



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Isabella Fernanda dos Santos

**Utilização de bisfosfonato e pentoxifilina na modulação óssea na periodontite
induzida. Estudo em ratos**

Araraquara

2021



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Isabella Fernanda dos Santos

Utilização de bisfosfonato e pentoxifilina na modulação óssea na periodontite induzida. Estudo em ratos

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Periodontia

Orientador: Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

Araraquara

2021

S237u	Santos, Isabella Fernanda dos Utilização de bisfosfonato e pentoxifilina na modulação óssea na periodontite induzida. Estudo em ratos / Isabella Fernanda dos Santos. -- Araraquara, 2021 67 f. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientadora: Rosemary Adriana Chierici Marcantonio 1. Periodontite. 2. Osteogênese. 3. Reabsorção óssea. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Isabella Fernanda dos Santos

Utilização de bisfosfonato e pentoxifilina na modulação óssea na periodontite induzida. Estudo em ratos

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Periodontia

Presidente e orientador Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

2º Examinador Juliano de Almeida Milanezi

3º Examinador Karina Gonzales Silverio Ruiz

Araraquara, 23 de junho de 2021.

DADOS CURRICULARES

Isabella Fernanda dos Santos

NASCIMENTO: 06 de maio de 1996 – Porto Ferreira – SP

FILIAÇÃO: Leo Fernando dos Santos
Adriana Maris Peripato

2014-2018 Curso de Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

2019-2021 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia – Nível Mestrado - Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr Universidade Estadual Paulista – UNESP.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Leo e Adriana, por todo o suporte dado até aqui. Aos meus avós José Valter e Elza (in memoriam). Obrigada por sempre acreditarem e mim e tenho certeza de que minha avó estaria muito feliz nesse momento.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Rosemary Adriana Chierici Marcantonio. Agradeço por todo o apoio nos piores e melhores momentos. Obrigada por ser essa mãezona para todos os orientados. Minha jornada como sua orientada começou em 2016 e termina aqui, mas sempre será lembrada com muito carinho e saudades. Meu eterno agradecimento por ter me ajudado a crescer tanto pessoal como profissionalmente, com certeza não sou a mesma Isabella de quando nos conhecemos e você tem grande parte nisso.

Ao meu namorado, Cassio. Sem ele não teria chegado até aqui. Obrigada por ser meu suporte em tudo. Todos os momentos que achei que não conseguiria você estava lá pra dizer que sim. Meu exemplo de ser humano e profissional.

Aos meus tios Andrea e Reinaldo, meu muito obrigada por todos os conselhos, acolhimento e carinho que sempre tiveram comigo.

À minha amiga Morgana, por sempre estar do meu lado mesmo que a distância.

Aos meus amigos que me acompanharam desde a graduação: Gabriela e Fernanda em especial. Obrigada por sempre estarem aqui por mim.

Aos meus amigos de pós-graduação. Fernanda que viveu tudo isso comigo, todas as noites no biotério operando ratos, todos os problemas que passamos, muito obrigada. Maria Eduarda, obrigada por todo apoio tanto pessoal quanto nessa dissertação. Camila, obrigada pela ajuda com os dados do trabalho e com tudo que precisei nesse caminho. Isis, que bom que deu tempo de te conhecer, obrigada por todo o carinho que sempre teve comigo.

Aos funcionários do departamento, especialmente Ana Claudia, Suleima e Isabela, agradeço por sempre terem sido tão solícitas.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de sua Diretora, Prof. Dr., Edson Alves de Campos e do Vice-Diretor, Profa. Dra. Patricia Petromilli Nordi Sasso Garcia, responsável pela minha formação e pela estrutura oferecida para a realização dessa pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa de Periodontia, sempre dispostos a ensinar, pela disponibilidade e dedicação ao programa e aos seus alunos.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/24717-5) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Santos IF. Utilização de bisfosfonato e pentoxifilina na modulação óssea na periodontite induzida. Estudo em ratos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

Este projeto teve como objetivo avaliar o processo de reparo ósseo periodontal utilizando pentoxifilina (50 mg/kg/dia) na prevenção e/ou tratamento da doença periodontal induzida. Este projeto foi dividido em 2 estudos: Estudo 1: avaliar os efeitos da pentoxifilina na interferência da progressão da doença periodontal induzida. Os animais foram divididos: Grupo controle - soro (C), Grupo pentoxifilina (PTX) e Grupo bisfosfonato (BIS). Os animais receberam durante 60 dias um dos medicamentos; após este período foi induzida a doença periodontal utilizando ligaduras na região de segundo molar. Neste momento a administração dos medicamentos foi interrompida. Após 15 dias os animais foram eutanasiados. Os resultados demonstraram na análise microtomográfica um resultado semelhante entre pentoxifilina e controle, na análise histométrica uma menor perda óssea no grupo PTX na região interproximal e a análise estereométrica apontou um maior grau de inflamação no grupo que recebeu pentoxifilina. Como conclusão tem-se que a pentoxifilina não teve efeito na perda óssea. Estudo 2: avaliar a pentoxifilina no tratamento da doença periodontal induzida. Os animais foram divididos em: Controle - soro (C); Grupo pentoxifilina (PTX); Grupo bisfosfonato (BIS). No momento de indução da doença periodontal com ligaduras os animais foram submetidos a administração de um dos medicamentos até o momento da eutanásia. Após 15 dias as ligaduras foram removidas. Neste momento, metade dos animais de cada grupo recebeu raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais (Controle - CR; Grupo pentoxifilina (PTX-R); Grupo bisfosfonato - BIS-R) e outra metade dos animais de cada grupo não recebeu nenhum tratamento (Controle - C; Grupo pentoxifilina (PTX); Grupo bisfosfonato - BIS). Após os períodos de 7, 15 e 30 dias os animais foram eutanasiados. Os animais dos grupos que receberam pentoxifilina apresentaram maior porcentagem de vasos sanguíneos, menor de tecido conjuntivo na análise estereométrica, e maior grau de inflamação no grupo BIS-R. As análises histométrica e microtomográfica demonstraram um resultado menos satisfatório nos períodos iniciais nos grupos que receberam raspagem, que após a partir do período 15 passaram a ter uma menor perda óssea. Foi possível concluir que os grupos PTX e PTXR apresentaram resultado positivo na formação óssea.

Palavras – chave: Periodontite. Osteogênese. Reabsorção óssea.

Santos IF. Use of bisphosphonates and pentoxifylline on induced periodontitis bone modulation. Study in rats. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the process of periodontal bone repair when using pentoxifylline (50 mg/kg/day) on the prevention and/or treatment of induced periodontal disease. This project was separated in 2 studies: Study 1: to evaluate if pentoxifylline interfere on the progression of induced periodontal disease. Animals were divided in: Control Group – saline (C); Pentoxifylline Group (PTX) and Bisphosphonate Group (BIS). The animals received the medicines for 60 days; then periodontal disease was induced by ligatures on the second molar. In the moment the medicines administration was interrupted. After 15 days the animals were euthanized. The results demonstrated in the microtomographic analysis a similar result between pentoxifylline and control, in the histometric analysis less bone loss in the PTX group in the interproximal region was found and stereometric analysis showed a greater degree of inflammation in the group that received pentoxifylline. It was concluded that pentoxifylline had no effect on bone loss. Study 2: to evaluate if pentoxifylline interfere on the treatment of induced periodontal disease. Animals were divided in: Control Group – saline (C); Pentoxifylline Group (PTX) and Bisphosphonate Group (BIS). By the time the ligatures were made the animals started receiving the medicines until the moment they were euthanized. After 15 days the ligatures were removed. At this moments half of the animals received scaling and root planning with hand instruments (Control – CR, Pentoxifylline Group- PTX-R, and Bisphosphonate Group - BIS-R) and the other half of each group didn't receive any treatment (Control – CR, Pentoxifylline Group – PTX, and Bisphosphonate Group - BIS). After the periods 7, 15 and 30 days the animals were be euthanized. The animals in the groups that received pentoxifylline had a higher percentage of blood vessels, less of connective tissue in the stereometric analysis, and a higher degree of inflammation in the BIS-R group. Histometric and microtomographic analyzes showed a less satisfactory result in the initial periods in the groups that received scaling and root planning, which after the period of 15 days started to have less bone loss. It was possible to conclude that the PTX and PTXR groups had a positive result in bone formation.

Keywords: Periodontitis. Osteogenesis. Bone resorption.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3 PUBLICAÇÕES	18
3.1 Estudo 1.....	18
3.2 Estudo 2.....	32
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
5 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS.....	51
APÊNDICE A – MATERIAL E MÉTODOS	59
ANEXO A – CERTIFICADO DE COMITÊ DE ÉTICA.....	67

1 INTRODUÇÃO

Bactérias patogênicas que compõem o biofilme subgengival se proliferam na superfície radicular liberando peptídeos e antígenos que são difundidos através do epitélio para o tecido conjuntivo, resultando em uma resposta inflamatória crônica do hospedeiro^{1,2}. O desequilíbrio entre microbiota específica presente na superfície dentária supra e subgengival e hospedeiro promove a instauração da periodontite: doença inflamatória que acomete os tecidos de sustentação dos dentes¹⁻³.

As bactérias patogênicas promovem o início da inflamação do tecido conjuntivo sobre o periodonto, porém a resposta do hospedeiro é igualmente importante na degradação do tecido conjuntivo. Grande parte da destruição tecidual é causada por enzimas derivadas do hospedeiro, como metaloproteinases da matriz (MMPs), citocinas e prostanóides⁴. Sendo assim o equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios deve ser restaurado o mais rápido possível para que haja regressão da doença.

O tratamento da periodontite busca promover a redução da carga microbiana, através do tratamento periodontal não cirúrgico, que consiste na raspagem e alisamento radicular, tendo, portanto, uma ação local. Buscando melhorar os resultados do tratamento convencional novas estratégias terapêuticas coadjuvantes podem ser buscadas, como o uso de agentes que alterem a resposta do hospedeiro. Com esse intuito, uma redução do processo inflamatório desencadeado pelos periodontopatógenos^{1,2} pode ser uma alternativa através da administração de substâncias ou medicamentos, sistêmica ou localmente. Tais procedimentos poderiam, além de reduzir a resposta, impedir o processo de reabsorção e favorecer a neoformação óssea⁵. Dessa forma poderíamos agir em ambos os lados envolvidos da doença: biofilme, através do tratamento periodontal convencional, e hospedeiro, regulando sua resposta inflamatória.

Desta forma, tendo a doença periodontal um caráter multifatorial, sendo o desequilíbrio hospedeiro-microbiota fundamental para que haja doença, é oportuno avaliar se os medicamentos pentoxifilina e alendronato tem alguma influência na instalação e no tratamento da doença periodontal.

A pentoxifilina (3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)-xantina) é um derivado da metilxantina, sendo um inibidor não seletivo da fosfodiesterase, que atua

modificando a flexibilidade eritrocitária (característica que permite o transito de eritrócitos até capilares menores, atingindo assim todas as regiões), a adesão e a agregação das plaquetas^{6,7}. Como resultado tem-se a redução da viscosidade sanguínea e dilatação dos vasos, diminuindo o fibrinogênio e deprimindo a função dos granulócitos. Além disso ela atua na inibição de leucócitos⁸, agindo na modulação da liberação de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-10 e IL-17)^{6,7,9-18}.

Esse medicamento tem sido amplamente utilizado como um agente para o tratamento de distúrbios vasculares cerebrais e de doenças arteriais oclusivas. Estudos mostraram que a pentoxifilina atua prevenindo ou atenuando a ação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)^{19,20} possivelmente por meio da inibição da transcrição do RNA mensageiro do TNF- α ²¹.

Estudo de Horiuchi et al.¹¹ onde ratos receberam injeção subcutânea de pentoxifilina previamente à instalação de uma esponja de colágeno contendo proteína morfogenética humana (BMP-2) apontou que a administração desse medicamento aumentou a neoformação óssea e a concentração de cálcio no tecido ósseo através da indução de BMP-2.

Em 2002 Tsutsumimoto et al.²² demonstraram por meio de cultura celular mesenquimal de ratos que a pentoxifilina aumenta o nível de BMP-4, por meio da via de sinalização do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), uma vez que a inibição da fosfodiesterase resulta no aumento do cAMP intracelular⁷, induzindo dessa forma a diferenciação de células osteoprogenitoras.

No mesmo ano Kinoshita et al.²³ demonstraram em um estudo in vivo que injeções diárias de pentoxifilina estimularam a formação óssea e aumentaram a massa óssea em ratos. Além disso, associado ao efeito sobre o cAMP houve também o estímulo da produção de prostaglandinas não-inflamatórias das séries E e I (PGE₂, PGI₂) pelo endotélio vascular²⁴⁻²⁶.

