-NG (n = 30) and ZOL-DM (n = 30). For 7 weeks, every 3 days, 0.45 ml of 0.9% NaCl solution (VEI-NG and VEI-DM) or 0.45 ml of this solution plus 100 µg / kg zoledronate (ZOL) were administered intraperitoneally -NG and ZOL-DM). On the 14th day post-start of the experiment all animals were submitted to: 1) a ligature installation around the lower bilaterally first molar, which remained in position throughout the experimental period; 2) a caudal vein injection of 0.3 ml of streptozotocin solution (60mg/kg) diluted in 0.1 M sodium citrate buffer solution pH 4.0 (VEI-DM and ZOL-DM) or only the vehicle of sodium citrate buffer 0.1M, pH 4.0 (VEI-NG and ZOL-NG). As euthanasia were performed at 14, 21 and 35 days after the induction of PE by transcardiac perfusion with histological fixative. A microtomographic analysis of the right and posterior hemi-mandibles of the histological processing of the left hemi-jaw was performed. Patients with histories were submitted to hematoxylin-eosin staining or immunohistochemical reaction for: tumor necrosis factor alpha TNF- $\alpha$  and interleukin IL-1 $\beta$ . The results were analyzed by optical microscopy and submitted to statistical analysis with a significance level of 5%. The micro-CT analysis showed lower alveolar bone loss

(POA), greater bone volume in the furcation (VOF) and greater thickness of bone trabecule in ZOL-NG and ZOL-DM compared to the VEI-NG and VEI-DM groups. ZOL-NG and ZOL-DM presented a higher percentage of bone tissue in the furcation (PTO) and a percentage of non-vital bone tissue in the furcation (PON) was higher in ZOL-NG and much higher in ZOL-DM. The periodontal inflammatory response was higher in ZOL-NG and even higher in ZOL-DM, with more intense inflammation and major cytokines with the higher pro-inflammatory activity (TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) in ZOL and even higher in ZOL-DM. Diabetes mellitus promotes exacerbation of the periodontal inflammatory response during treatment with the oncologic dose of zoledronate, which causes, along with periodontal disease, an important risk factor for osteonecrosis of the jaw.

**Key words:** Diphosphonates; osteonecrosis; Chronic Periodontitis; Disease Progression; Diabetes Mellitus.

# *Lista de Figuras*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema ilustrando o delineamento experimental do estudo e os procedimentos experimentais executados em seus respectivos intervalos de tempo nos grupos VEI-NG, VEI-DM, ZOL-NG e ZOL-DM. 80
- Figura 2:** Gráficos evidenciando a evolução do peso corporal **(a)** e a dosagem glicêmica **(b)** ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato em VEI-NG, VEI-DM, ZOL-NG e ZOL-DM. Notar que aos 14 dias após o início do tratamento com veículo ou zoledronato os grupos VEI-DM e ZOL-DM foram submetidos à administração de estreptozotocina para indução do DM. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa quando se compara ZOL-NG e ZOL-DM, ‡, diferença estatisticamente significativa quando se compara SAL-NG e SAL-DM. 81
- Figura 3:** Aspecto microtomográfico do primeiro molar inferior e periodonto de inserção em VEI-NG, VEI-DM, ZOL-NG e ZOL-DM aos 35 dias pós instalação da ligadura: **a-d**: Gráficos evidenciando a perda óssea alveolar (POA) **(a)**, o volume ósseo alveolar (VOF) **(b)**, a espessura das trabéculas ósseas (Th.Tb) **(c)** e o número de trabéculas ósseas **(d)** na região de furca do primeiro molar inferior e periodonto de inserção. **e-h**: aspecto microtomográfico bidimensional do primeiro molar inferior e periodonto de inserção em VEI-NG **(e)**, VEI-DM **(f)**, ZOL-NG **(g)** 82

e ZOL-DM **(h)**. **i-l**: aspecto microtomográfico tridimensional do primeiro molar inferior e periodonto de inserção em VEI-NG **(i)**, VEI-DM **(j)**, ZOL-NG **(k)** e ZOL-DM **(l)**. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao VEI-NG, ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao VEI-DM, ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-NG.

**Figura 4:** Gráficos evidenciando a porcentagem de tecido ósseo (PTO) 83  
**(a)** e a porcentagem de tecido ósseo não vital (PTONV) **(b)** na região de furca do primeiro molar inferior aos 14, 21 e 35 dias pós instalação da ligadura em VEI-NG, VEI-DM, ZOL-NG e ZOL-DM. Teste estatístico: ANOVA – Tukey. Abreviações e símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao VEI-NG no mesmo período; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao VEI-DM no mesmo período; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-NG, I, diferença estatisticamente significativa intragrupo em relação aos 14d pós instalação da ligadura; §, diferença estatisticamente significativa intragrupo em relação aos 21d pós instalação da ligadura.

**Figura 5:** Fotomicrografias mostrando o aspecto histológico do primeiro molar inferior e periodonto de inserção aos 35 dias pós instalação da ligadura em VEI-NG (**a, b, c**), ZOL-NG (**d, e, f**), VEI-DM (**g, h, i**) e ZOL-DM (**j, k, l**). Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar, setas brancas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias ou ocupadas por restos necróticos de osteócitos. Aumento original: a, d, g, j – 50x; b, e, h, k – 100x; c, f, i, l – 400x. Barras de escala: a, d, g, j – 300µm; b, e, h, k – 150µm; c, f, i, l – 50µm. Coloração: HE. 84

**Figura 6:** Imunomarcação para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no periodonto de inserção do primeiro molar inferior aos 14 dias pós-instalação da ligadura. Gráficos mostrando a densidade óptica de imunomarcação para TNF $\alpha$  (**a**) e IL-1 $\beta$  (**b**) nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrografias evidenciando a imunomarcação em VEI-NG (**c**, TNF $\alpha$ ; **e**, IL-1 $\beta$ ), ZOL-NG (**d**, TNF $\alpha$ ; **f**, IL-1 $\beta$ ), VEI-DM (**g**, TNF $\alpha$ ; **i**, IL-1 $\beta$ ) e ZOL-DM (**h**, TNF $\alpha$ ; **j**, IL-1 $\beta$ ). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; ao, osso alveolar. Aumento original: 400x. Barras de escala: 50µm. 85

# *Lista de Tabelas*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - 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.	87
---	----



*Lista de  
Abreviaturas*

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

3D: tridimensional

%: porcentagem

°C: graus Celsius

±: mais ou menos

<: menor

μA: microampère

μg /kg: miligramas por decilitro

μg/kg: microgramas por quilograma

μg: micrograma

μl: microlitro

μm: micrômetro

AAOMS: Associação Americana de Cirurgiões Buco-Maxilo-Faciais

AF: área total da furca

AGEs: produtos finais de glicação avançada

AM: Amazonas

ANOVA: Análise de Variância

AO: área de osso alveolar

BPs: bisfosfonatos

CEJ: junção cimento esmalte

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

cm<sup>2</sup>: centímetro quadrado

DM: Diabetes de Mellitus

DP: Doença Periodontal

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA: Estados Unidos da América

FOA: Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g: gramas

HE: hematoxilina e eosina

IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta

IL-6: interleucina 6

J: joule

J/cm<sup>2</sup>: joules por centímetro quadrado

Kg: quilograma

Kvp: quilovoltagem

M: molar

mg: miligrama

mg/dl: miligrama por decilitro

mg/kg: miligramas por quilograma

Micro-CT: microtomografia-computadorizada

ml: mililitros

mm<sup>2</sup>: milímetros quadrados

MMP: metaloproteinas

MO: Missouri

mW: miliwatts

n<sup>o</sup>: número

NaCl: cloreto de sódio

ON: tecido ósseo necrosado;

ONJ: osteonecrose dos maxilares

ONM-M: osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa

OPG: Osteoprotegerina

PBS: tampão fosfato salino

PE: periodontite experimental

pH: potencial hidrogeniônico

POA: perda óssea alveolar

POF: porcentagem de osso na furca

PONV: porcentagem de osso não vital

Prof.: Professor

PTO: porcentagem de tecido ósseo

RAGE: receptor de produtos finais glicosilados

RANKL: receptor ativador do fator nuclear kappa ligante

ROI: Região de interesse

RS: Rio Grande do Sul

s: segundos

SP: São Paulo

Th.Tb: espessura de trabéculas ósseas

Th.N: número de trabéculas ósseas

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

VOI: volume ósseo de interesse

VOF: volume ósseo na região de furca

# *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*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	54
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	56
2.1 Delineamento experimental.....	57
2.1.1 Anestesia.....	57
2.1.2 Protocolo medicamentoso .....	57
2.1.3 Grupos experimentais .....	57
2.1.4 Periodontite induzida por ligadura .....	58
2.1.5 Indução de diabetes e aferição do nível glicemico .....	58
2.1.6 Eutanásia e obtenção das amostras .....	59
2.2 Processamento das amostras .....	59
2.3 Análise dos resultados .....	60
2.3.1 Análise da condição geral de saúde e exame clínico intrabucal ..	60
2.3.2 Análise microtomográfica das hemimandíbulas .....	60
2.3.3 Análise histopatológicas dos tecidos periodontais .....	61
2.3.4 Análise histométrica da PTO e PTONV .....	62
2.3.5 Análise imunoistoquímica de TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	62
2.3.6 Análise estatística .....	63
3. RESULTADOS .....	63
3.1 Saúde geral e aspecto clínico intrabucal .....	63
3.2 POA, VOF,Th.Tb e Th.N no periodonto de inserção do premeiro molar inferior.....	64
3.3 PTO e PTONV na região de furca do primeiro molar inferior .....	64
3.4 Aspecto histológico dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior.....	65



3.5 TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ nos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior.....	65
4. DISCUSSÃO .....	66
5. CONCLUSÃO .....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
FIGURAS .....	79
TABELAS.....	86
ANEXOS.....	88

*Manuscrpto para*  
\*  
*Publicação*



LABORATÓRIO DE  
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

---

\* Normatização segundo a revista **Journal of Periodontology**



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

---

**Title:** Progressão da periodontite experimental em ratas diabéticas submetidas ao tratamento com dose oncológica de zoledronato.