Em 2004 Lima et al.²⁷ realizaram um estudo em que ratos foram divididos em grupos controle, pentoxifilina e talidomida. Foi realizada análise histológica baseada no influxo de células, integridade do cemento e quantidade de tecido ósseo. A pentoxifilina apresentou efeito protetivo na doença periodontal, com uma menor perda óssea alveolar diretamente proporcional ao aumento da dose do medicamento. Os autores sugerem que estes resultados podem ser devido a um

papel importante do TNF- α na patogênese da doença periodontal, uma vez que a pentoxifilina tem efeito sobre essa citocina e a mesma foi capaz de prevenir o infiltrado inflamatório e a perda óssea.

Queiroz-Junior et al.¹⁴., em 2013 realizam estudo com ratos machos que receberam indução de artrite reumatoide e foram tratados com injeções diárias de pentoxifilina (50 mg/kg) preventiva ou terapêutica. 14 dias após a indução da artrite os animais foram eutanasiados e foram realizadas análises microscópica e imuno-histoquímica. Os resultados obtidos demonstraram que a pentoxifilina promoveu efeitos anti-inflamatórios e protetivos ao osso quando usada de forma terapêutica ou preventiva com redução de TNF- α nos tecidos maxilares.

Em 2014 Labib, Farid²⁸ avaliaram in vitro e in vivo (coelhos) o uso de gel contendo pentoxifilina (1% ou 3%) ao redor de implantes. Os resultados in vitro demonstraram que, uma mistura de gel e pentoxifilina, apresentam liberação da droga durante 24hs, boa bioadesão e bom espalhamento. Na avaliação in vivo, foi observado uma diferença significativa na quantidade óssea quando foi usado o gel a 3%, além de apresentar osso mais organizado quando comparado ao grupo controle.

Atalay et al.²⁹, em 2015 apontaram um efeito benéfico na cicatrização óssea após fratura femoral em ratos ($p < 0,05$). Os animais foram divididos em grupos e eutanasiados nos períodos de 21 e 30 dias, para realização de análise histopatológica. Os resultados demonstraram aumento no volume ósseo e cartilaginoso no grupo que recebeu pentoxifilina (50 mg/kg/dia via injeção intraperitoneal) além de um maior nível de modulação óssea.

Revisão sistemática e meta-análise de Brie et al.³⁰, de 2016 com 15 estudos clínicos randomizados, onde a pentoxifilina era administrada por via oral (variando de 400 a 600mg/dia) com o objetivo de avaliar o impacto da pentoxifilina na pressão sanguínea, concentração de TNF- α plasmático, proteína C-reativa e de IL-6, demonstrou uma significativa redução dos níveis plasmáticos de TNF- α e proteína C-reativa.

Pal et al.³¹, em 2019 concluíram que a administração de pentoxifilina restaurou massa, força e propriedades minerais ósseas por meio de um mecanismo anabólico, sendo um medicamento com potencial osteogênico para tratamento da osteoporose.

No mesmo ano estudo de Farahani et al.³² concluiu que houve um efeito antirreabsortivo no grupo de animais que receberam pentoxifilina após fratura óssea.

O mesmo grupo em outro trabalho³³ em 2019 demonstrou reversão da osteopenia em ratas ovariectomizadas após a administração de pentoxifilina. Esse medicamento aumentou a expressão de fator de crescimento endotelial e seus receptores em ossos e osteoblastos e também do marcador de formação óssea PINP.

Em 2020 Gorji et al.³⁴ demonstraram melhora da reparação óssea em 60 ratos que tiveram fratura mandibular e recebiam administração de pentoxifilina. Os animais foram divididos em grupos de acordo com o medicamento que seria administrado (sildenafil, pentoxifilina ou placebo) e com o período em que seriam sacrificados (1 semana ou 4 semanas). A taxa de reparo ósseo no grupo que recebeu sildenafil ($p=0,001$) e no que recebeu pentoxifilina ($p=0,004$) foi significativamente maior do que o grupo controle no período de 4 semanas.

Os bisfosfonatos são uma classe de medicamentos moleculares semelhantes ao pirofosfato inorgânico, que tem sido utilizado em pacientes com osteoporose, por serem inibidores da mineralização óssea e por alterarem o metabolismo desse tecido³⁵⁻³⁸.

A administração desses medicamentos pode ser por via oral ou endovenosa. Bisfosfonatos administrados por via endovenosa, tem efeito mais potente devido a sua alta disponibilidade no organismo. Já os administrados por via oral, apresentam-se em baixa disponibilidade, devido a sua taxa de absorção e excreção e são usados no tratamento de pacientes com osteoporose^{39,40}. São substâncias resistentes a degradação biológica, uma vez que não sofrem hidrólise; tal fato se deve a presença de uma ligação de fósforo-carbono-fósforo (P-C-P), o que os diferencia do pirofosfato⁴¹⁻⁴³. O mecanismo de ação dos bisfosfonatos se dá pela inibição da reabsorção óssea feita pelas células osteoclásticas, através de quatro mecanismos: indução de apoptose^{44,45}, inibição do recrutamento para a superfície óssea⁴⁶, da adesão dessas células⁴⁷ e da atividade osteoclástica na superfície do osso^{48,49}. A inibição da reabsorção resulta na estabilização da perda óssea ocasionada por doenças metabólicas e aumento da densidade mineral⁵⁰. Devido a sua afinidade pelo cálcio (encontrado na hidroxiapatita) seu local de ação se dá na superfície óssea no processo de reabsorção⁵¹.

A ação sobre osteoclastos já é comprovada na literatura, porém vários estudos têm demonstrado a ação indireta dos bisfosfonatos em osteoblastos, impedindo o turnover ósseo ou neoformação óssea^{52,53}. Estudos demonstram outros efeitos dos bisfosfonatos, como: capacidade de alterar o mecanismo de anfigênese^{54,55} e diminuir os níveis de fator de crescimento endotelial (VEGF) quando usados de maneira crônica^{56,57}. Portanto, a diminuição da quantidade de osteoclastos pelos bisfosfonatos, altera indiretamente a vascularização óssea^{58,59}, de acordo com Schoutens et al.⁶⁰, o aumento da vascularização óssea é proporcional ao número de osteoclastos. Esses efeitos podem resultar em lesões ósseas necrosantes em pacientes que fazem uso destes medicamentos quando submetidos a alguns procedimentos odontológicos⁶¹⁻⁶⁴.

No ano de 1992 Brunsvold et al.⁶⁵, realizaram estudo em 27 macacos que receberam alendronato (0,05mg/kg ou 0,25mg/kg) ou placebo (solução salina) por via endovenosa a cada 2 semanas durante 4 meses. Uma semana após a primeira administração do medicamento os molares e pré-molares mandibulares direitos receberam uma ligadura de algodão para indução da doença periodontal e 2 semanas após todos os dentes com ligaduras receberam inoculação de *Porphyromonas gingivalis*. Esse processo foi repetido em 2 semanas. Medidas clínicas e radiográfica foram tomadas no início do experimento, 8 e 16 semanas do início do estudo. O alendronato na concentração de 0,05 mg/kg retardou a progressão da doença periodontal quando foram medidas mudanças na densidade óssea através de um programa de densitometria que usou radiografias periapicais. Esse medicamento em uma maior concentração não diferiu do grupo placebo.

O mesmo grupo⁶⁶ em 1994 avaliou o efeitos do alendronato na perda óssea causada pela doença periodontal também em macacos. Seguindo os mesmos materiais e métodos do estudo anterior realizaram análise histomorfométrica. Os resultados foram semelhantes ao estudo anterior: os animais que receberam alendronato com concentração de 0,05 mg/kg mostraram significativa redução na perda óssea induzida pela doença periodontal.

Em 1995 Reddy et al.⁶⁷ realizaram estudo em cães que desenvolviam doença periodontal naturalmente, os quais foram divididos em dois grupos dependendo da severidade da doença periodontal inicial. Um grupo recebeu 3 mg/kg de alendronato

semanalmente por via oral e o outro placebo. A doença periodontal foi agravada pela instalação de ligaduras durante 3 meses. Dados clínicos como nível de inserção, índice gengival, de placa e mobilidade foram avaliados no baseline e em intervalos de 1 mês. Além disso houve a realização de radiografias no baseline, 3 e 6 meses, por meio das quais foi realizado um cálculo de miligramas de osso equivalente (massa óssea). Os resultados apresentaram uma diferença na quantidade óssea ($p < 0,001$) entre os grupos, onde os animais que receberam alendronato apresentaram 14mg enquanto o grupo placebo -4mg. O uso de alendronato não trouxe diferença nos parâmetros de inflamação gengiva e de quantidade de placa bacteriana. Houve também uma tendência de menor perda de inserção e mobilidade no grupo teste.

Estudo de Rocha et al.⁶⁸ em 2004 avaliou o efeito de 6 meses de tratamento com alendronato (10 mg/dia) na doença periodontal em mulheres no período pós-menopausa. Todas as voluntárias receberam tratamento periodontal convencional e antes e após essa intervenção foram realizadas algumas análises como: avaliação clínica, medição da distância entre crista óssea e junção cimento-esmalte e densidade mineral óssea. Os resultados mostraram uma maior melhora da profundidade de sondagem e sangramento a sondagem no grupo que usavam alendronato além de melhora dos marcadores sistêmicos. Chegou-se à conclusão de que o uso de alendronato trouxe melhoras na doença periodontal e no turnover ósseo.

Em 2005 Lane et al.⁶⁹, realizaram estudo clínico com 66 pacientes que receberam bisfosfonato por via oral durante 12 meses. Todos receberam tratamento periodontal não-cirúrgico e acompanhamento a cada 3 meses. Os participantes tiveram alguns parâmetros clínicos analisados no baseline, 6 meses e 12 meses. Os resultados demonstraram melhora nos parâmetros periodontais analisados: nível de inserção clínica, profundidade de sondagem e sangramento a sondagem.

Sharma, Pradeep⁷⁰ em 2012 avaliaram a eficácia clínica de um gel de alendronato 1% como adjunto ao tratamento periodontal convencional. 17 pacientes com defeitos infra-ósseos receberam o gel ou placebo. Parâmetros clínicos foram avaliados no baseline, 2 meses e 6 meses além de radiografias realizadas nos primeiro e último tempos de acompanhamento. O ganho de inserção e a diminuição

da profundidade de sondagem foram maiores no grupo que recebeu o gel de alendronato, o que demonstrou que seu uso tópico estimulou uma melhora significativa do quadro de doença periodontal.

Estudo de Tanna, Jeffcoat⁷¹ em 2013 foi realizado com 125 pacientes com periodontite de moderada a severa que receberam tratamento periodontal e após 3 meses na manutenção foram divididos de forma aleatória em grupo teste (administração de risedronato) ou placebo. Após 9 meses do início do tratamento, foram realizadas avaliações clínicas finais. Os resultados demonstraram resultado mais favorável em relação a altura óssea no grupo teste ($p < 0,04$) e não foram encontrados efeitos adversos.

No ano de 2016 Bhavsar et al.⁷², avaliaram o efeito de um bisfosfonato como adjunto no tratamento da doença periodontal crônica em mulheres pós-menopausa. Foram realizadas radiografias periapicais, avaliação de parâmetros clínicos e medição da densidade óssea por meio de tomografia computadorizada de feixe cônico. Os resultados demonstraram uma melhora na densidade óssea (118.56 ± 3.251 HU), no ganho de inserção (3.57 ± 0.234 mm) e na diminuição da profundidade de sondagem (2.20 ± 0.229 mm). A melhora obtida nas pacientes desse estudo sugere que a terapia com bisfosfonato como adjunto ao tratamento periodontal básico pode trazer benefícios clínicos ao periodonto.

Em 2017 Akram et al.⁷³ realizaram uma revisão sistemática para avaliar a eficácia da terapia com bisfosfonato como adjuvante da raspagem e alisamento radicular (RAR) no tratamento da periodontite. Oito estudos clínicos foram incluídos na revisão, sete estudos utilizaram o alendronato como adjuvante da RAR. Destes, quatro estudos utilizaram aplicação tópica e três utilizaram alendronato oral. Os resultados da meta-análise demonstraram redução da doença periodontal estatisticamente significativa ($p = 0,002$), ganho de nível clínico de inserção ($p = 0,008$) e preenchimento do defeito ósseo ($p < 0,001$) para o tratamento com raspagem + bisfosfonato em comparação somente a raspagem.

Estudo de Messer et al.⁷⁴ em 2018 avaliou em ratos se a dose e duração do tratamento com bisfosfonato induz lesões de osteonecrose em periodontite induzida através de impactação alimentar. Foi observada ocorrência de osteonecrose nos

animais que fizeram uso de maiores doses do medicamento e não observaram correlação com a duração do tratamento.