**Authors:**

João Martins de Mello Neto DDS<sup>†</sup>, Letícia Helena Theodoro DDS, PhD<sup>†</sup>,  
Edilson Ervolino DDS, PhD<sup>‡</sup>

**Corresponding author:** Edilson Ervolino

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

CEP: 16015-050

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

E-mail: [eervolino@foa.unesp.br](mailto:eervolino@foa.unesp.br)

**Short Running Title:** Periodontite experimental em diabéticos e uso de zoledronato

**Conflict of interest:** O autor declara não haver conflito de interesse.

**Number of figures:** 06

**Number of tables:** 01

---

<sup>†</sup> São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba; Department of Surgery and Integrated Clinic – Division of Periodontics.

<sup>‡</sup> São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba; Department of Basic Sciences.

## Resumo

**Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a progressão da periodontite experimental (PE) em ratas diabéticas submetidas à terapia com dose oncológica de zoledronato. **Materiais e métodos:** 120 animais (12 meses) foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: VEI-NG (n=30); VEI-DM (n=30), ZOL-NG (n=30) e ZOL-DM (n=30). Durante 7 semanas, a cada 3 dias, administrou-se pela via intraperitoneal 0,45ml de solução de NaCl 0,9% (VEI-NG e VEI-DM) ou 0,45ml desta solução acrescida de 100 µg/Kg de zoledronato (ZOL-NG e ZOL-DM). No 14º dia todos os animais foram submetidos: 1) indução da PE; 2) indução da diabetes com dose única de 0,3 ml de solução de estreptozotocina (60 mg/kg) diluída em solução de tampão citrato de sódio 0,1M, pH 4,0 (VEI-DM e ZOL-DM) ou apenas o veículo de tampão citrato (VEI-NG e ZOL-NG). As eutanásias foram realizadas aos 14, 21 e 35 dias após indução da PE. Foi realizada análise microtomográfica das hemimandíbulas direitas e histopatológica e imunoistoquímica (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) das hemimandíbulas esquerdas. Os resultados foram analisados em microscopia óptica e submetidos à análise estatística com nível de significância de 5%. **Resultados:** A análise micro-CT mostrou uma menor perda óssea alveolar (POA), maior volume ósseo na furca (VOF) e maior espessura do trabeculado ósseo em ZOL-NG e ZOL-DM. ZOL-NG e ZOL-DM apresentaram maior porcentagem de tecido ósseo na furca (PTO) e a porcentagem de tecido ósseo não vital na furca (PON) foi maior em ZOL-DM. A resposta inflamatória periodontal foi maior em ZOL-NG e ainda maior em ZOL-DM, com inflamação mais intensa e nível das principais citocinas com atividade pró-inflamatória (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) maior em ZOL e ainda maior em ZOL-DM. **Conclusão:** O diabetes mellitus promove exacerbação da resposta inflamatória periodontal ao longo do tratamento com dose oncológica de

zoledronato, o que o coloca, juntamente com a doença periodontal, como um importante fator de risco para a osteonecrose dos maxilares.

**Palavras chaves:** Difosfonatos; osteonecrose; Periodontite Crônica; Progressão da Doença; Diabetes Mellitus.

## 1. INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BPs) são medicamentos antirreabsortivos empregados no tratamento de doenças ósseas líticas e no controle de dor óssea, modulação de hipercalcemia e prevenção de progressão de metástase óssea em neoplasias malignas osteotrópicas.<sup>1</sup> Uma reação adversa ocasionada pelo uso deste tipo de medicamento, e que se constitui em um grande desafio para a odontologia, é a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M).<sup>2</sup> A ONM-M consiste na presença de osso exposto na região buco-maxilo-facial, por um período maior que oito semanas, em pacientes submetidos ao tratamento prévio ou atual com droga antirreabsortiva e que não possuem história prévia de radioterapia nos maxilares.<sup>2</sup>

A etiopatogenia da ONM-M ainda não foi completamente elucidada, todavia os fatores de risco relacionados com a doença estão bem estabelecidos. Com relação aos fatores de risco relacionado com a droga observa-se que a maior parte dos casos de ONM-M estão associados ao uso do zoledronato, o mais potente dos BPs, empregado para na dosagem oncológica, ou seja, a dose que complementa a terapia de tumores osteotrópicos. Dentre os fatores de risco relacionado com o indivíduo constata-se que a ONM-M acomete com maior frequência mulheres com idade avançada que empregam o medicamento para complementação de terapia oncológica para o câncer de mama ou o mieloma múltiplo.<sup>2</sup>

Um fator que tem recebido grande atenção é que algumas comorbidades, como o Diabetes Mellitus (DM), aumentam significativamente o risco de ONM-M.<sup>3,4</sup> Um estudo epidemiológico mostrou que em pacientes que fizeram uso de

bisfosfonatos pela via intravenosa e que desenvolveram ONM-M, o DM se mostrou a comorbidade mais comum, indicando uma estreita relação entre ONM-M e DM.<sup>5</sup>

A exodontia e a doença periodontal (DP) consistem no primeiro e no segundo fator risco local para a ONM-M, respectivamente. Estudos clínicos e experimentais têm reportado que a exodontia de dentes com comprometimento periodontal e/ou periapical, ou seja, a presença prévia de inflamação/infeção local, exercem um papel crucial no desencadeamento da ONM-M.<sup>2,6,7</sup>

O DM e DP são doenças cujas prevalências têm aumentado progressivamente na população mundial. Estudos projetam que em 2030 o DM será a sétima principal causa de mortes no mundo.<sup>8</sup> Um estudo sobre as doenças na população mundial (GBD, 1990–2010) indica que a periodontite severa é a sexta doença mais prevalente no mundo, atingindo cerca de 10% da população mundial, e que este número aumentou em torno de 60% de 1990 para 2010.<sup>9-12</sup> A compreensão de como a DP e o DM participam da patofisiologia da ONM-M é de grande importância tendo em vista que a manutenção da saúde periodontal durante tratamento com drogas antirreabsortivas, especialmente em portadores de diabetes, pode se constituir em uma forma de reduzir o risco de desencadeamento desta condição patológica.

Além do DM ser um fator de risco para a DP, o controle glicêmico também sofre alteração quando a DP esta instalada, o que agrava ainda mais o descontrole metabólico dos diabéticos. A presença da DP promove aumento nos níveis de inúmeras citocinas com atividade inflamatória, as quais na presença do DM tornam-se ainda mais elevados e estão envolvidos com a resistência à insulina, prejudicando assim o controle glicêmico.<sup>13,14</sup>

Em decorrência do envelhecimento da população a utilização dos BPs será cada vez mais frequente, por se tratar de uma alternativa terapêutica efetiva para algumas osteopatias comuns na terceira idade. Além disso, DM e DP também tem a prevalência aumentada à medida que se envelhece.<sup>13,14</sup> Sendo assim, pacientes diabéticos que fazem uso crônico de BPs serão cada vez mais comuns no consultório odontológico. Tais pacientes quando apresentarem um comprometimento periodontal passam a exibir um importante fator de risco local para o desenvolvimento da ONM-M e elucidar como a doença periodontal evolui em diabéticos que fazem uso de bisfosfonatos pode ajudar na prevenção da ONM-M. O presente estudo teve como propósito analisar a progressão da periodontite experimental (PE) ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato em ratas diabéticas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

No presente trabalho foram utilizados 120 ratas (12 meses de idade) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso corporal compreendido entre 350 – 450g. 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 sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de  $55 \pm 5\%$ , acondicionamento em gaiolas plásticas (4 animais por gaiola) e livre acesso ao alimento e à água. 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 (Protocolo 00533-2016).

## **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<sup>§</sup> (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina<sup>\*\*</sup> (10 mg/kg).

### **2.1.2 Protocolo medicamentoso**

O plano de tratamento medicamentoso teve duração de sete semanas. A administração de veículo ou zoledronato<sup>††</sup> ocorreu pela via intraperitoneal obedecendo a 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 complementação da terapia oncológica de humanos.<sup>15</sup>

### **2.1.3 Grupos experimentais**

Os 120 animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: VEI-NG (n=30); VEI-DM (n=30), ZOL-NG (n=30) e ZOL-DM (n=30).

Durante sete semanas, a cada três dias, administrou-se pela via intraperitoneal

---

<sup>§</sup> Francotar<sup>®</sup>, Virbac, SP, Brasil

<sup>\*\*</sup> Rompum<sup>®</sup>, Bayer, RS, Brasil

<sup>††</sup> Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA

0,45ml de solução de NaCl 0,9% em VEI-NG e VEI-DM, ou 0,45ml desta solução acrescida de 100 µg/Kg de zoledronato em ZOL-NG e ZOL-DM. No 14º dia pós-início do experimento todos os animais foram submetidos: 1) instalação de uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior esquerdo, a qual permaneceu em posição durante todo o período experimental e 2) injeção via veia caudal de 0,3 ml de solução de estreptozotocina (60 mg/kg) diluída em solução de tampão citrato de sódio 0,1M, pH 4,0 (VEI-DM e ZOL-DM) ou apenas o veículo (VEI-NG e ZOL-NG). As eutanásias foram realizadas aos 14, 21 e 35 dias pós-instalação da ligadura via perfusão transcardíaca com fixador histológico.

#### **2.1.4 Periodontite induzida por ligadura**

Após 14 dias do início do plano de tratamento medicamentoso foi instalada uma ligadura de algodão<sup>‡‡</sup> ao redor do primeiro molar inferior bilateralmente, para o acúmulo de placa bacteriana e conseqüentemente indução de periodontite experimental (PE).

#### **2.1.5 Indução de diabetes e aferição do nível glicêmico**

No dia da instalação da ligadura as ratas receberam uma única injeção, via veia caudal, de 0,3 ml de 60mg/kg de estreptozotocina<sup>§§</sup>, diluída em tampão citrato de sódio 0,1M, pH 4,0 (VEI-DM e ZOL-DM) ou apenas o veículo (VEI-NG e ZOL-NG). O nível glicêmico dos animais foi monitorado periodicamente através do glicosímetro Accu-Check Active<sup>\*\*\*</sup> e aqueles animais que tiveram índice glicêmico em jejum maior que 200mg/dl foram considerados diabéticos e incluídos do estudo.

---

<sup>‡‡</sup> Fio de algodão número 24; Coats Corrente, SP, Brasil

<sup>§§</sup> Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA

<sup>\*\*\*</sup> Roche, São Paulo, Brasil

### 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<sup>†††</sup> em tampão fosfato salino<sup>‡‡‡</sup>, 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 das amostras

As hemimandíbulas direitas de VEI-NG, VEI-DM, ZOL-NG e ZOL-DM aos 35 dias pós-instalação da ligadura não foram submetidas a nenhum tipo de processamento pós-fixação e foram empregadas para análise microtomográfica.

As hemimandíbulas esquerdas de todos os grupos e períodos experimentais foram submetidas à desmineralização em PBS acrescida de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) durante 90 dias. Em seguida as amostras foram 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 silanizadas e submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina para análise histopatológica e análise histométrica.

Para análise imunoistoquímica, as secções histológicas foram divididas em dois lotes e submetidas à técnica da imunoperoxidase indireta empregando os seguintes

---

<sup>†††</sup> Sigma, Saint Louis, MO, USA

<sup>‡‡‡</sup> (PBS – Sigma, Saint Louis, MO, USA)

anticorpos primários: anti-TNF $\alpha$ <sup>§§§</sup> e anti-IL-1 $\beta$ <sup>\*\*\*\*</sup>. A reação imunoistoquímica seguiu o protocolo descrito por Garcia et al. 2016.<sup>16</sup> Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

## **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 efetuando-se o monitoramento do peso corporal semanalmente e 6 aferições glicêmicas com jejum de 12 horas. 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 microtomográfica das hemimandíbulas**

As hemimandíbulas direitas de VEI-NG, VEI-DM, ZOL-NG e ZOL-DM aos 35 dias pós-instalação da ligadura foram submetidas à análise com sistema Micro-CT<sup>††††</sup>. O escaneamento das amostras seguiu os seguintes parâmetros: tamanho do voxel isotrópico de 0,9 mm, 50 kVp, ângulo de rotação de 0.5°, corrente de feixe a 500 $\mu$ A, filtro de alumínio de 0,5 mm, tempo de exposição de 540 milissegundos e uma resolução de imagem de 9  $\mu$ m. As imagens de cada amostra foram reconstruídas com o software NRECON<sup>®</sup><sup>‡‡‡‡</sup>. O programa DataViewer<sup>®</sup><sup>§§§§</sup> foi utilizado para visualização e avaliação das medidas lineares (eixo coronal, sagital e transaxial) em todas as três dimensões espaciais e, em seguida, todas as imagens foram

---

§§§ SC1348, Santa Cruz Biotechnology®

\*\*\*\* SC-1252, Santa Cruz Biotechnology®

†††† SkyScan 1272, Brucker

‡‡‡‡ NRECON<sup>®</sup> v.1.6.3.3

§§§§ Data Viewer<sup>®</sup> v.1.5.0

orientadas e salvas em fatias coronais (2000 x 1336). As medidas volumétricas foram realizadas após a seleção de um 3D ROI (região de interesse) com o programa CTAn®<sup>\*\*\*\*\*</sup>. Durante o desenho do ROI, o examinador foi orientado por marcos morfológico até encontrar um corte inicial onde a polpa mesial e distal do primeiro molar inferior estivessem completamente identificadas para que se determinasse a região central da furca. Depois de identificada, 15 cortes anteriores e 15 cortes posteriores foram selecionados, totalizando uma área de 30 cortes da região central da furca para análise microtomográfica. Todos os contornos foram desenhados começando logo abaixo da junção cimento-esmalte (CEJ) e movendo 1 mm na direção apical. Assim, toda a área central da região de furca do primeiro molar estavam envolvidas no ROI. O parâmetro arquitetônico avaliado foi: volume ósseo na região de furca (VOF - %), espessura de trabéculas no tecido ósseo da região de furca (Th.Tb – mm<sup>2</sup>), número de trabéculas no tecido ósseo da região de furca (Th.N – /mm<sup>2</sup>). Para análise do nível da perda óssea alveolar com auxílio do programa DataViewer® foram feitas duas medidas lineares da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar na mesial e distal e outra do centro da região de furca até a crista óssea desta região.

### **2.3.3 Análise histopatológica dos tecidos periodontais**

A análise histopatológica foi efetuada por um histologista certificado (Prof. Dr. E.E.) avaliando-se os seguintes parâmetros: intensidade da resposta inflamatória local; extensão do processo inflamatório; reabsorção óssea alveolar, padrão de estruturação do tecido conjuntivo na região de furca, padrão de estruturação do tecido ósseo na região de furca (Tabela 1).

---

<sup>\*\*\*\*\*</sup> CTAn® v 1.10.11.0

### 2.3.4 Análise histométrica da PTO e PTONV

Para a determinação da **Porcentagem de Tecido Ósseo** na região de furca (PTO) dos primeiros molares foi utilizado um sistema de análise de imagem<sup>++++</sup>. Foi mensurada a **Área Total da Furca (ATF)** e em seguida a **Área ocupada por Tecido Ósseo (ATO)**, ambas em mm<sup>2</sup>. Posteriormente foi calculada a PTO. A ATF 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 cemento situado entre as raízes. A ATO teve o mesmo limite apical da ATF e a partir deste seguiu-se todo o contorno da superfície externa do tecido ósseo entre as raízes. A PTO foi calculada multiplicando-se ATO por 100 e dividindo-se por ATF ( $PTO = (ATO \times 100) / ATF$ ). A PTO foi expressa em % e como média  $\pm$  desvio padrão em cada grupo experimental.

Para a determinação da **Porcentagem de Tecido Osseo Não Vital** na região de furca (PTONV) dos primeiros molares foi utilizado o sistema de análise descrito acima. Na ATF contornou-se a(s) áreas constituídas por tecido ósseo não vital (TONV). PTONV foi calculada multiplicando-se TONV por 100 e dividindo-se por PTO ( $PTONV = (TONV \times 100) / PTO$ ). A PTONV foi expressa em % e como média  $\pm$  desvio padrão em cada grupo experimental.

### 2.3.5 Análise imunoistoquímica de TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$

A análise imunoistoquímica foi realizada no tecido conjuntivo e ósseo da região do primeiro molar inferior esquerdo. Foram obtidas imagens desta região via utilização de uma câmera digital<sup>++++</sup> acoplada ao microscópio óptico<sup>§§§§§</sup> (200x) e conectada

---

<sup>++++</sup> (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany).

<sup>++++</sup> AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha

a um microcomputador. Com auxílio do programa de análise de imagens<sup>\*\*\*\*\*</sup> foi demarcada a imunomarcação por meio da ferramenta *limiar de cor*. A densidade óptica que discrimina a imunomarcação (coloração castanha) foi obtida e os dados foram expressos como unidade arbitrária de densidade óptica. Tais valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### **2.3.6 Análise estatística**

Empregou-se o programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brasil). O tamanho da amostra foi calculado para assegurar um poder do teste estatístico de 95% ( $p < 0.05$ ). Para as análises microtomográficas, histométrica e imunoistoquímica foram empregados os testes de normalidade Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0.05$ ).

## **3 RESULTADOS**

### **3.1 Saúde geral e aspecto clínico intrabucal**

As condições gerais de saúde e o peso corporal dos animais dos grupos VEI-NG e ZOL-NG utilizados neste estudo se mantiveram constantes durante todo o período experimental. Os animais dos grupos VEI-DM e ZOL-DM apresentaram uma queda acentuada no peso corporal (Figura 2a), bem como, aumento do nível glicêmico após a indução do diabetes, o qual ultrapassou 300 mg/dl (Figura 2b).

---

§§§§§ AxioLab A1, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha  
\*\*\*\*\* ImageLab®, Diracom Bioinformática, São Paulo, Brasil

### **3.2 POA, VOF, Th.Tb e Th.N no periodonto de inserção do primeiro molar inferior**

ZOL-DM apresentou menor POA em relação ao VEI-NG e VEI-DM. Não houve diferença estatisticamente significativa entre ZOL-NG e ZOL-DM. VEI-DM apresentou maior POA em relação ao VEI-NG (Figura 3a).