Graziani et al.⁷⁵, em 2019 realizaram estudo clínico randomizado com 66 pacientes, os quais foram divididos em um grupo que recebeu raspagem e alisamento radicular + administração de bisfosfonato e outro que recebeu apenas o tratamento periodontal básico. Os pacientes passaram por exame periodontal no baseline, 3 meses e 6 meses após a primeira sessão de tratamento. Nos períodos analisados o uso de bisfosfonato não trouxe benefícios no reparo periodontal comparado a raspagem e alisamento radicular de forma isolada.

Embora a literatura demonstre que a pentoxifilina apresente efeito na modulação dos processos inflamatórios e de formação óssea, não existem evidências na utilização destes medicamentos na doença periodontal. Já o efeito dos bisfosfonatos ainda não está totalmente esclarecido. Baseado nisto, esse projeto busca avaliar, em animais, o processo de reparo ósseo periodontal utilizando estes medicamentos na prevenção e/ou tratamento da doença periodontal induzida.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo avaliar o processo de reparo ósseo periodontal utilizando o medicamento pentoxifilina na doença periodontal induzida em comparação a utilização de bisfosfonato.

2.2 Objetivos Específicos

Estudo 1: avaliar a pentoxifilina na indução da doença periodontal induzida.

Estudo 2: avaliar a pentoxifilina no tratamento da doença periodontal induzida.

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Estudo 1*

Efeito preventivo da pentoxifilina na doença periodontal induzida.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma doença inflamatória crônica caracterizada por infiltrado inflamatório, sangramento, reabsorção óssea e é uma das condições bucais mais prevalentes no mundo¹, sendo um grande desafio para a odontologia.

Grande parte da destruição periodontal é causada por enzimas derivadas do hospedeiro, como metaloproteinases da matriz (MMPs), citocinas e prostanóides². Sendo assim o equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios deve ser restaurado para que haja regressão da doença. Buscando restaurar esse equilíbrio podemos lançar mão do tratamento periodontal básico, principal estratégia no controle da doença, e da modulação da resposta do hospedeiro conjuntamente ao tratamento local.

O tratamento periodontal básico tem como objetivo a redução da carga microbiana por meio da remoção do biofilme dental. Já a modulação da resposta do hospedeiro busca uma diminuição da resposta inflamatória, reduzindo a produção de fatores pró-inflamatórios, almejando o reestabelecimento do equilíbrio microbiota-resposta do hospedeiro. Essa modulação pode ser alcançada pela administração de medicamentos de uso sistêmico³.

A pentoxifilina (3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)-xantina) é um derivado da metilxantina, sendo um inibidor não seletivo da fosfodiesterase, enzima que realiza a hidrólise de cAMP em AMP. O aumento de cAMP intracelular pode levar a diversos processos dependendo do tipo celular, dentre eles um efeito osteogênico pode ser alcançado. Ela age na modulação da liberação de citocinas inflamatórias⁴⁻⁶, principalmente do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)^{7,8}, um dos principais mediadores químicos da doença periodontal, possivelmente por meio inibição da transcrição do RNA mensageiro do TNF- α ⁹. Além disso apresenta uma ação também nas células e vasos sanguíneos³.

O alendronato faz parte do grupo dos bisfosfonatos, que são medicamentos que tem sido utilizado em pacientes com osteoporose, uma vez que seu mecanismo

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

de ação se dá pela inibição da reabsorção óssea. Quatro mecanismos estão envolvidos nesse processo: indução de apoptose^{10,11}, inibição do recrutamento para a superfície óssea¹², da adesão dessas células¹³ e da atividade osteoclástica na superfície óssea^{14,15}.

Baseado na carência de estudos pré-clínicos e clínicos da ação da pentoxifilina o objetivo deste estudo é avaliar o processo de reparo ósseo periodontal em ratos, utilizando o medicamento na doença periodontal induzida.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O protocolo experimental foi desenvolvido de acordo com os padrões éticos da Declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA 06/2017) (ANEXO A).

Vinte e um ratos (n=21) (*Rattus Norvegicus*), variação *albinus*, *Holtzman*, adultos, machos, com peso variando entre 180-220 gramas foram usados nesse estudo. Os animais foram mantidos em caixas com acesso a comida e água *ad libitum*, em ambiente com luz e temperatura controladas. Eles foram divididos em 3 grupos: controle (CT) (administração de soro fisiológico), pentoxifilina (PTX) e alendronato (BIS), com 7 animais/grupo.

Tratamentos

Os animais foram divididos randomicamente de acordo com o tratamento recebido. Todos os ratos receberam todos os medicamentos diariamente durante 60 dias, sendo que foi iniciada a administração 45 dias prévios a colação de ligaduras nos segundos molares superiores e mantidas por mais 15 dias até a eutanásia dos animais.

Os medicamentos foram administrados: No grupo PTX a pentoxifilina por gavagem (Medley Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 50 mg/kg¹⁶; no grupo BIS o alendronato por via subcutânea (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 1 mg/kg¹⁷ e no grupo CT o soro fisiológico por via subcutânea na concentração de 1mL/kg (APÊNDICE A).

Indução da Doença Periodontal

Para indução da periodontite foram colocadas ligaduras ao redor dos segundos molares superiores (direito e esquerdo). Os animais foram anestesiados com Quetamina (80 mg/kg) e Xilazina (7 mg/kg) e as ligaduras (fio de algodão número 24) foram inseridas na região subgingival dos dentes. Após 15 dias, os animais foram eutanasiados com uma sobre dose de anestésico.

Após a eutanásia foram removidas as hemi-maxilas e fixadas em formol tamponado a 10% por 48 horas. Após esse período as peças foram lavadas em água corrente e acondicionadas em álcool 70%.

Análise Microtomográfica (μ CT)

As amostras foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), utilizando cortes de 18 μ m (50Kv e 500 μ), filtro de Al 0.5mm; tamanho do voxel: 17,48 μ m; voltagem de 50KV e corrente elétrica de 500 μ A. Foi realizada a reconstrução das imagens obtidas do escaneamento através do software NRecon. Em seguida houve o posicionamento no plano axial com o uso do software DataViewer. Por fim no software CTAnalyser foram delimitadas duas regiões de interesse: uma maior que abrangeu o segundo molar até seus limites proximais com os dentes vizinhos (ROI 1) e uma delimitando as raízes (ROI 2) (limite apical de 1000 micrometros a partir do teto da furca). Obtidos os valores dos ROIs, foi feita a subtração ROI 1 – ROI 2 resultando no volume de tecido ósseo presente.

Análises Histológica e Histométrica

Após análise microtomográfica as peças foram lavadas em água corrente e foi iniciado o processo de descalcificação com EDTA 10% (ácido etilenodiamino tetra acético) durante 2 meses. Após esta fase as peças foram processadas para inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram feitos com 5 μ m de espessura no sentido frontal na direção vestibulo/palatina e colocados em lâminas para coloração pela técnica de hematoxilina-eosina. Foram obtidas fotomicrografias utilizando um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) acoplado a uma câmera de vídeo DXC-1107A/107AP (Sony Eletronics Inc, Japão).

Análise histológica

Um examinador cego para os grupos e treinado (FCG) avaliou as imagens obtidas, onde foram observadas: presença/ausência de reações inflamatórias do tecido conjuntivo, processos de reabsorção óssea e neoformação tecidual.

Análises histométrica e estereométrica

Para as análises histométrica e estereométrica um examinador cego para os grupos e calibrado (FCG) selecionou 3 lâminas de cada grupo (4, 8 e 12), equidistantes 45 µm entre si. As mensurações foram feitas utilizando o software de imagens ImageJ - Launcher versão 1.48b (National Institutes of Health, USA). As análises foram realizadas nas as regiões de furca e proximais.

Na região de furca após mensuração de 1000µm a partir do teto da furca foi delimitada uma área entre as raízes. Nesta região foi medida a área com osso presente¹⁸. Nas regiões proximal (mesial e distal) medidas lineares foram obtidas entre junção cimento-esmalte e crista óssea através de linhas horizontais traçadas na altura dessas estruturas.

A análise estereométrica foi realizada utilizando uma grade apresentando 130 pontos relativos à intersecção de retas horizontais e verticais. A grade foi colocada sobre as regiões interproximais e de furca e foi calculado o percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos. Os seguintes tipos teciduais e celulares foram analisados: tecido conjuntivo (T.c.), fibroblastos (Fb), tecido inflamatório (componentes celulares não identificáveis) (T.i.), células inflamatórias (macrófagos) (C.i.), vasos sanguíneos (Vs) e tecido ósseo (Os).

Análise Estatística

Os dados gerados foram submetidos ao teste de Normalidade de Shapiro-Wilk para avaliar se os dados respeitaram a distribuição de acordo com o teorema da distribuição central. Os testes paramétricos de Anova complementado pelo teste de Tukey foi utilizado para a análise inferencial dos dados. A significância estatística será definida em $p < 0,05$.

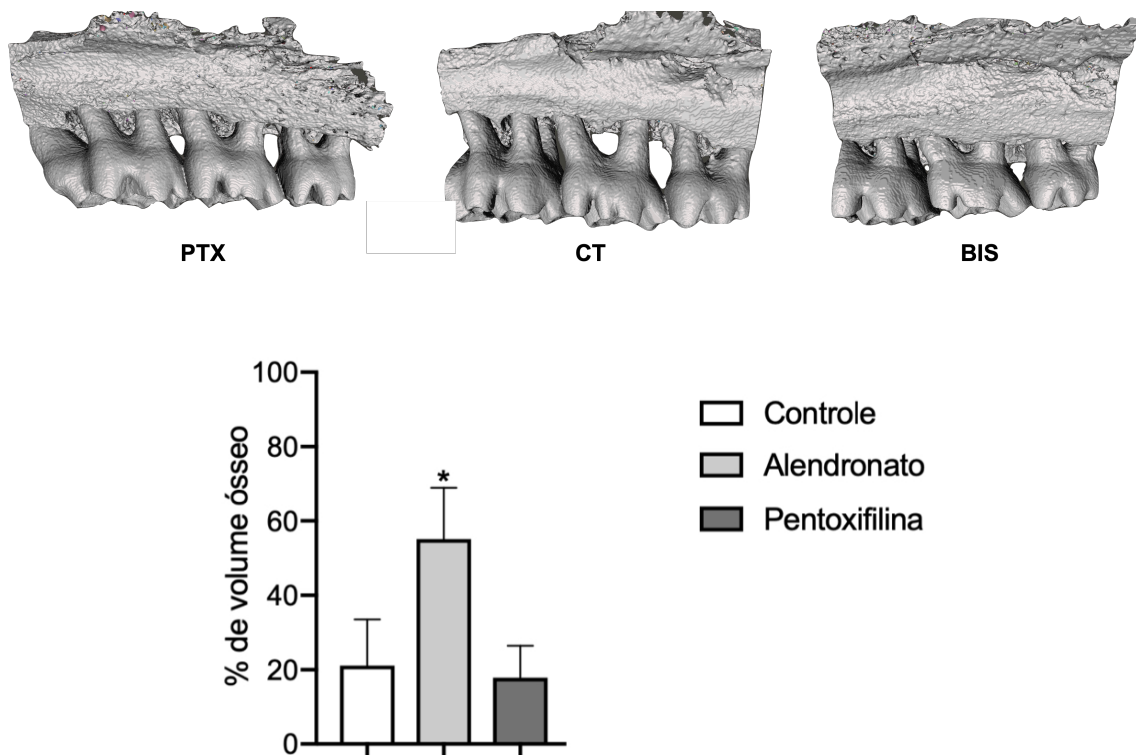
RESULTADOS

Todos os animais utilizados no presente estudo sobreviveram e receberam os cuidados necessários após o procedimento de colocação das ligaduras até o momento da eutanásia.

Análise Microtomográfica (μ CT)

O grupo BIS durante a indução da doença periodontal apresentou menor reabsorção óssea quando comparado com os grupos PTX e CT (Figura 1).

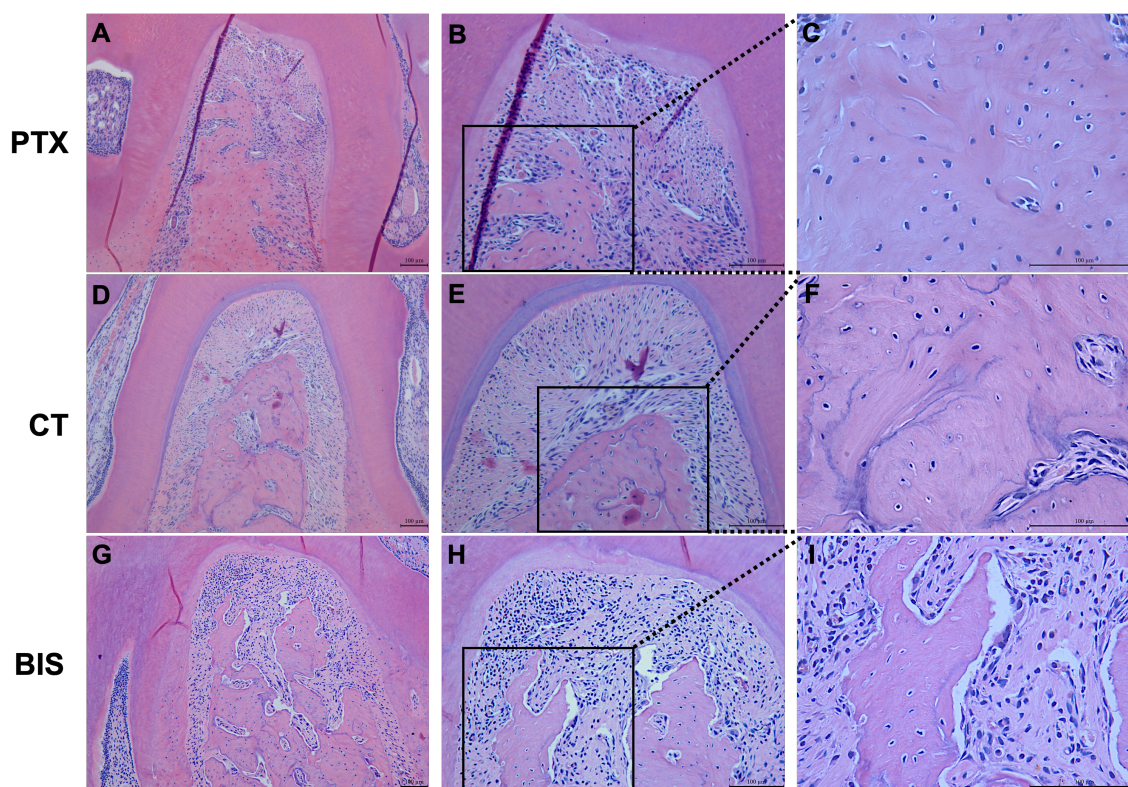
Figura 1 – Imagens em 3D representativas das regiões de primeiro, segundo e terceiros molares superiores dos animais, geradas por microtomografia computadorizada. O gráfico demonstra a porcentagem de tecido ósseo na região ao redor do segundo molar superior. O símbolo * demonstra diferença do grupo BIS em relação aos grupos CT e PTX ($p \leq 0,05$).



Fonte: Elaboração própria.

Análise Histológica

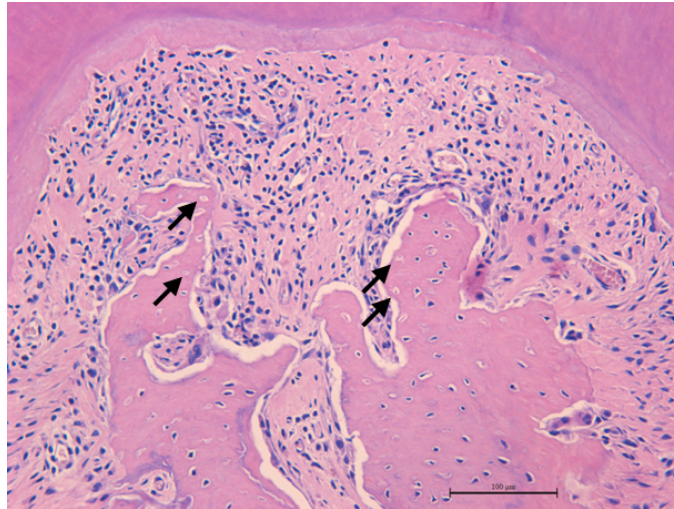
Figura 2 – Fotomicrografias das regiões de segundos molares superiores dos animais que foram submetidos a colocação de ligaduras. Nas imagens A, D e G pode-se observar a região de furca. As imagens B, E e H representam a mesma região com mais detalhes. Já as imagens C, F e I apresentam maior aumento e nota-se com maior clareza o tecido ósseo. HE, 10x, 20x e 40x.



Fonte: Elaboração própria.

Pode-se observar maior perda óssea no grupo CT. O grupo PTX apresenta processo inflamatório, diferentemente do grupo BIS, que apresenta menor perda óssea. No entanto no grupo BIS pode-se notar a presença de lacunas vazias onde haveria osteócitos, o que caracteriza a presença de osso não vital tanto na furca quanto nas proximais (Figura 3).

Figura 3 – Corte histológico mostrando lacunas com ausência de osteócitos na região de furca no grupo BIS (setas). HE, 20x.

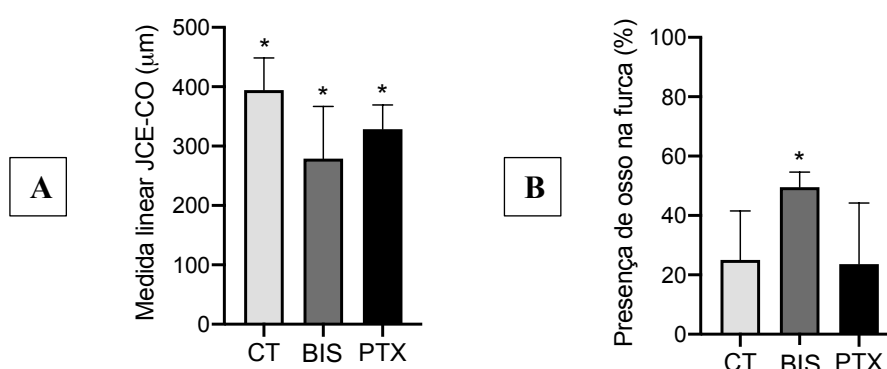


Fonte: Elaboração própria.

Análise Histométrica

Na região interproximal o grupo CT apresentou maior perda óssea, seguido do grupo PTX e, por fim, com melhor resultado, o grupo BIS ($p \leq 0.05$). Na região de furca o grupo BIS apresentou menor perda óssea em relação aos grupos C e PTX, sem, contudo, demonstrar diferença estatística.

Figura 4 - Imagem A: gráfico demonstrando os resultados da distância entre junção cimento-esmalte e crista óssea na região interproximal. Houve diferença estatística entre os grupos, com maior perda óssea nos grupos controle e PTX ($p \leq 0,05$). Imagem B: porcentagem de preenchimento ósseo na região de furca. O grupo BIS apresentou estatisticamente maior presença de tecido ósseo quando comparado com os grupos C e PTX ($p \leq 0,05$).



Fonte: Elaboração própria.

Análise Estereométrica

Na região subepitelial, o tecido conjuntivo (T.c.) e tecido inflamatórios (T.i.) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos. Já quando foi avaliado fibroblastos (Fb), o grupo CT apresentou valores maiores, estatisticamente, com relação ao grupo PTX. Nas avaliações de células inflamatórias (C.i.) e vasos sanguíneos (Vs) o grupo PTX apresentou maiores porcentagens quando comparado aos demais grupos, com exceção para o grupo CT na avaliação de C.i.

Na região supracristal, na avaliação de T.i. e C.i., o grupo BIS apresentou valores superiores aos demais grupos, CT e PTX. Diferentemente, na avaliação de Fb, o grupo BIS apresentou os menores valores. Na avaliação de T.c., o grupo controle apresentou se estatisticamente superior quando comparado ao grupo BIS. Na avaliação de Vs, não houve diferenças entre os grupos.

Por fim, na região de furca, as avaliações de T.c. e Osso (Os) o grupo BIS apresentou valores menores e maiores, respectivamente, quando comparado aos grupos CT e PTX. Nas demais avaliações, T.i., Fb, C.i. e Vs não houve diferenças estáticas entre os grupos.

Tabela 1 – Porcentagem (%) de tecido conjuntivo (T.c.), tecido inflamatório (T.i.), fibroblastos (Fb), células inflamatórias (C.i.), vasos sanguíneos (Vs) e tecido ósseo (Os) nas regiões subepitelial, supracristal e de furca. Pode-se observar diferença estatística no grupo PTX quando avaliados vasos sanguíneos e células inflamatórias, no grupo CT quando avaliados fibroblastos e tecido conjuntivo e no grupo BIS quando analisados tecido inflamatório, células inflamatórias, tecido conjuntivo e tecido ósseo ($p \leq 0,05$). ^a Diferença com todos os grupos ($p \leq 0,05$), ^b Diferença com o grupo BIS ($p \leq 0,05$), ^c Diferença com o grupo PTX ($p \leq 0,05$).

	Região subepitelial			Região supracristal			Região de furca		
	CT	BIS	PTX	CT	BIS	PTX	CT	BIS	PTX
T.c.	44,72 ± 10,00	44,62 ± 21,25	30,50 ± 13,35	64,65 ± 7,57 ^b	44,62 ± 21,25	57,34 ± 4,18	30,56 ± 13,96	14,12 ± 7,15 ^a	32,54 ± 19,62
T.i.	16,87 ± 6,59	15,21 ± 10,88	15,17 ± 5,38	0,00 ± 0,00	15,21 ± 10,88 ^a	0,00 ± 0,00	2,47 ± 5,09	5,32 ± 7,05	3,24 ± 5,67
Fb	25,26 ± 3,81 ^c	2,36 ± 7,03	19,76 ± 5,11	33,67 ± 7,22	21,36 ± 7,03	35,21 ± 7,06	31,11 ± 7,27	21,76 ± 19,53	26,59 ± 13,50
C.i.	14,01 ± 8,44	12,49 ± 10,43	22,72 ± 8,45 ^b	0,00 ± 0,00	12,49 ± 10,43 ^a	0,00 ± 0,00	14,44 ± 17,16	5,79 ± 8,74	21,43 ± 20,01
Vs	3,04 ± 4,30	1,63 ± 2,33	7,84 ± 3,81 ^a	1,68 ± 1,56	1,63 ± 2,33	3,31 ± 3,25	1,19 ± 2,19	0,00 ± 0,00	3,17 ± 5,42
Os	-	-	-	-	-	-	13,61 ± 17,64	51,85 ± 14,18 ^a	3,70 ± 6,00

Fonte: Elaboração própria.

DISCUSSÃO

Nesse estudo o efeito da pentoxifilina foi avaliado na indução de inflamação e perda óssea por meio de ligaduras em molares de ratos. Diante dos resultados apresentados estruturamos a discussão de acordo com análise e resultados expressivos em cada grupo.

Na análise histométrica obteve-se menores perdas ósseas nas regiões interproximais no grupo BIS, seguido pelo grupo PTX, em relação aos animais que não receberam medicação. Os resultados estão de acordo com estudos prévios que mostraram o efeito benéfico da administração de bisfosfonatos na doença periodontal induzida em animais^{19–24} onde os autores sugerem que isso acontece devido a uma menor reabsorção de tecido ósseo, através da inibição da atividade de osteoclastos. Os resultados demonstram que a administração de alendronato de sódio reduziu a reabsorção óssea, no entanto apesar desse resultado satisfatório teve-se como achado histológico a presença de osso não vital nas regiões de furca e proximais, sugestivo de um início de processos de osteonecrose dos maxilares associada a bisfosfonatos (OMAB). Estudo anterior de Aghaloo et al.²⁵ teve o

mesmo achado histológico acrescido da visualização de sequestro óssea em análise microtomográfica. No entanto neste estudo continuou-se a administração de bisfosfonato por 12 semanas após a colocação da ligadura, enquanto no presente estudo a administração foi mantida por apenas 2 semanas.

O resultado positivo do grupo PTX está em concordância com estudos anteriores, que demonstraram efeito benéfico da pentoxifilina na formação óssea^{26,27}. Esse medicamento age como inibidor de $\text{TNF-}\alpha^{7,8}$, citocina que tem um importante papel na destruição de tecidos de suporte na doença periodontal²⁸⁻³⁰. No entanto, um aumento da inflamação foi encontrado no grupo PTX, de acordo com a análise estereométrica. Tal fato pode ser explicado pela alteração promovida por esse medicamento na deformação de eritrócitos, viscosidade do plasma e reatividade plaquetária³¹, o que acarreta em maior facilidade de chegada de células do sistema imune até o sítio. Além disso foi demonstrada uma maior quantidade de vasos, podendo sugerir um efeito angiogênico.

Na análise estereométrica teve-se a identificação de células e tecido inflamatório no grupo BIS na região supracristal enquanto nos outros grupos não houve. Isso se deve ao fato de nesse grupo devido a pouca ou nenhuma perda óssea a imagem feita para essa análise era a mesma correspondente tanto à região subepitelial quanto à supracristal. Sendo assim, o componente inflamatório provavelmente se dá pela região subepitelial.