VEI-DM apresentou menor VOF em relação ao VEI-NG. ZOL-NG apresentou maior VOF quando comparado a VEI-DM e ZOL-DM (Figura 3b).

ZOL-DM apresentou maior espessura trabecular em relação ao VEI-DM. ZOL-NG apresentou maior espessura trabecular em relação à VEI-NG, VEI-DM e ZOL-DM. VEI-DM apresentou menor espessura trabecular em relação à VEI-NG (Figura 3c).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos VEI-NG, VEI-DM, ZOL-NG e ZOL-DM com relação a número de trabéculas (Figura 3d).

O aspecto microtomográfico bi e tridimensional do periodonto de inserção nos diferentes grupos experimentais esta apresentado na Figura 3.

### **3.3 PTO e PTONV na região de furca do primeiro molar inferior**

Em VEI-DM a PTO se mostrou significativamente menor que em VEI-NG, ZOL-NG e ZOL-DM em todos os períodos experimentais. Não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos ZOL-NG e ZOL-DM com relação a PTO. Em ZOL-NG e ZOL-DM a PTO se apresentou maior que em VEI-NG aos 35 dias após instalação da ligadura. O grupo VEI-NG aos 35 dias apresentou menor PTO quando comparado com os 14 dias pós-instalação da ligadura, nos demais grupos experimentais não houve diferenças estatisticamente significante intra-grupo (Figura 4a).

Em ZOL-NG a PTONV se mostrou significativamente maior que em VEI-NG e VEI-DM. ZOL-DM apresentou maior PTONV quando comparado com os demais grupos



experimentais. Tanto em ZOL-NG quanto em ZOL-DM a PTONV foi maior aos 35 dias em relação aos 14 e 21 dias e maior aos 21 dias em relação aos 14 dias pós-instalação da ligadura.

### **3.4 Aspecto histológico dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior**

A severidade da PE em VEI-DM foi maior quando comparada com VEI-NG. A PE em ZOL-NG e ZOL-DM foi caracterizada por uma resposta inflamatória local extremamente exacerbada, pequena perda óssea alveolar e aumento local progressivo de tecido ósseo não vital. A magnitude da resposta periodontal foi mais exacerbada em ZOL-DM quando comparada com ZOL-NG. Os parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais durante a evolução da PE em VEI-NG, VEI-DM, ZOL-NG e ZOL-DM estão apresentados na Tabela 1 e Figura 5.

### **3.5 TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ nos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior**

Em ZOL-DM a densidade óptica de imunomarcção para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foi maior que nos demais grupos experimentais em todos os períodos analisados. A densidade óptica de imunomarcção para ambas as citocinas foi maior em VEI-DM e ZOL-NG quando comparado com VEI-NG em todos os períodos experimentais. Em VEI-DM aos 35 dias pós-instalação da ligadura a imunomarcção para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foi menor que aos 14 e 21 dias. Em VEI-NG e ZOL-NG tanto aos 21 quanto aos 35 dias a imunomarcção para ambas as citocinas foi menor em relação aos 14 dias, além

disso, a imunomarcação para IL-1 $\beta$  em VEI-DM aos 35 dias foi menor que nos demais períodos experimentais.

#### 4. DISCUSSÃO

A ONM-M é uma reação adversa ocasionada pelo uso de drogas com atividade antirreabsortiva, como os BPs. O zoledronato é o BPs mais potente e frequentemente relacionado com a maioria dos casos de ONM-M.<sup>1,17</sup> Estudos tem mostrado que o DM é uma condição sistêmica que aumenta o risco de ONM-M.<sup>3-5</sup> Alguns fatores de risco locais, como a presença de DP, também elevam sobremaneira o risco de desencadeamento desta condição patológica.<sup>18,19</sup> A associação do tratamento com drogas antirreabsortivas e presença de DM e DP será cada vez mais comum na população, tendo em vista que este tipo de tratamento e tais doenças aumentam à medida que ocorre um avanço na idade.<sup>20</sup> O propósito do presente estudo foi avaliar a progressão da PE ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato em ratas diabéticas, via análise micromográfica do osso alveolar, avaliação histopatológica dos tecidos periodontais, análise histométrica do tecido ósseo vital e não vital e avaliação imunistoquímica das principais citocinas com atividade pró-inflamatória. Em ratas diabéticas tratadas com dose oncológica de zoledronato a severidade da PE mostrou-se grandemente aumentada e condizente com um estágio 0 de ONM-M, o que aumenta sobremaneira o risco da manifestação clínica da doença.<sup>21,22</sup>

A ONM-M foi descrita pela primeira vez em 2003, por Marx.<sup>23</sup> Ao longo destes anos os estudos epidemiológicos sobre esta doença foram tomando corpo e atualmente se conseguiu traçar o seu perfil epidemiológico e principais fatores de risco.<sup>2,5,24,25</sup> Diante disso, o presente estudo foi delineado de modo a permitir a

reunião de vários fatores de risco para a ONM-M. No que se refere ao fator de risco relacionado ao medicamento empregou-se o zoledronato, o bisfosfonato mais potente, e em sua dosagem oncológica, ou seja, prescrita para complementação de terapia oncológica em tumores osteotrópicos. Com relação ao indivíduo empregaram-se ratas com 12 meses de idade tendo em vista que a ONM-M acomete com maior frequência mulheres em idade avançada. No que se refere à comorbidade associada induziu-se o diabetes via dose única de estreptozotocina, tendo em vista que esta é a desordem sistêmica mais frequente em indivíduos que desenvolveram a ONM-M. Com relação ao fator de risco local, induziu-se PE via instalação de ligadura para promover o acúmulo de placa, uma vez que a DP é um importante fator de risco local para ONM-M.

Os achados microtomográficos (POA, VOF, Tb.Th e TB.N) e histométricos da PTO evidenciaram que o tratamento com dose oncológica de zoledronato foi capaz de reduzir substancialmente a perda óssea alveolar, consequentemente mantendo maior quantidade de tecido ósseo em sítios com doença periodontal, o que corrobora com estudos prévios.<sup>19,26</sup> Embora possa parecer que sejam efeitos positivos do tratamento com dose oncológica de zoledronato, os dados histométricos da PTONV mostraram uma ação extremamente danosa da potente inibição da reabsorção óssea neste sítio. Em ZOL-NG, e de modo muito mais pronunciado em ZOL-DM, a PTONV foi significativamente maior que nos grupos tratados com veículo, VEI-NG e VEI-DM. Além disso, a PTONV se mostrou crescente ao longo dos períodos experimentais nos grupos ZOL-NG e ZOL-DM. Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram em sítio com DP ocorre um aumento de tecido ósseo não vital ocasionado pelo tratamento com dose oncológica de zoledronato em ratos normoglicêmicos.<sup>18,27,28</sup> A alta taxa

de tecido ósseo não vital em tais sítios em ratas diabéticas foi demonstrada pela primeira vez no presente estudo.

As ações dos BPs sobre os osteoclastos explicam concomitantemente tanto os achados microtomográficos e histométricos de PTO, quanto os dados histométricos de PTONV nos grupos submetidos ao tratamento com dose oncológica de zoledronato, ZOL-NG e ZOL-DM. O zoledronato altera o metabolismo ósseo pela inibição da via do mevalonato nos osteoclastos, especificamente atuando sobre a enzima farnesil difosfato sintase.<sup>29</sup> Tal ação impede que ocorram alterações na dinâmica do citoesqueleto, impossibilitando a formação da zona clara e da zona pregueada, as quais são essenciais para a interação da célula com a matriz óssea e para a formação do microambiente propício para o início da atividade reabsortiva.<sup>29,30</sup> Além disso, desencadeia inibição da osteoclastogênese e indução de apoptose prematura em osteoclastos ativos.<sup>31</sup> No presente estudo provavelmente a inibição da reabsorção óssea e, conseqüentemente da remodelação óssea, impede que ocorra a eliminação do tecido ósseo inviável e das microfraturas ósseas, as quais são muito comuns no tecido ósseo alveolar. A grande necessidade de remodelação óssea alveolar é justificada pela atividade mastigatória, que para promover a dissipação das forças, necessita de uma resposta adaptativa constante do osso alveolar, a qual foi impedida pelo tratamento com dose oncológica de zoledronato.

A análise histopatológica dos tecidos periodontais e a imunomarcagem para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  revelaram em ZOL-DM um quadro inflamatório extremamente exacerbado, abrangendo grande extensão dos tecidos periodontais, se mostrando sustentado ao longo do tempo e associada a níveis muito elevados de citocinas com atividade pró-inflamatória. Uma resposta semelhante, todavia com menor magnitude,

foi observada em VEI-DM, o que está de acordo com estudos prévios.<sup>32,33</sup> Além dos níveis elevados de mediadores inflamatórios que são típicos da doença periodontal tanto a DM quanto o tratamento com dose oncológica de zoledronato são capazes de elevar os níveis de citocinas com atividade pró-inflamatória.<sup>19,34</sup> A hiperglicemia crônica, presente em todas as formas de diabetes, favorece a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). A interação de AGEs com o receptor de produtos finais glicosilados (RAGE) inicia uma cascata de eventos biológicos que resultam em elevação do estresse oxidativo que por sua vez estimula a síntese e o acúmulo de AGEs.<sup>33,35</sup> AGEs desencadeiam elevação nos níveis de inúmeros mediadores com ação pró-inflamatória dentre eles citocinas. Morita et al. (2017) evidenciaram elevados níveis de citocinas com atividade pro-inflamatória, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em um modelo experimental de ONM-M. Tais autores relacionam tais citocinas com a patofisiologia a ONM-M, tendo em vista que camundongos deficientes para TNF $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  ou IL-6 são resistentes ao desenvolvimento da doença. Estes dados associados aos achados do presente estudo deixam claro o elevado risco de ONM-M em diabéticos com doença periodontal tratados com dose oncológica de zoledronato.<sup>7</sup>

Além da resposta inflamatória extremamente exacerbada contribuir para o colapso dos tecidos periodontais, dois outros fatores auxiliam no agravamento dos efeitos locais. O primeiro fator é a vulnerabilidade dos tecidos periodontais ocasionada pelo diabetes e pelo tratamento com zoledronato. O diabetes exerce efeitos negativos sobre os tecidos periodontais tais como: alteração na função dos fibroblastos, estimulando-os na produção de mediadores inflamatórios e inibindo-os na síntese e secreção de elementos da matriz extracelular; modificações microvasculares e; alteração na função de células ósseas, inibindo a atividade de

osteoblastos e estimulando a atividade dos osteoclastos.<sup>36</sup> O tratamento com dose oncológica de zoledronato inibe a proliferação de células epiteliais, conjuntivas e ósseas além de estimular a ocorrência de apoptose em tais células.<sup>37</sup> O segundo fator é a elevada carga microbiana associada à doença periodontal, que sofre modificações na presença do diabetes e do tratamento com zoledronato, o que facilita a colonização dos tecidos periodontais, e contribui ainda mais para aumentar o comprometimento tecidual local.

Outro fator de grande importância é que mediadores inflamatórios gerados localmente tem efeito sistêmico que contribuem tanto para o agravo da DM quanto para o aumento do risco de ONM-M. O TNF $\alpha$  está relacionado com a resistência à insulina em modelos animais e em estudos humanos.<sup>38,39</sup> Níveis elevados de TNF $\alpha$  alteram a sinalização de insulina intracelular via inibição da atividade da tirosina quinase do receptor de insulina, reduzindo a síntese do transportador de glicose responsivo à insulina, resultando em resistência à insulina e conseqüentemente descontrole glicêmico.<sup>38,40,41</sup> Deve ser levado em consideração que o tratamento com dose oncológica de zoledronato eleva os níveis de citocinas com atividade pró-inflamatória, e que existe uma relação entre tais níveis de citocinas e a patofisiologia da ONM-M, sendo assim, as alterações locais e sistêmica de citocinas ocasionada pela doença periodontal e pelo diabetes potencializam ainda mais a elevação de tais mediadores inflamatórios aumentando o risco de desencadeamento da doença.

No presente estudo constatamos que o DM em ratos com PE determina a ocorrência de ONM-M no estágio 0. Embora não tenha ocorrido a manifestação clínica da ONM-M, supostamente o risco do desencadeamento desta condição patológica aumenta consideravelmente. Estudos mostraram que em modelo

experimental de ratos diabéticos tratados com zoledronato e que foram submetidos à exodontia de molares constatou-se a ocorrência de ONM-M em seus estágios mais avançados<sup>21,22</sup> mesmo sem a presença prévia de uma condição periodontal desfavorável. Tais achados e os resultados do presente estudo nos fazem inclusive indicar cautela no tratamento da doença periodontal com raspagem e alisamento radicular nestas condições, tendo em vista que procedimentos odontológicos invasivos podem-se constituir em risco para o desencadeamento da ONM-M.

## **5. CONCLUSÃO**

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, durante tratamento com dose oncológica de zoledronato a PE evolui para um estágio 0 de ONM-M e na presença do DM ocorre maior comprometimento tecidual, aumentando o risco de ONM-M, o que reforça a importância do acompanhamento da saúde periodontal anteriormente a terapia com dose oncológica de zoledronato e do correto controle glicêmico destes pacientes durante a terapia com esta medicação.

## REFERÊNCIAS

1. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(9):1032-1045.
2. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, et al. 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
3. Molcho S, Peer A, Berg T, Futerman B, Khamaisi M. Diabetes microvascular disease and the risk for bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: a single center study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(11): E1807-12.
4. Peer A, Khamaisi M. Diabetes as a risk factor for medication-related osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res* 2015; 94(2):252-60.
5. O’Ryan FS, Khoury S, Liao W, et al. Intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: bone scintigraphy as an early indicator. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67:1363–1372.
6. Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T, et al. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res* 2013; 28:1631-40.
7. Morita M, Iwasaki R, Sato Y et al., Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following anti-resorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. *Sci Rep* 2017; 7:7:46322.
8. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006; 3(11):e442.



9. Murray CJ, Vos T, Lozano R, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380, 2197–2223.
10. Marcenes, W, Kassebaum NJ, Bernabé E, et al. Global burden of oral conditions in 1990–2010: A systematic analysis. *Journal of Dental Research* 2013; 92, 592–597.
11. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990– 2010: A systematic review and meta-regression. *Journal of Dental Research* 2014a; 93 1045–1053.
12. Jin LJ, Lamster IB, Greenspan, JS, Pitts NB, Scully C, Warnakulasuriya S. Global burden of oral diseases: Emerging concepts, management and interplay with systemic health. *Oral Diseases* 2016; 22, 609–619.
13. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol* 1998; 3:51-61.
14. Grover HS & Luthra S. Molecular mechanisms involved in the bidirectional relationship between diabetes mellitus and periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol* 2013; 17:292-301.
15. Food and Drug Administration, Dose Calculator: Conversion Chemoterapy of Human to Animals, Accessed 2015-02.
16. Garcia VG, Knoll LR, Longo M, Novaes VC, Assem NZ, Ervolino E, de Toledo BE, Theodoro LH. Effect of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on ligatureinduced periodontitis in rats. *J. Periodontal Res* 2016; 51:26-37.

17. Schiodt M, Vadhan-Raj S, Chambers MS, et al. A multicenter case registry study on medication-related osteonecrosis of the jaw in patients with advanced cancer. *Support Care Cancer* 2017 [Epub ahead of print]
18. Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, et al. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res* 2011; 26(8):1871–1882.
19. Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, et al. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res* 2012; 27(10):2130–43.
20. Lamster IB. Geriatric periodontology: how the need to care for the aging population can influence the future of the dental profession. *Periodontol 2000* 2016; 72(1):7-12.
21. Takaoka K, Yamamura M, Nishioka T, et al. Establishment of an Animal Model of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws in Spontaneously Diabetic Torii Rats. *PLoS ONE* 2015; 10(12): e0144355.
22. Zhang Q, Yu W, Lee S, Xu Q, Naji A, Le AD. Bisphosphonate Induces Osteonecrosis of the Jaw in Diabetic Mice via NLRP3/Caspase-1-Dependent IL-1 $\beta$  Mechanism. *J Bone Miner Res* 2015;30(12):2300-12.
23. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61:1115-7.

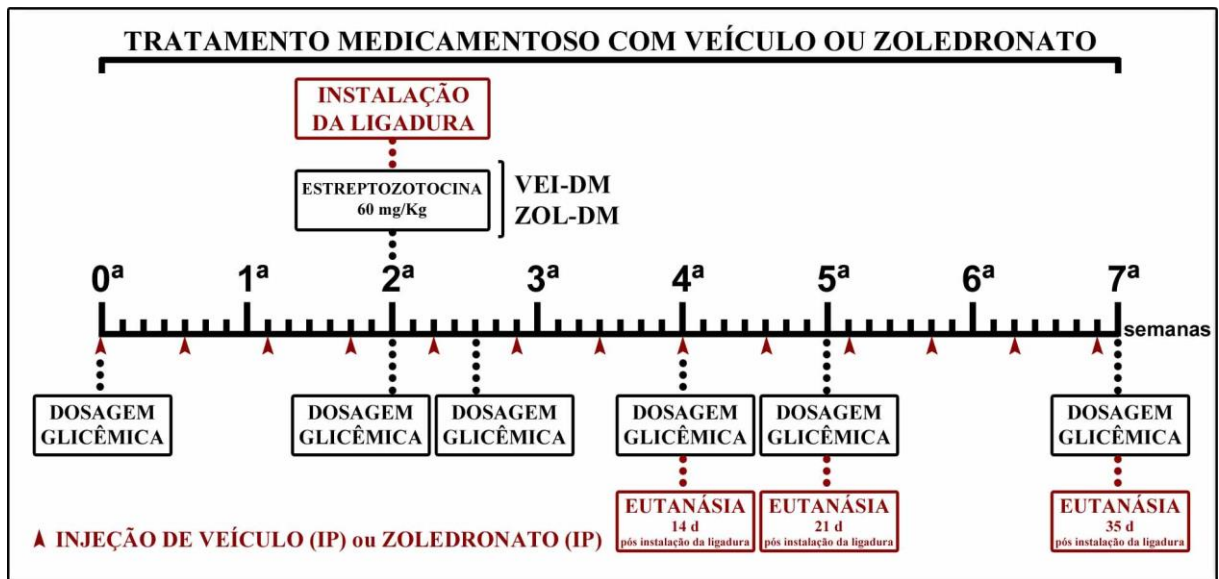
24. Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, et al. Antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaw: Position Paper 2017 of the Japanese Allied Committee on Osteonecrosis of the Jaw. *Bone Miner Metab* 2017; 35:6–19.
25. Otto S, Sotlar K, Ehrenfeld M, Pautke C. Osteonecrosis of the jaw as a possible rare side effect of annual bisphosphonate administration for osteoporosis: A case report. *J Med Case Rep* 2011; 5:477.
26. Shapiro JR, Boskey AL, Doty SB, Lukashova L, Blue ME. Zoledronic acid improves bone histomorphometry in murine model of Rett syndrome. *Bone* 2017; 99:1-7.
27. Messer JG, Mendieta Calle JL, Jiron JM, et al. Zoledronic acid increases the prevalence of medication-related osteonecrosis of the jaw in a dose dependent manner in rice rats (*Oryzomys palustris*) with localized periodontitis. *Bone* 2018; 108:79-88.
28. Soundia A, Hadaya D, Esfandi N, et al. Zoledronate Impairs Socket Healing after Extraction of Teeth with Experimental Periodontitis. *J Dent Res* 2018; 97(3):312-320.
29. Kimmel DB. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates - Review. *J Dent Res* 2007; 86(11):1022-33.
30. Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates - Review. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6(3):307-12.
31. Abe K, Yoshimura Y, Deyama Y, et al. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* 2012; 29(6):1007-1015.