A análise microtomográfica demonstrou menor perda óssea no grupo BIS, o que concorda com os resultados histopatológicos. No entanto o grupo PTX apresentou um resultado estatisticamente igual ao grupo CT. Baseado nesses achados microtomográficos sugere-se que essa avaliação leva em consideração a presença de tecido ósseo determinado por intervalo de escala de cinza (threshold). Sendo assim, sabe-se que os medicamentos utilizados podem modificar a densidade do tecido ósseo^{25,32,33}. Esta modificação ocorre devido a ação do alendronato sobre osteoclastos, diminuindo dessa maneira a reabsorção óssea, tendo como consequência portanto um aumento da densidade óssea. Já a pentoxifilina parece ter um efeito osteoanabólico, como demonstrado no estudo de Pal et al³³, que traz como resultado uma melhora da massa e microarquitetura ósseas por meio de uma ação semelhante a do paratormônio (PTH). Diante disso, o uso de diferentes thresholds inviabilizaria a comparação entre grupos, e thresholds iguais podem

apresentar pequenas discrepâncias com a realidade. No entanto, o uso da microtomografia se mostra como um método amplamente utilizado e que pode complementar outras avaliações^{34,35}. Por outro lado, este resultado de ausência de diferença entre os grupos PTX e CT pode mostrar pouca atividade de prevenção a perda óssea, como também mostrado no estudo de Dincel et al³⁶, que demonstrou efeito positivo sobre fraturas ósseas em ratos através de análises radiográficas, biomecânicas e histológicas de outro inibidor de fosfodiesterase (sildenafil) porém não foi possível encontrar um efeito benéfico da pentoxifilina.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados a administração da pentoxifilina não influenciou de forma positiva a perda óssea na doença periodontal induzida.

REFERÊNCIAS

1. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res*. 2013;92(7):592–7.
2. Kantarci A, Hasturk H, Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2006;40(1):144–63.
3. Mark Bartold P, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000*. 2017; 75(1):317-29.
4. Bombini G, Canetti C, Rocha FAC, Cunha FQ. Tumour necrosis factor- α mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2004; 496(1-3):197-204.
5. Domínguez-Jiménez C, Sancho D, Nieto M, Montoya MC, Barreiro O, Sánchez-Madrid F, et al. Effect of pentoxifylline on polarization and migration of human leukocytes. *J Leukoc Biol*. 2002; 71(4):588-96.
6. van Furth AM, Verhard-Seijmonsbergen EM, van Furth R, Langermans JA. Effect of lisofylline and pentoxifylline on the bacterial-stimulated production of TNF- α , IL-1 β , IL-10 by human leucocytes. *Immunology*. 1997; 91(2):193–6.
7. Waage A, Sørensen M, Størdal B. Differential effect of oxpentifylline on tumour necrosis factor and interleukin-6 production. *Lancet*. 1990; 335(8688):543.
8. Strieter RM, Remick DG, Ward PA, Spengler RN, Lynch JP, Larrick J, et al. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor- α production by pentoxifylline. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 155(3):1230–6.

9. Han J, Thompson P, Beutler B. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J Exp Med*. 1990; 172(1):391–4.
10. Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PJ, Rodan GA. Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase. *J Biol Chem*. 1999; 274(49):34967–73.
11. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman DG, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res*. 2009; 10(10):1478–87.
12. Boonekamp PM, van der Wee-Pals LJ, van Wijk-van Lennep MM, Thesing CW, Bijvoet OL. Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. *Bone Min*. 1986; 1(1):27-39.
13. Colucci S, Minielli V, Zambonin G, Cirulli N, Mori G, Serra M, et al. Alendronate reduces adhesion of human osteoclast-like cells to bone and bone protein-coated surfaces. *Calcif Tissue Int*. 1998; 63(3):230-5.
14. Flanagan AM, Chambers TJ. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. *Calcif Tissue Int*. 1991; 49(6):407–15.
15. Piper K, Boyde A, Jones SJ. The effect of 3-amino-1-hydroxypropylidene-1,1-bisphosphonate (ADP) on the resorptive function of osteoclasts of known nuclear number. *Calcif Tissue Int*. 1994; 54(1):56–61.
16. Yalcin-Ulker GM, Cumbul A, Duygu-Capar G, Uslu Ü, Sencift K. Preventive effect of phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline against medication-related osteonecrosis of the jaw: an animal study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017; 75(11):2354–68.
17. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, S. Bastos A, Guimarães M, Marcantonio E. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol*. 2013; 94(1):65–73.
18. da Silva LAB, da Silva RAB, Branco LGS, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dent J*. 2008; 19(4):296–300.
19. Brunsvold MA, Chaves ES, Kornman KS, Aufdemorte TB, Wood R. Effects of a Bisphosphonate on Experimental Periodontitis in Monkeys. *J Periodontol*. 1992; 63(10):825–30.
20. Menezes AMA, Rocha FAC, Chaves H V., Carvalho CBM, Ribeiro RA, Brito GAC. Effect of Sodium Alendronate on Alveolar Bone Resorption in Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol*. 2005; 76(11):1901–9.

21. Tani-Ishii N, Minamida G, Saitoh D, Chieda K, Omuro H, Sugaya A, et al. Inhibitory effects of incadronate on the progression of rat experimental periodontitis by porphyromonas gingivalis infection. *J Periodontol*. 2003; 74(5):603–9.
22. Cetinkaya BO, Keles GC, Ayas B, Gurgor P. Effects of risedronate on alveolar bone loss and angiogenesis: a stereologic study in rats. *J Periodontol*. 2008; 79(10):1950–61.
23. Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG, Aufdemorte TB, Brunsvold M, Chaves E, et al. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontal Res*. 1994; 29(1):35–40.
24. Alencar VBM, Bezerra MM, Lima V, Abreu ALC, Brito GAC, Rocha FAC, et al. Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2002; 73(3):251–6.
25. Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, et al. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res*. 2011; 26(8):1871–82.
26. Tsutsumimoto T, Wakabayashi S, Kinoshita T, Horiuchi H, Takaoka K. A phosphodiesterase inhibitor, pentoxifylline, enhances the bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-dependent differentiation of osteoprogenitor cells. *Bone*. 2002; 31(3):396–401.
27. Horiuchi H, Saito N, Kinoshita T, Wakabayashi S, Tsutsumimoto T, Takaoka K. Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced new bone formation in mice by the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline. *Bone*. 2001; 28(3):290–4.
28. Neuner P, Klosner G, Schauer E, Pourmojib M, Macheiner W, Grünwald C, et al. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology*. 1994; 83(2):262–7.
29. Lima V, Vidal FDP, Rocha FAC, Brito GAC, Ribeiro RA. Effects of tumor necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J Periodontol*. 2004; 75(1):162–8.
30. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*. 1998; 160(1):403–9.
31. Schwarz T, Schwarz A, Krone C, Luger TA. Pentoxifylline suppresses allergic patch test reactions in humans. *Arch Dermatol*. 1993; 129(4):513–4.

32. JD A, KG S, PD D, UA L, RD E, E S, et al. Two-year effects of alendronate on bone mineral density and vertebral fracture in patients receiving glucocorticoids: a randomized, double-blind, placebo-controlled extension trial. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(1):202–11.
33. Pal S, Porwal K, Khanna K, Gautam MK, Malik MY, Rashid M, et al. Oral dosing of pentoxifylline, a pan-phosphodiesterase inhibitor restores bone mass and quality in osteopenic rabbits by an osteogenic mechanism: a comparative study with human parathyroid hormone. *Bone.* 2019; 123:28–38.
34. Zeitoun D, Caliaperoumal G, Bensidhoum M, Constans JM, Anagnostou F, Bousson V. Microcomputed tomography of the femur of diabetic rats: alterations of trabecular and cortical bone microarchitecture and vasculature-a feasibility study. *Eur Radiol Exp.* 2019; 3(1):17.
35. Irie MS, Rabelo GD, Spin-Neto R, Dechichi P, Borges JS, Soares PBF. Use of micro-computed tomography for bone evaluation in dentistry. *Braz Dent J.* 2018; 29 (3):227-38.
36. Dincel YM, Alagoz E, Arikan Y, Caglar AK, Dogru SC, Ortes F, et al. Biomechanical, histological, and radiological effects of different phosphodiesterase inhibitors on femoral fracture healing in rats. *J Orthop Surg.* 2018; 26(2).

3.2 ESTUDO 2*

Utilização da pentoxifilina como adjuvante no tratamento da doença periodontal induzida em ratos.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma condição bucal muito prevalente principalmente em adultos e idosos. Essa condição é caracterizada por inflamação do tecido gengival, podendo chegar até a reabsorção óssea e tem como principal tratamento a raspagem e alisamento radicular¹. Sua etiologia é multifatorial, estando relacionada a fatores locais (microbiota e biofilme) e sistêmicos (resposta do hospedeiro)².

As bactérias presentes no biofilme subgengival podem causar dano periodontal de forma direta e indireta³. Sendo a maneira indireta através da ativação da resposta imune do hospedeiro: quando se tem um acúmulo de biofilme na superfície dentária com microbiota específica para desencadear uma resposta uma reação inflamatória é iniciada no periodonto: células de defesa são recrutadas até o sítio e um processo de degradação de matriz é iniciado pelas metaloproteinases de matriz (MMP)⁴. Tendo em vista o processo da doença periodontal fica claro que a flora bacteriana é responsável pelo desencadeamento da doença, porém a severidade e instauração dependem da resposta imunológica do hospedeiro. Dessa maneira tem-se como tratamento adjuvante ao tratamento periodontal básico a administração de medicamentos sistêmicos para modulação imunológica.

O alendronato é um medicamento pertencente à classe dos bisfosfonatos, tendo seu principal efeito na reabsorção óssea através da inibição direta de osteoclastos^{5,6} e ação indireta sobre osteoblastos^{7,8}. Sua ação, portanto, promove aumento da taxa de aposição óssea e diminuição da reabsorção, melhorando assim a densidade mineral desse tecido. Graças ao seu efeito no metabolismo ósseo é uma substância muito estudada atualmente na odontologia e na medicina, sendo muito prescrita para tratamento de cânceres ósseos e osteoporose⁹⁻¹¹.

A pentoxifilina é um inibidor não seletivo da fosfodiesterase que promove como efeito dessa inibição um aumento do cAMP intracelular. Esse aumento promove elevação da expressão dos fatores de transcrição Runx-2 e osterix, levando a um efeito osteogênico¹². Esse medicamento tem uma ação de modulação

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

da liberação de algumas citocinas, principalmente TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 e IL-17¹²⁻¹⁵, diminuindo assim o processo inflamatório. A pentoxifilina tem sido muito utilizado como parte do protocolo de tratamento de pacientes com osteonecrose dos maxilares¹⁶ graças ao seu efeito angiogênico, que acarreta em aumento da vascularização, que é deficiente nesse tipo de condição.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da pentoxifilina e do alendronato no tratamento da doença periodontal induzida em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi desenvolvido seguindo os padrões éticos da Declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA 06/2017).

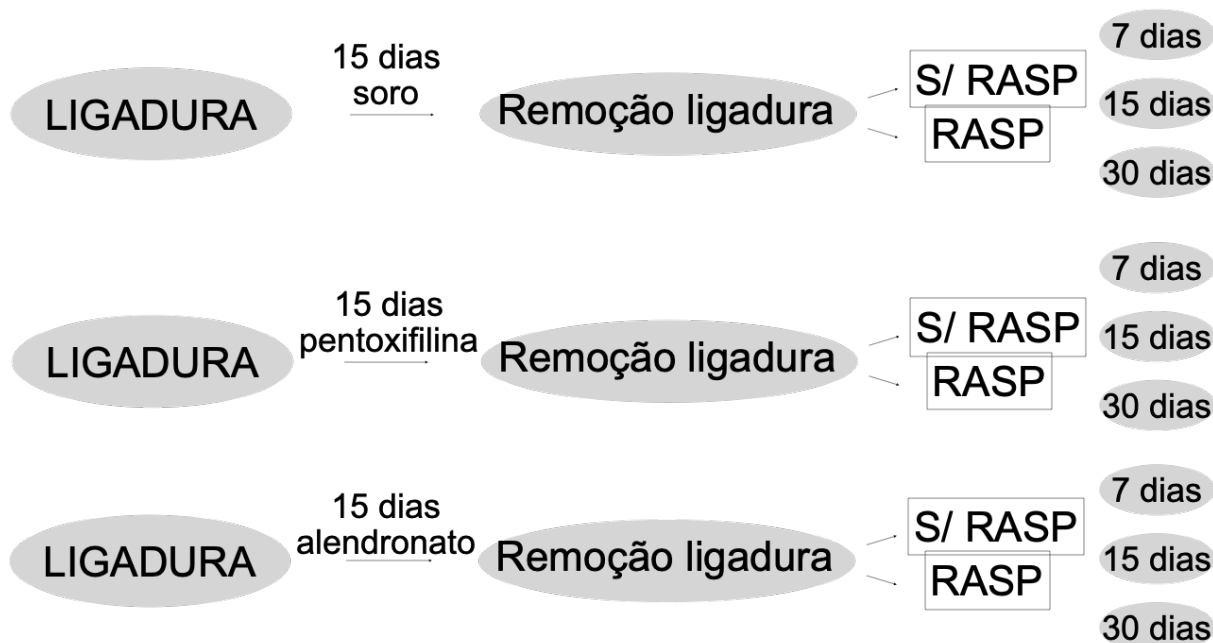
Foram utilizados ratos (*Rattus Norvegicus*), variação *albinus*, Holtzman, adultos, machos, com peso variando entre 180-220 gramas, os quais foram divididos em 06 grupos (n=7) aleatoriamente: controle (CT) (administração de soro fisiológico), controle raspagem (CTR) (administração de soro fisiológico e realização de raspagem dental), bisfosfonato (BIS) (administração de alendronato), bisfosfonato raspagem (BISR) (administração de alendronato e realização de raspagem dental), pentoxifilina (PTX) (administração de pentoxifilina) e pentoxifilina raspagem (PTXR) (administração de pentoxifilina e realização de raspagem dental). Cada grupo foi dividido em 3 períodos experimentais: 7, 15 e 30 dias. Os animais foram mantidos em ambientes luz e temperatura controladas e condicionados em caixas com acesso a água e comida ad libitum.