32. Li DX, Deng TZ, Lv J, Ke J. Advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) induce apoptosis of periodontal ligament fibroblasts. *Braz J Med Biol Res* 2014; 47(12):1036-43.
33. Sanz M, Ceriello A, Buysschaert M, et al. Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017 Dec 5. [Epub ahead of print]
34. Jiang ZL, Cui YQ, Gao R, et al. Study of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and LPS levels in the gingival crevicular fluid of a rat model of diabetes mellitus and periodontitis. *Dis Markers* 2013; 34(5):295-304.
35. Lam JK, Wang Y, Shiu SW, Wong Y, Betteridge DJ, Tan KC. Effect of insulin on the soluble receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Diabet Med.* 2013 ;30(6):702-9.
36. Palermo A, D'Onofrio L, Buzzetti R, Manfrini S, Napoli N. Pathophysiology of Bone Fragility in Patients with Diabetes. *Calcif Tissue Int* 2017;100(2):122-132.
37. Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi C, Hebling J, De Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014; 43:1030-34.
38. Qi C, Pekala PH. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in adipocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223:128-35.
39. Moller DE. Potential role of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11(6):212-7.

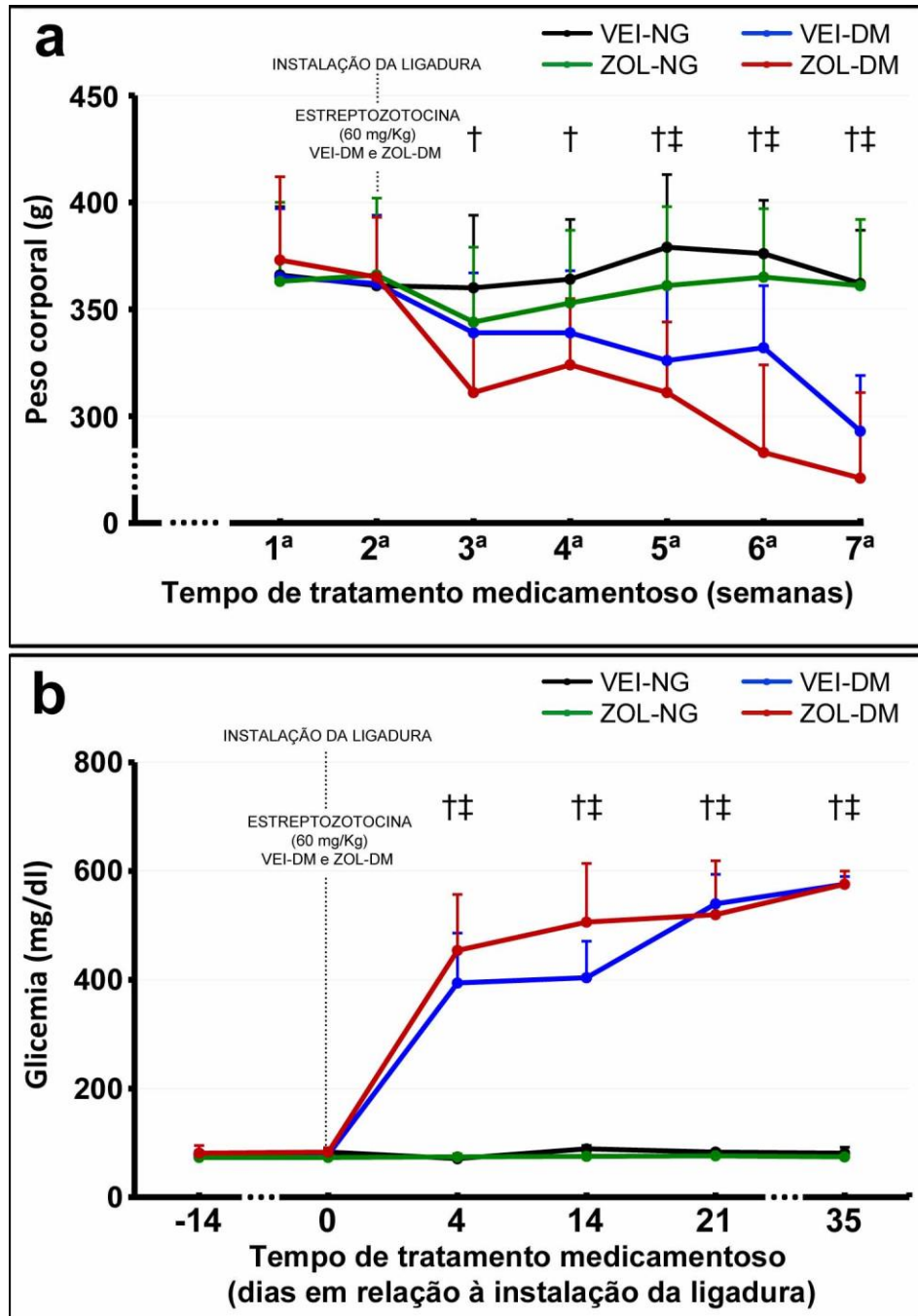
40. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259:87-91.

41. Iacopino AM. Periodontitis and Diabetes interrelationships: Role of Inflammation. *Ann Periodontol* 2001; 6:125-37.

*Figuras*

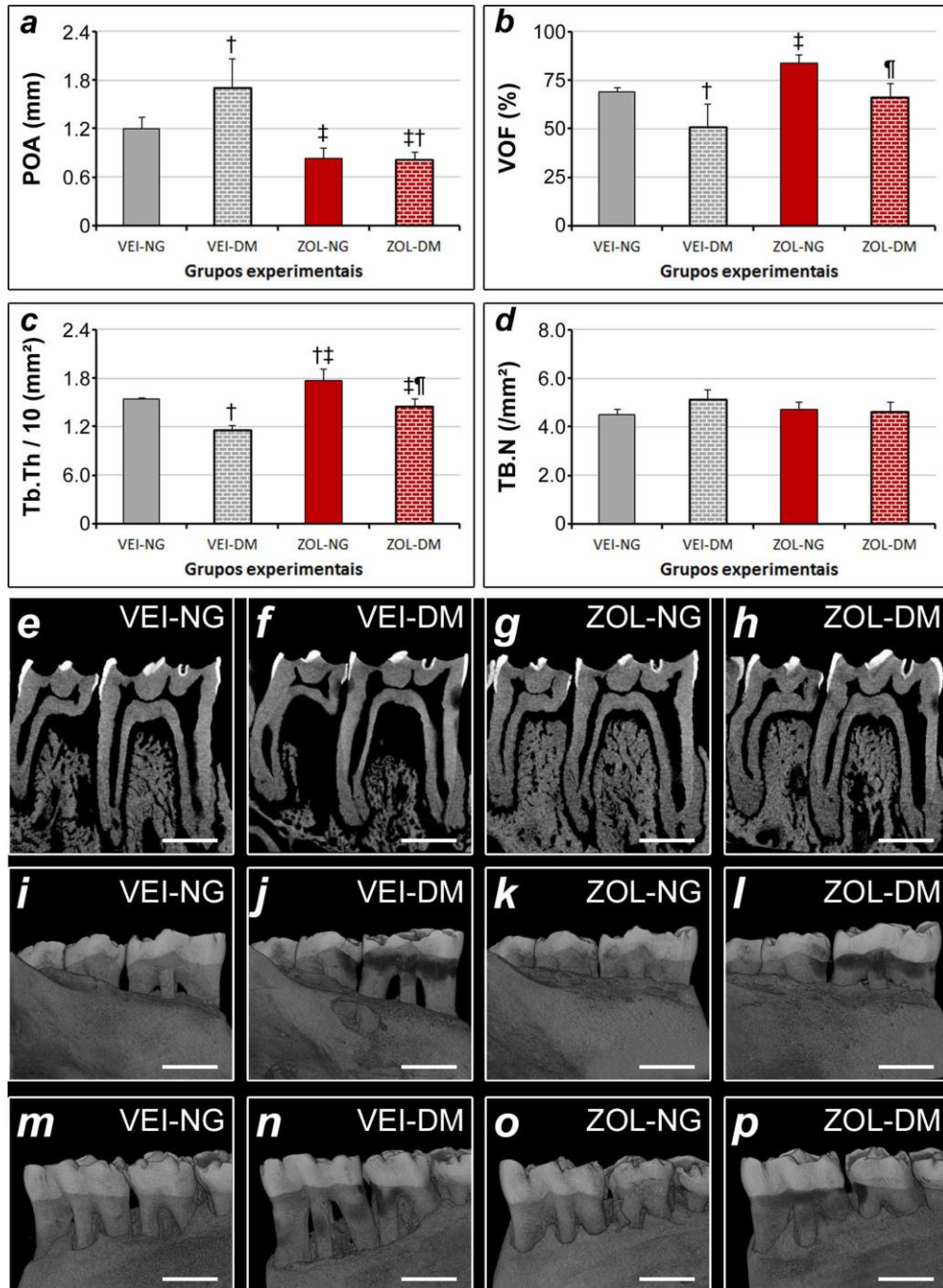


**Figura 1:** Esquema ilustrando o delineamento experimental do estudo e os procedimentos experimentais executados em seus respectivos intervalos de tempo nos grupos VEI-NG, VEI-DM, ZOL-NG e ZOL-DM.

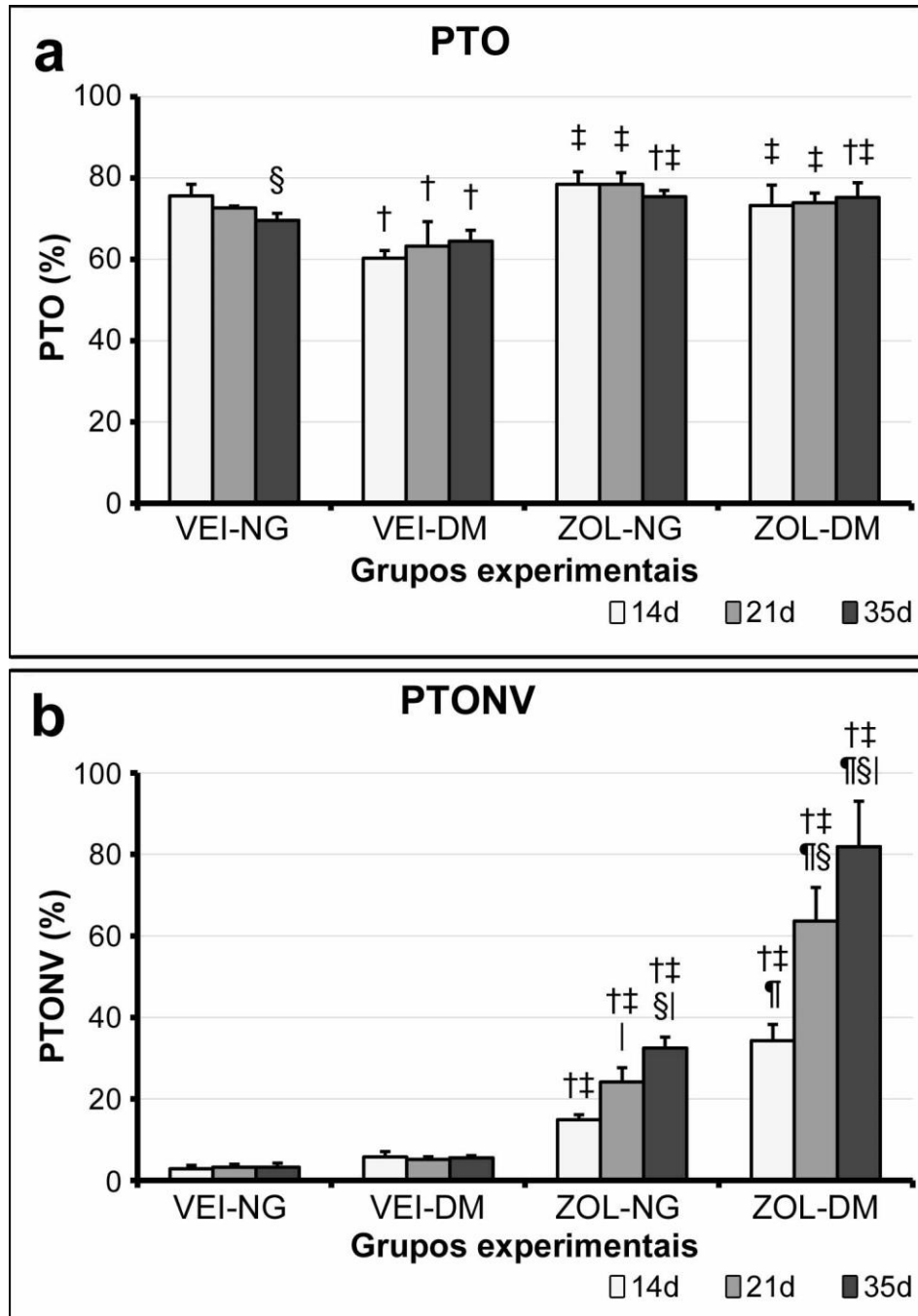


**Figura 2:** Gráficos evidenciando a evolução do peso corporal **(a)** e a dosagem glicêmica **(b)** ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato em VEI-NG, VEI-DM, ZOL-NG e ZOL-DM. Notar que aos 14 dias após o início do tratamento com veículo ou zoledronato os grupos VEI-DM e ZOL-DM foram submetidos à administração de estreptozotocina para indução do DM. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa quando se compara ZOL-NG e ZOL-DM, ‡, diferença estatisticamente significativa quando se compara SAL-NG e SAL-DM.