Tratamentos

Todos os animais iniciaram o tratamento de acordo com seu grupo no dia da instalação de ligaduras nos segundos molares superiores. Eles receberam a medicação até 7, 15 ou 30 dias após a remoção das ligaduras.

Nos grupos PTX e PTXR a pentoxifilina foi administrada por gavagem (Medley Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) (50 mg/kg)¹⁷, nos grupos BIS e BISR o alendronato por via subcutânea (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) (1 mg/kg)¹⁸ e nos grupos CT e CTR o soro fisiológico por via subcutânea (1mL/kg) (APÊNDICE A).

Figura 1 – Fluxograma representando a administração dos medicamentos, que iniciou no momento da colocação da ligadura até a eutanásia dos animais.



Fonte: Elaboração própria.

A raspagem foi realizada com uma cureta mini Gracey 5-6 (HuFriedy, USA) com movimentos no sentido ápico-coronal nas faces livres e proximais dos segundos molares superiores e durante esse procedimento ocorria a irrigação com soro fisiológico.

Indução da Doença Periodontal

A doença periodontal foi induzida nos segundos molares superiores por meio do uso de ligaduras de fio de algodão número 24¹⁹. Para tal procedimento os animais foram anestesiados com Quetamina (80 mg/kg) e Xilazina (7 mg/kg) e as ligaduras foram inseridas na região subgengival. Após cada período experimental os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica e as hemi-maxilas foram fixadas em formol 10% e na sequência condicionadas em álcool 70%.

Análise Microtomográfica (μCT)

As hemi-maxilas passaram por escaneamento no microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), utilizando cortes de 18 μm (50Kv e 500μ), filtro de Al 0.5mm; tamanho do voxel: 17,48μm; voltagem de 50KV e corrente elétrica de 500μA. Após esse processo foram realizados:

posicionamento no plano coronal através do software Dataviewer e delimitação das regiões de interesse (ROI) com o software CTAnalyser. Uma região maior foi delimitada englobando o segundo molar até proximais dos dentes vizinhos (ROI 1) outra e abrangendo apenas as raízes (ROI 2) com limite apical de 1000 micrometros a partir do teto da furca. Por meio da subtração ROI 1 – ROI2 foi obtido o valor de tecido ósseo presente.

Análise Histomorfométrica

Após obtenção das imagens no microtomógrafo, as peças seguiram para lavagem em água corrente e em seguida para o processo de descalcificação com EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético). Em seguida as hemi-maxilas passaram por processamento histológico de rotina e foram incluídas em parafina. Cortes de 5 µm de espessura no sentido frontal na direção vestibulo/palatina foram obtidos com auxílio de um micrótomo. Após adesão e coloração das lâminas, fotomicrografias foram obtidas utilizando um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) acoplado a uma câmera de vídeo DXC-1107A/107AP (Sony Eletronics Inc, Japão).

Análise histométrica

Um examinador cego e calibrado (FCG) realizou mensurações a partir de 3 lâmina equidistantes 50 µm entre si de cada grupo experimental com o uso do software ImageJ - Launcher versão 1.48b (National Institutes of Health, USA). A análise foi feita na região de furca através da delimitação pelas raízes com uma distância de 1000µm a partir do teto da furca por meio de uma medida da área de osso apresentada em cada fotomicrografia²⁰. Já nas regiões proximais uma medida linear foi feita da junção cimento-esmalte até a crista óssea, obtida pela distância entre duas linhas horizontais, cada uma traçada em uma dessas duas estruturas.

Análise estereométrica

Utilizando fotomicrografias com aumento de 40x e com o uso do software ImageJ - Launcher versão 1.48b (National Institutes of Health, USA) uma grade foi confeccionada com 130 pontos de intersecções e foi posicionado em cada imagem. Cada tipo celular ou tecidual encontrado nas intersecções foi obtido e utilizada para cálculo percentual de cada um em relação ao número total de pontos nas regiões

subepitelial e de furca. Foram analisados os seguintes tipos celulares/teciduais: tecido conjuntivo (T.c.), tecido inflamatório (T.i.) e vasos sanguíneos (Vs).

Análise Estatística

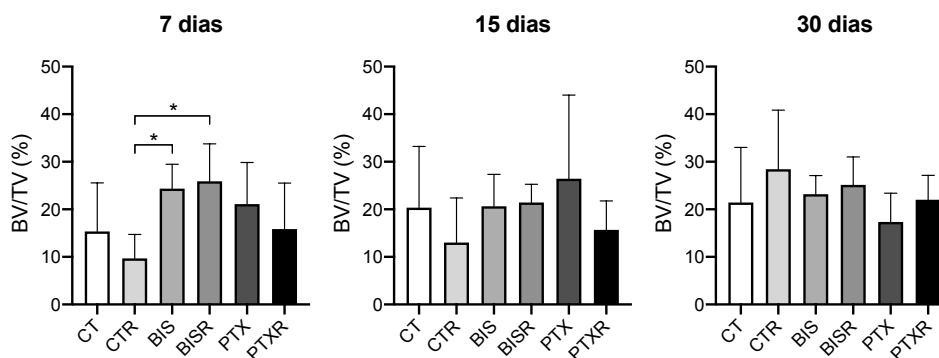
Os dados numéricos obtidos a partir de cada análise foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Em sequencias os testes paramétricos de Anova complementado pelo teste de Tukey foram aplicados para a análise inferencial dos dados. A significância estatística foi definida em $p < 0,05$.

RESULTADOS

Todos os animais utilizados no presente estudo sobreviveram e receberam os cuidados necessários após a o procedimento de colocação das ligaduras até o momento da eutanásia.

Análise Microtomográfica (μ CT)

Gráfico 1 – Porcentagem (%) da relação volume ósseo/volume tecidual em cada período experimental ($p \leq 0,05$).

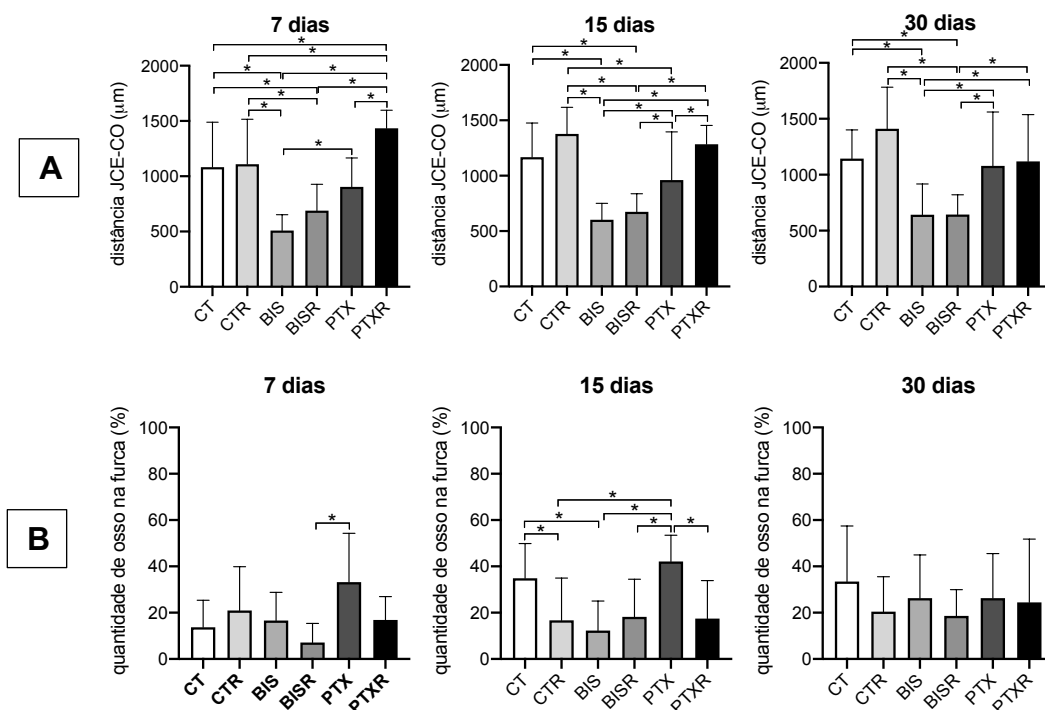


Fonte: Elaboração própria.

Na análise microtomográfica os resultados demonstram diferença estatística apenas no menor período experimental quando comparados os grupos CTR vs BIS e CTR vs BISR. Nos demais grupos e períodos analisados não foram observadas diferenças estatísticas.

Análise Histomorfométrica

Gráfico 2 – Valores e desvio padrão dos valores obtidos na análise histométrica nas regiões interproximal (A – medida linear) e de furca (B – porcentagem óssea) para todos os grupos e períodos. * indica diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$).

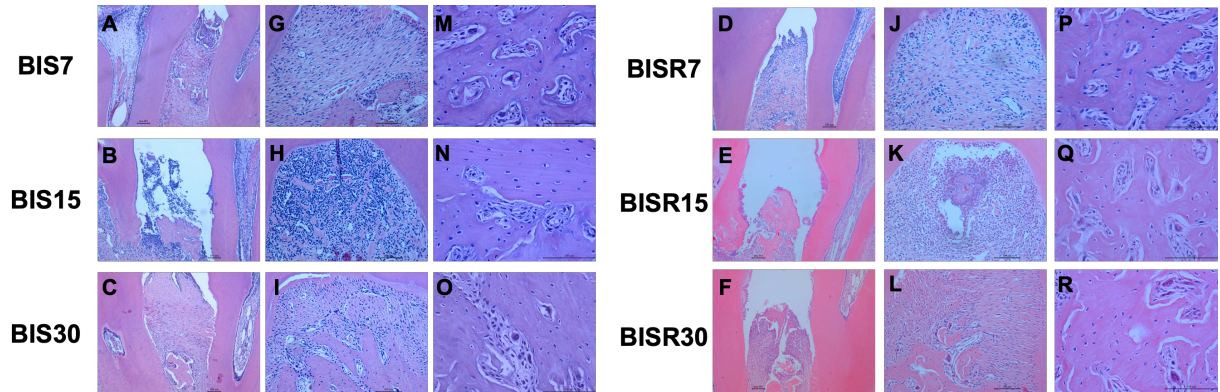


Fonte: Elaboração própria.

A região proximal, no período experimental de 7 dias, o grupo PTXR apresentou a menor quantidade óssea na região proximal, enquanto o grupo PTX teve um resultado estatisticamente semelhante ao grupo BIS, o qual apresentou a menor perda óssea. Aos 15 dias, o grupo PTXR apresentou um resultado similar aos grupos controle. Ao final, no período 30 dias, no grupo PTXR o resultado foi semelhante aos grupos PTX, CT e CTR.

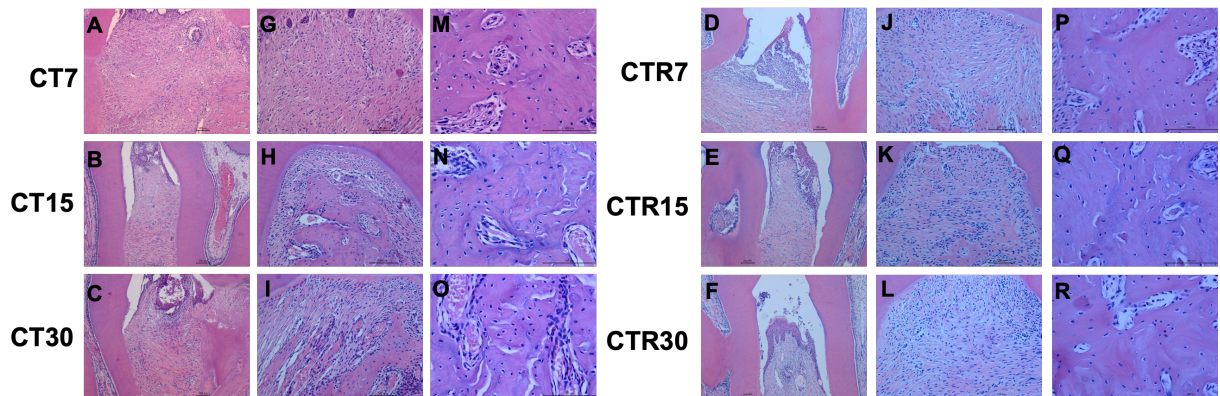
Na análise da região de furca no período 7 dias o grupo PTX apresentou a maior porcentagem óssea, resultado que permaneceu no período seguinte, porém com alterações nos resultados dos demais grupos. Por fim no período 30 dias todos os grupos se equiparam.