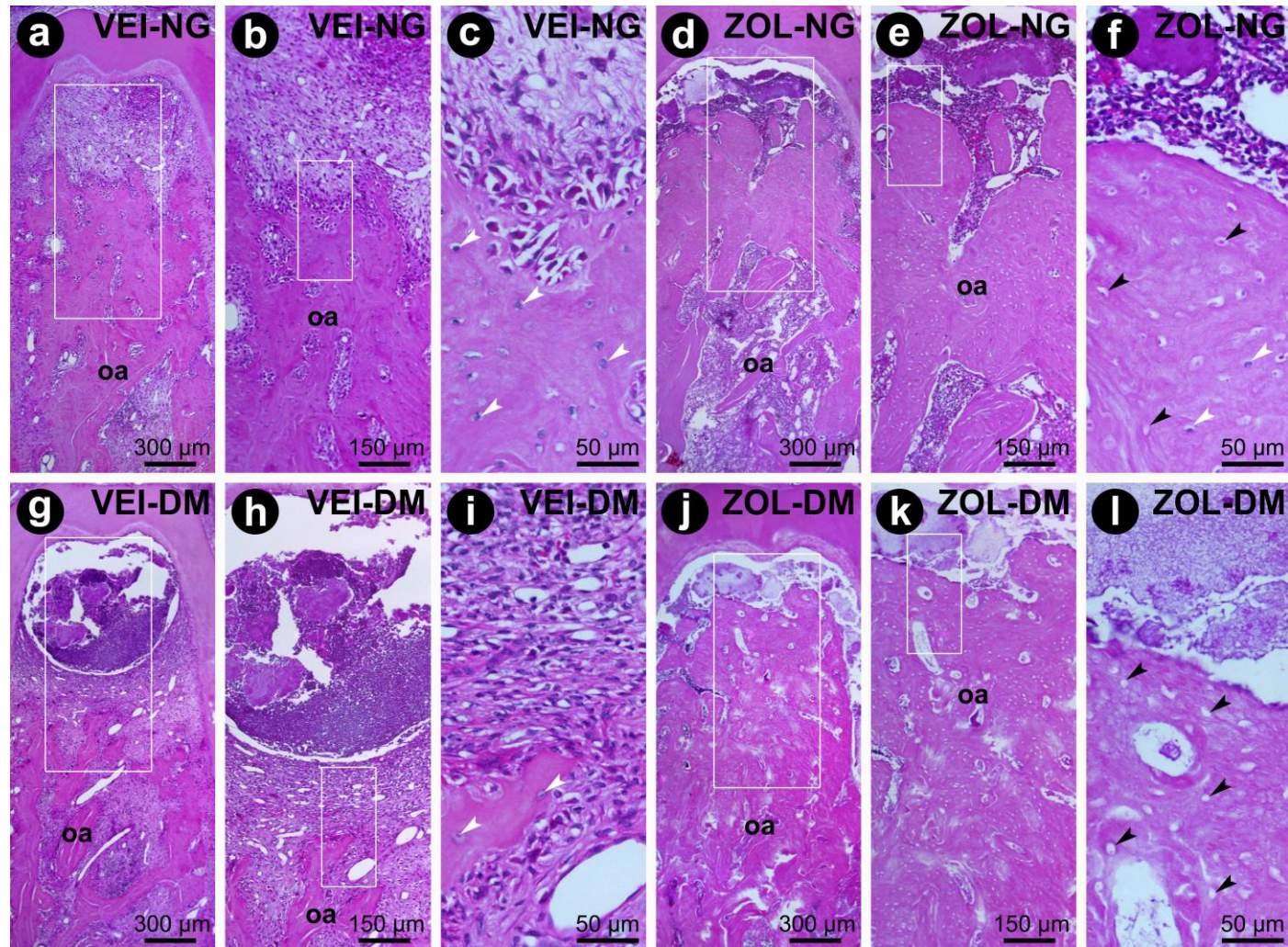




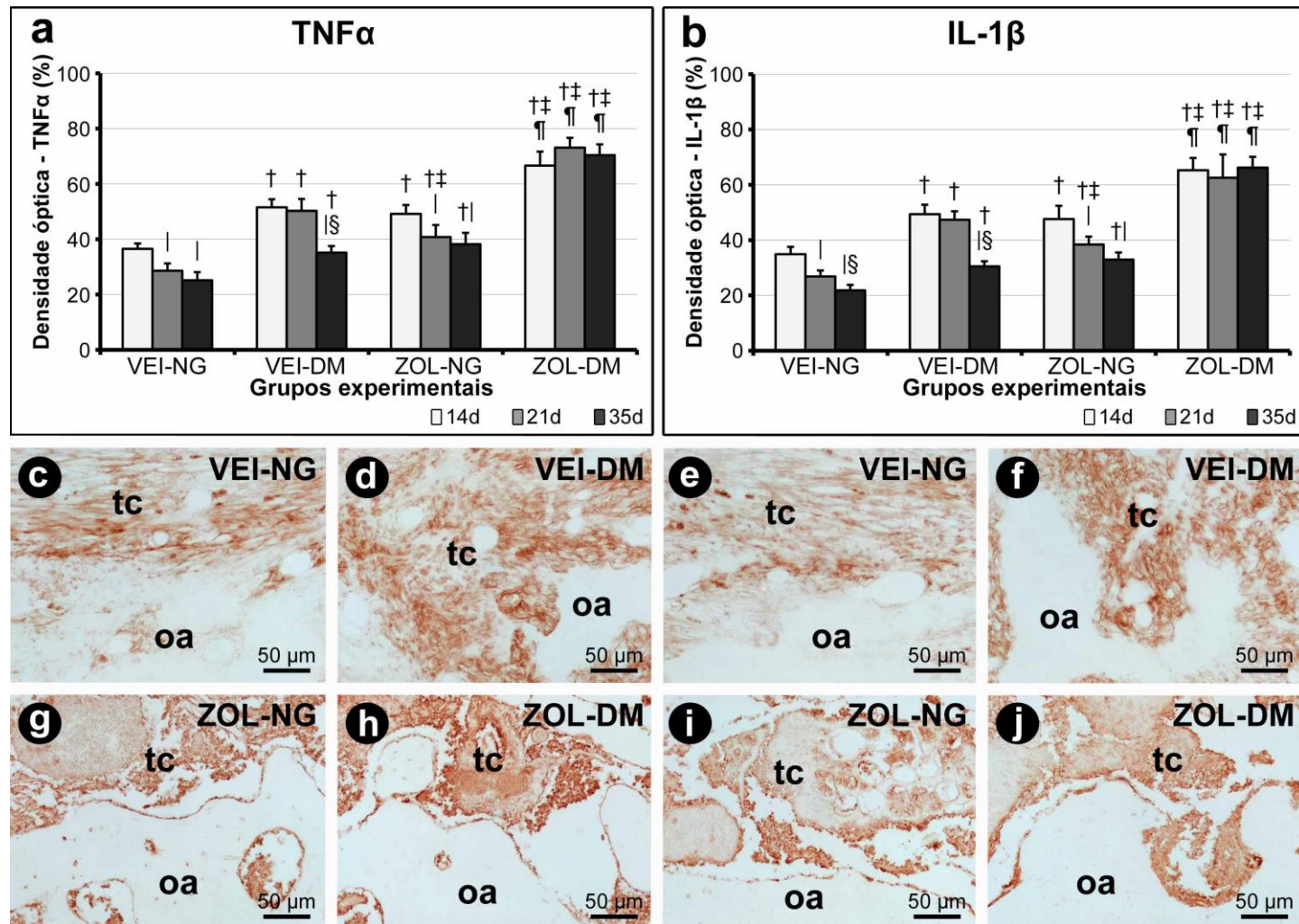
**Figura 3:** Aspecto microtomográfico do primeiro molar inferior e periodonto de inserção em VEI-NG, VEI-DM, ZOL-NG e ZOL-DM aos 35 dias pós instalação da ligadura: **a-d**: Gráficos evidenciando a perda óssea alveolar (POA) (**a**), o volume ósseo alveolar (VOF) (**b**), a espessura das trabéculas ósseas (Th.Tb) (**c**) e o número de trabéculas ósseas (**d**) na região de furca do primeiro molar inferior e periodonto de inserção. **e-h**: aspecto microtomográfico bidimensional do primeiro molar inferior e periodonto de inserção em VEI-NG (**e**), VEI-DM (**f**), ZOL-NG (**g**) e ZOL-DM (**h**). **i-l**: aspecto microtomográfico tridimensional do primeiro molar inferior e periodonto de inserção em VEI-NG (**i**), VEI-DM (**j**), ZOL-NG (**k**) e ZOL-DM (**l**). Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao VEI-NG, ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao VEI-DM, ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-NG.



**Figura 4:** Gráficos evidenciando a porcentagem de tecido ósseo (PTO) **(a)** e a porcentagem de tecido ósseo não vital (PTONV) **(b)** na região de furca do primeiro molar inferior aos 14, 21 e 35 dias pós-instalação da ligadura em VEI-NG, VEI-DM, ZOL-NG e ZOL-DM. Teste estatístico: ANOVA – Tukey. Abreviações e símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao VEI-NG no mesmo período; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao VEI-DM no mesmo período; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao ZOL-NG, |, diferença estatisticamente significativa intragrupo em relação aos 14d pós instalação da ligadura; §, diferença estatisticamente significativa intragrupo em relação aos 21d pós instalação da ligadura.



**Figura 5:** Fotomicrografias mostrando o aspecto histológico do primeiro molar inferior e periodonto de inserção aos 35 dias pós-instalação da ligadura em VEI-NG (a, b, c), ZOL-NG (d, e, f), VEI-DM (g, h, i) e ZOL-DM (j, k, l). Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar, setas brancas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias ou ocupadas por restos necróticos de osteócitos. Aumento original: a, d, g, j – 50x; b, e, h, k – 100x; c, f, i, l – 400x. Barras de escala: a, d, g, j – 300 $\mu$ m; b, e, h, k – 150 $\mu$ m; c, f, i, l – 50 $\mu$ m. Coloração: HE.



**Figura 6:** Imunomarcagem para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no periodonto de inserção do primeiro molar inferior aos 14 dias pós instalação da ligadura. Gráficos mostrando a densidade óptica de imunomarcagem para TNF $\alpha$  (a) e IL-1 $\beta$  (b) nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrografias evidenciando a imunomarcagem em VEI-NG (c, TNF $\alpha$ ; e, IL-1 $\beta$ ), ZOL-NG (d, TNF $\alpha$ ; f, IL-1 $\beta$ ), VEI-DM (g, TNF $\alpha$ ; i, IL-1 $\beta$ ) e ZOL-DM (h, TNF $\alpha$ ; j, IL-1 $\beta$ ). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; ao, osso alveolar. Aumento original: 400x. Barras de escala: 50 $\mu$ m.

*Tabelas*

**Tabela 1 - Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais.**

<b>ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA</b>												
<b>PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES</b>	<b>PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES</b>											
	<b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b>											
	<b>VEI-NG</b>			<b>VEI-DM</b>			<b>ZOL-NG</b>			<b>ZOL-DM</b>		
	<b>14d</b>	<b>21d</b>	<b>35d</b>	<b>14d</b>	<b>21d</b>	<b>35d</b>	<b>14d</b>	<b>21d</b>	<b>35d</b>	<b>14d</b>	<b>21d</b>	<b>35d</b>
<b>INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL</b>												
(0) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(1) pequena quantidade de células inflamatórias	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(2) moderada quantidade de células inflamatórias	60	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(3) alta quantidade de células inflamatórias	40	-	-	80	80	100	100	100	100	-	-	-
(4) quantidade extremamente alta de células inflamatórias	-	-	-	20	20	-	-	-	-	100	100	100
<b>EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO</b>												
(0) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(1) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(2) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca	80	100	100	-	100	100	-	-	-	-	-	-
(3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e parte do tecido ósseo da região de furca	20	-	-	100	-	-	100	100	100	-	-	-
(4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e todo o tecido ósseo da região de furca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	100
<b>REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR</b>												
(0) dentro dos padrões de normalidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(1) pequena quantidade de áreas de reabsorção	-	-	-	-	-	-	100	100	100	100	100	100
(2) moderada quantidade de áreas de reabsorção	20	20	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(3) alta quantidade de áreas de reabsorção	80	80	60	100	100	100	-	-	-	-	-	-
(4) quantidade extremamente alta de áreas de reabsorção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA</b>												
(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	80	80	100	20	20	20	-	-	-	-	-	-
(3) desestruturação tecidual parcial com áreas de necrose	20	20	-	80	80	80	100	100	100	-	-	-
(4) desestruturação tecidual total com áreas de necrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	100
<b>PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO DA REGIÃO DE FURCA</b>												
(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	100	100	100	-	-	-	-	-	-
(3) moderada quantidade de áreas de osso tecido ósseo não vital	-	-	-	-	-	-	60	80	100	-	-	-
(4) alta quantidade de áreas de osso tecido ósseo não vital	-	-	-	-	-	-	40	20	-	100	100	100

*Anexos*

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

### *Journal of Periodontology* Author Instructions

**Updated May 2017**

*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](#).<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

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

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](http://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](http://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](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](http://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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](http://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](mailto:jerry@perio.org)

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Periodontite experimental em ratas diabéticas submetidas à terapia com dose oncológica de zoledronato: avaliação da progressão da doença, da segurança e da efetividade do tratamento com raspagem e alisamento radicular**", Processo FOA nº 00533-2016, sob responsabilidade de Edilson Ervolino apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 03 de Agosto de 2016.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 01 de Outubro de 2018.


**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 01 de Novembro de 2018.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Experimental periodontitis in diabetic female rats under oncological dosage therapy with zoledronic acid: evaluation of disease progression, safety and effectiveness of scalling and root planing treatment**", Protocol FOA nº 00533-2016, under the supervision of Edilson Ervolino presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 03, 2016.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** October 01, 2018.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** November 01, 2018.

  
Prof. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira  
Coordenadora da CEUA  
CEUA 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@foa.unesp.br