Figura 2 – Fotomicrografias representando os grupos BIS e BISR nos três períodos analisados. As imagens A, B, C, D, E e F representam a região interproximal. Já nas imagens G, H, I, J, K e L nota-se a região de furca e por fim nas imagens M, N, O, P, Q e R tem-se a mesma região em maior aumento. Esses cortes foram utilizados para a avaliação histomorfométrica. HE, 10x, 20x, 40x.



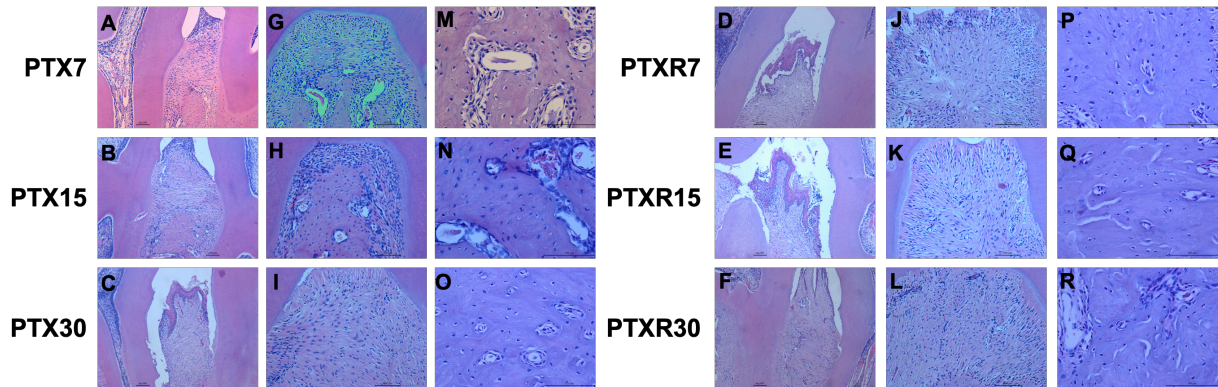
Fonte: Elaboração própria.

Figura 3 – Fotomicrografias representando os grupos CT e CTR nos três períodos analisados. As imagens A, B, C, D, E e F representam a região interproximal. Já nas imagens G, H, I, J, K e L nota-se a região de furca e por fim nas imagens M, N, O, P, Q e R tem-se a mesma região em maior aumento. Esses cortes foram utilizados para a avaliação histomorfométrica. HE, 10x, 20x, 40x.



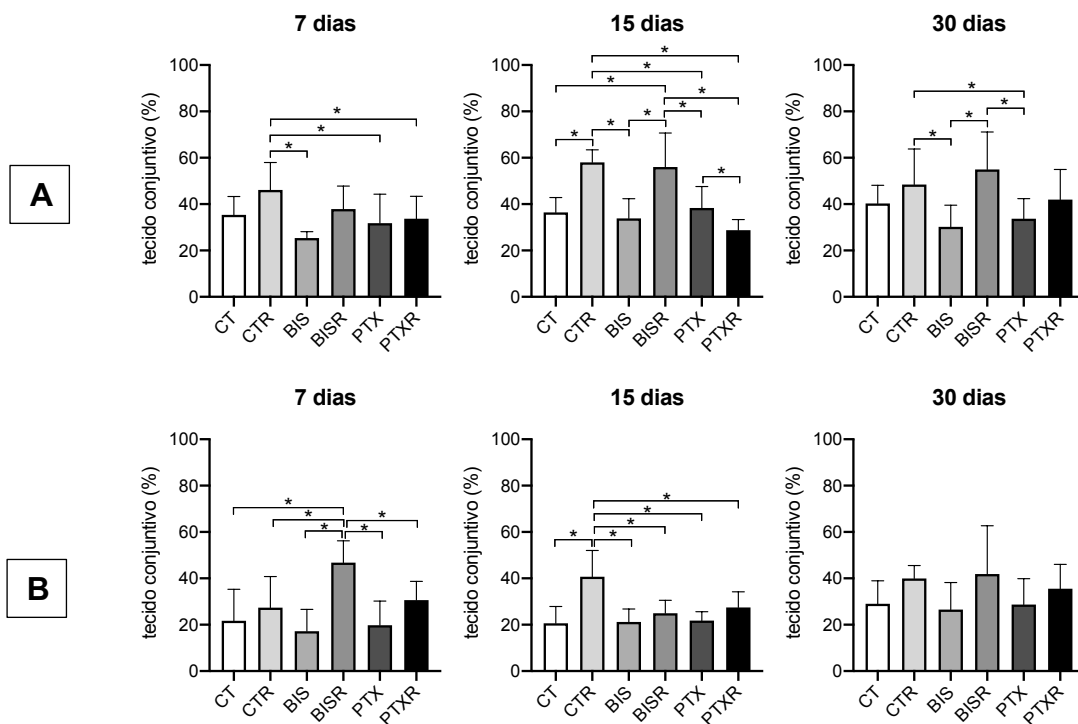
Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 – Fotomicrografias representando os grupos PTX e PTXR nos três períodos analisados. As imagens A, B, C, D, E e F representam a região interproximal. Já nas imagens G, H, I, J, K e L nota-se a região de furca e por fim nas imagens M, N, O, P, Q e R tem-se a mesma região em maior aumento. Esses cortes foram utilizados para a avaliação histomorfométrica. HE, 10x, 20x, 40x.



Fonte: Elaboração própria.

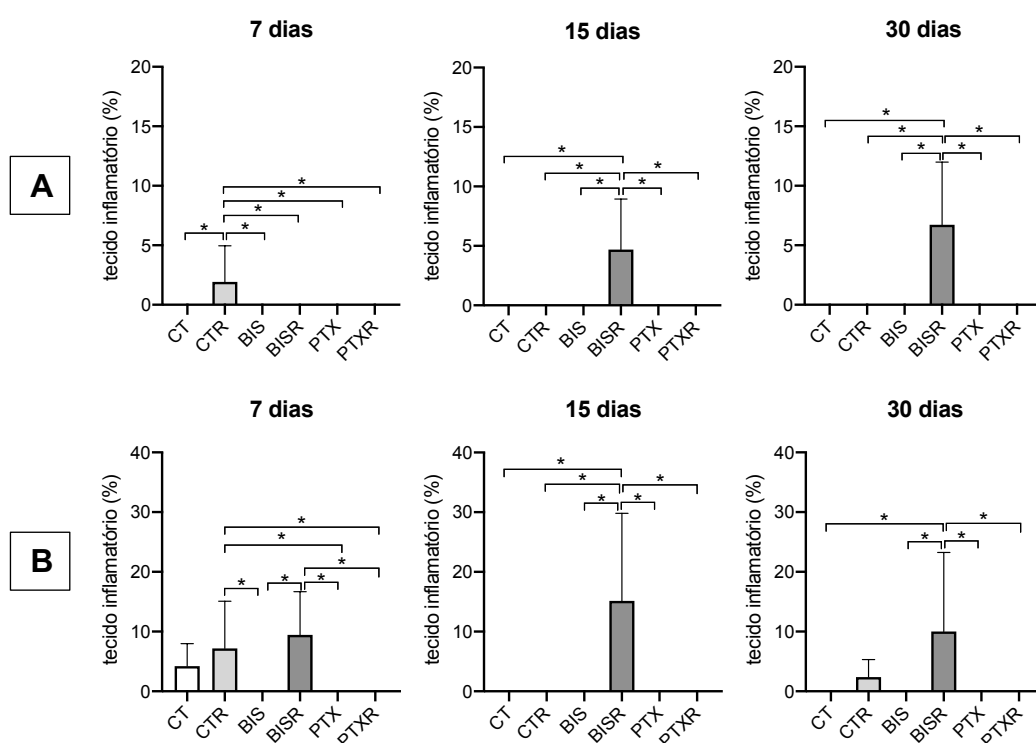
Gráfico 3 – Valores e desvio padrão dos valores obtidos na análise de tecido conjuntivo nas regiões subepitelial (A) e de furca (B), para todos os grupos e períodos. * indica diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaboração própria.

Na análise da região subepitelial uma porcentagem maior de tecido conjuntivo foi observada no grupo CTR no período inicial, sendo seu resultado equiparado com o do grupo BISR com um maior período experimental. Já na região de furca foi demonstrada maior porcentagem no grupo BISR no período 7 dias, porém com 30 dias todos os grupos se equiparam.

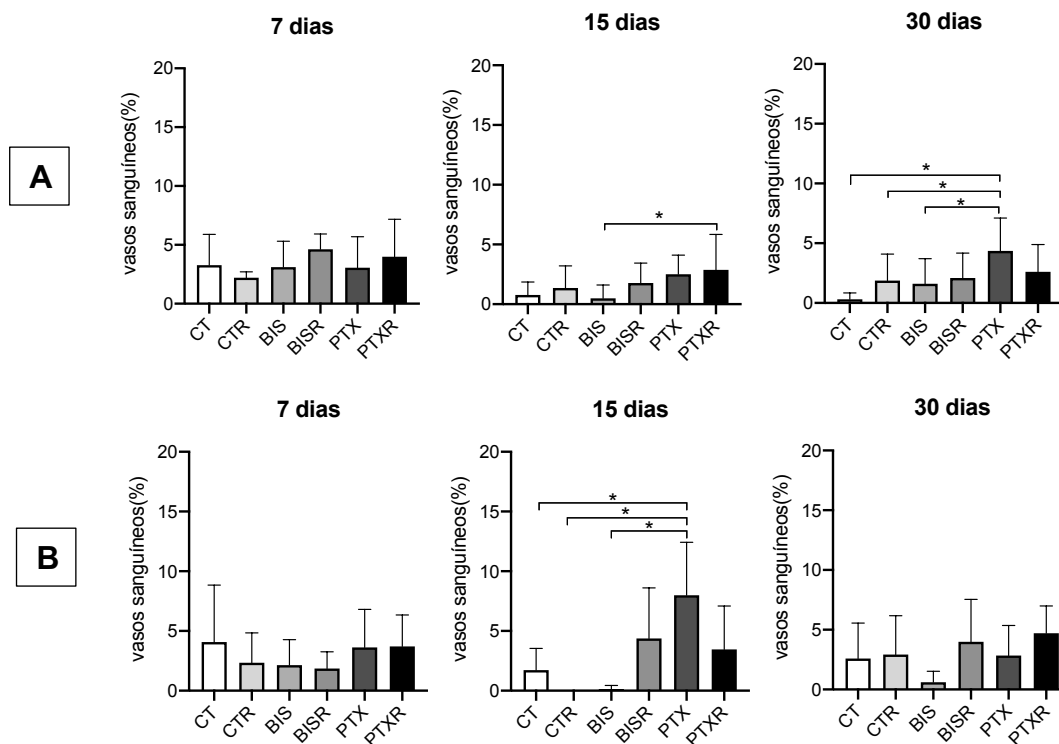
Gráfico 4 – Valores e desvio padrão dos valores obtidos na análise de tecido inflamatório nas regiões subepitelial (A) e de furca (B), para todos os grupos e períodos. * indica diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaboração própria.

Quando analisada a porcentagem de tecido inflamatório o grupo BISR teve um resultado mais expressivo nas duas regiões analisadas e em todos os períodos experimentais.

Gráfico 5 – Valores e desvio padrão dos valores obtidos na análise de vasos sanguíneos nas regiões subepitelial (A) e de furca (B), para todos os grupos e períodos. * indica diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaboração própria.

Na região interproximal o grupo PTXR teve uma porcentagem maior de vasos no período 15 dias e em 30 dias o grupo PTX. Já na furca o grupo PTX teve um resultado mais expressivo apenas no período 15 dias.

DISCUSSÃO

O desequilíbrio entre microbiota e resposta do hospedeiro é o principal fator relacionado ao desenvolvimento da doença periodontal. A efetividade do tratamento básico já é bem consolidada na literatura, por outro lado a resposta do hospedeiro que tem papel tão importante quanto o do fator local, pode ser alterada pela ação de medicamentos sistêmicos. Baseado nisso nosso estudo avaliou a resposta do hospedeiro no reparo periodontal sob influência da pentoxifilina.

A análise microtomográfica apontou um resultado menos satisfatório no grupo CTR no período 7 dias comparado aos grupos BIS e BISR, isso pode estar relacionado ao trauma mecânico inicial ocasionado pela raspagem. Já os grupos BIS

e BISR tem resultados expressivos devido a ação dos bisfosfonatos já elucidada^{7,8}. Os grupos PTX e PTXR não apresentaram diferença estatística em relação ao controle, no entanto, os valores numéricos apontam para uma tendência de maior formação óssea. O efeito anti-inflamatório da pentoxifilina por meio da modulação de citocinas pode ter suprimido os mecanismos de defesa do organismo frente ao desafio microbiano/mecânico induzido pela ligadura e pela raspagem. Estudos anteriores que avaliaram o efeito de imunomoduladores demonstraram uma piora ou nenhum efeito sobre o reparo ósseo na doença periodontal²¹⁻²³.

A histometria das regiões proximais demonstrou no período 7 dias um resultado superior do grupo PTX comparado ao PTXR. Tal achado pode estar relacionado ao trauma mecânico causado pela raspagem, que ainda reflete nesse período inicial. O grupo BIS se mostrou superior aos grupos PTX e CT, devido ao seu efeito antirreabsortivo, por meio da inibição da atividade osteoclástica, resultando em uma menor taxa de reabsorção óssea^{5,6}. No período experimental de 15 dias o resultado se manteve igual ao período anterior.

Na região de furca no período 15 dias o grupo BIS, diferentemente do que foi observado na região interproximal, não apresentou um resultado benéfico no reparo ósseo. No entanto quando comparou-se CTR com BISR resultados semelhantes foram encontrados, apontando um efeito positivo da raspagem e estando de acordo com o estudo de Graziani et al.²⁴, que traz como resultado uma não diferença na melhora da doença periodontal quando comparados pacientes que receberam apenas raspagem com pacientes que receberam raspagem de bisfosfonato.

Com a análise estereométrica foi possível observar diversos achados, dos quais podem ser destacados: maior porcentagem tecido inflamatório no grupo BISR, de vasos sanguíneos nos grupos PTX e PTXR com resultado mais expressivo na região interproximal e de tecido conjuntivo nos grupos CTR e BISR. Já na região de furca apenas houve diferença estatística no período 15 dias, com melhor resultado do grupo PTX quando analisamos porcentagem de tecido ósseo.

A maior resposta inflamatória no grupo BISR pode estar relacionada a uma maior aderência óssea bacteriana quando se tem a administração de bisfosfonatos²⁵, levando conseqüentemente a uma maior resposta inflamatória local. Além disso o trauma local causado pela raspagem pode ter sido um fator agravante

dessa resposta. Já o resultado positivo em relação a porcentagem de vasos sanguíneos nos grupos PTX e PTXR se deve ao efeito angiogênico promovido pela pentoxifilina²⁶.

Quando analisada a porcentagem de tecido conjuntivo tem uma maior quantidade relativa desse tecido nos grupos BISR e CTR. Esse resultado pode estar associado ao efeito da pentoxifilina de inibir o fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF)²⁷, tendo, portanto, o grupo PTXR um resultado menor do que os outros grupos quando analisado esse tipo tecidual. Com o tratamento da doença periodontal busca-se a regeneração tecidual, no entanto na maioria das vezes o que se consegue é um reparo, ou seja, restituição dos tecidos com forma e arquitetura diferentes das originais. Pensando nisso o maior percentual nos grupos que foram submetidos à raspagem pode ser explicado por esse tipo de resposta. Além disso a pentoxifilina parece ter um efeito de redução da síntese de componentes da matriz extracelular (colágenos tipo I e III)²⁸ e aumento da atividade de collagenase²⁹.

O resultado positivo obtido na região de furca pode estar relacionado a um efeito benéfico da pentoxifilina na formação óssea, assim como demonstrado em estudo de Lima et al.³⁰, que relaciona o resultado ao papel fundamental de TNF- α na doença periodontal. Esse efeito parece ter influência da ação da pentoxifilina na modulação da liberação de citocinas, principalmente TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8³¹.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos através das análises microtomográfica e histomorfométrica pode-se concluir que a pentoxifilina revelou propensão a uma maior formação óssea quando utilizada no tratamento da doença periodontal induzida em ratos, enquanto o bisfosfonato favoreceu um maior grau de inflamação.

REFERÊNCIAS

1. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B*. 2005; 79(2):159-70.
2. Williams RC, Paquette DW. Understanding the pathogenesis of periodontitis: a century of discovery. *J Int Acad Periodontol*. 2000; 2(3):59–63.
3. Deas DE, Mackey SA, McDonnell HT. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontol 2000*. 2003; 32:82-104.

4. Kantarci A, Hasturk H, Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2006; 40(1):144–63.
5. Flanagan AM, Chambers TJ. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. *Calcif Tissue Int*. 1991; 49(6):407–15.
6. Piper K, Boyde A, Jones SJ. The effect of 3-amino-1-hydroxypropylidene-1,1-bisphosphonate (ADP) on the resorptive function of osteoclasts of known nuclear number. *Calcif Tissue Int*. 1994; 54(1):56–61.
7. Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Bisphosphonates: effects on osteoblast. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012; 68(7):1013–8.
8. Ohe J-Y, Kwon Y-D, Lee H-W. Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived osteoblasts. *Clin Oral Investig*. 2012; 16(4):1153–9.
9. Lopes LL de A, de Barros Silva PG, Damasceno JX, Martins JO de L, da Silva KR, de Sousa FB, et al. Microtomographic analysis of the effect of sodium alendronate on orthodontic movement in rats. *Orthod Craniofac Res*. 2021; 24(1):96–101.
10. Wang YK, Zhang Y min, Qin SQ, Wang X, Ma T, Guo J Bin, et al. Effects of alendronate for treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(42):e12691.
11. Luo R Bin, Lin T, Zhong HM, Yan SG, Wang JA. Evidence for using alendronate to treat adult avascular necrosis of the femoral head: a systematic review. *Med Sci Monit*. 2014; 20:2439-47.
12. Fujita T, Meguro T, Fukuyama R, Nakamuta H, Koida M. New signaling pathway for parathyroid hormone and cyclic AMP action on extracellular-regulated kinase and cell proliferation in bone cells. Checkpoint of modulation by cyclic AMP. *J Biol Chem*. 2002; 277(25):22191–200.
13. Abdel-Salam OME, Baiuomy AR, El-Shenawy SM, Arbid MS. The anti-inflammatory effects of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. *Pharmacol Res*. 2003; 47(4):331-40.
14. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. *Drugs*. 1987; 34(1):50–97.
15. van Furth AM, Verhard-Seijmonsbergen EM, van Furth R, Langermans JA. Effect of lisofylline and pentoxifylline on the bacterial-stimulated production of TNF-alpha, IL-1 beta IL-10 by human leucocytes. *Immunology*. 1997; 91(2):193–6.

16. Lyons AJ, Brennan PA. Pentoxifylline – a review of its use in osteoradionecrosis. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2017; 55(3):230-234.
17. Yalcin-Ulker GM, Cumbul A, Duygu-Capar G, Uslu Ü, Sencift K. Preventive effect of phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline against medication-related osteonecrosis of the jaw: an animal study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017; 75(11):2354–68.
18. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, S. Bastos A, Guimarães M, Marcantonio E. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol.* 2013; 94(1):65–73.
19. de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech.* 2018; 81(12):1412–21.
20. da Silva LAB, da Silva RAB, Branco LGS, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dent J.* 2008; 19(4):296–300.
21. Carvalho RS, De Souza CM, Neves JCS, Holanda-Pinto SA, Pinto LMS, Brito GAC, et al. Effect of venlafaxine on bone loss associated with ligature-induced periodontitis in Wistar rats. *J Negat Results Biomed.* 2010; 9(1):3.
22. Cavagni J, Soletti AC, Gaio EJ, Rösing CK. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Braz Oral Res.* 2005; 19(4):290–4.
23. Verzeletti GN, Gaio EJ, Rösing CK. Effect of methotrexate on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *Acta Odontol Scand.* 2007; 65(6):348–51.
24. Graziani F, Cei S, Guerrero A, La Ferla F, Vano M, Tonetti M, et al. Lack of short-term adjunctive effect of systemic neridronate in non-surgical periodontal therapy of advanced generalized chronic periodontitis: An open label-randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(5):419–27.
25. Kos M, Luczak K. Bisphosphonates promote jaw osteonecrosis through facilitating bacterial colonisation. *Biosci Hypotheses.* 2009; 2(1):34–6.
26. Pal S, Porwal K, Singh H, Malik MY, Rashid M, Kulkarni C, et al. Reversal of Osteopenia in Ovariectomized Rats by Pentoxifylline: Evidence of Osteogenic and Osteo-Angiogenic Roles of the Drug. *Calcif Tissue Int.* 2019; 105(3):294–307.
27. Lin SL, Chen RH, Chen YM, Chiang WC, Lai CF, Wu KD, et al. Pentoxifylline attenuates tubulointerstitial fibrosis by blocking Smad3/4-activated transcription and profibrogenic effects of connective tissue growth factor. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16(9):2702–13.

28. Isaac C, Mathor MB, Bariani G, Paggiaro AO, Herson MR, Goldenstein-Schainberg C, et al. Pentoxifylline modifies three-dimensional collagen lattice model contraction and expression of collagen types I and III by human fibroblasts derived from post-burn hypertrophic scars and from normal skin. *Burns*. 2009; 35(5):701–6.
29. Scott PG, Dodd CM, Tredget EE, Ghahary A, Rahemtulla F. Chemical characterization and quantification of proteoglycans in human post-burn hypertrophic and mature scars. *Clin Sci*. 1996; 90(5):417–25.
30. Lima V, Vidal FDP, Rocha FAC, Brito GAC, Ribeiro RA. Effects of tumor necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J Periodontol*. 2004; 75(1):162–8.
31. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs*. 1987; 34(1):50-97.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos objetivos deste projeto de pesquisa que foi de avaliar a influência da pentoxifilina na doença periodontal induzidas em ratos. Os resultados se mostraram favoráveis no tratamento da doença periodontal e poucos efeitos benéficos na prevenção.

No estudo 1, a ligadura foi mantida até o momento da eutanásia, na avaliação histológica foi observado um infiltrado inflamatório maior no grupo PTX comparado ao grupo CT. Isso pode ser explicado pela maior alteração na flexibilidade de eritrócitos, diminuição da viscosidade do plasma e reatividade plaquetária⁷⁶. A flexibilidade eritrocitária permite menor adesão e agregação plaquetária e maior trânsito de eritrócitos até capilares menores, atingindo assim todas as regiões^{6,7}.

Nas análises histométrica e microtomográfica um resultado semelhante dos grupos PTX em relação ao grupo CT foi observado, exceto na região interproximal, onde o grupo PTX apresentou uma menor perda óssea. Esse resultado pode ser explicado pela menor atividade de citocinas inflamatórias. Apesar da pentoxifilina ter maior atividade de vascularização e permeabilidade^{45,46,76}, sua atividade específica está diretamente ligada a menor liberação de citocinas dos leucócitos, principalmente IL-1, IL-6 e IL-17^{6,9-18,20} e TNF- α ²¹. Essa menor taxa de citocinas pode estar diretamente ligada a um menor recrutamento de células de defesa específica, como linfócitos, macrófagos e osteoclastos. Sendo assim, uma menor taxa de reabsorção óssea pode ser observada no grupo PTX quando comparado ao grupo CT. Este resultado está de acordo com Lima et al.⁷⁷ que também avaliaram o efeito protetivo da pentoxifilina frente a doença periodontal.

A menor perda óssea no grupo BIS em relação aos outros dois grupos (CT e PTX) confirma o potencial antirreabsortivo do medicamento. Similarmente ao estudo de Gomes et al.,⁷⁸ o tecido ósseo foi avaliado após administração de alendronato, e diante das avaliações histométrica e microtomográfica os resultados foram semelhantes, com menores graus de perda óssea.

Por fim com na análise estereométrica os resultados apontam um maior percentual de células inflamatórias do grupo PTX em relação ao grupo BIS (sem diferença em relação ao grupo CT) e maior porcentagem de vasos sanguíneos quando comparado aos dois grupos, BIS e CT. Esses dados podem sugerir uma maior vascularização, como efeito da administração de pentoxifilina³³. Nas regiões

com maiores perdas ósseas como consequência foi obtida uma maior porcentagem de tecido conjuntivo, uma vez que esse tecido substitui o tecido ósseo.

No estudo 2 as análises microtomográfica apresentaram maior perda óssea, este resultado pode ser devido ao efeito negativo da raspagem no período de 7 dias quando os animais não estavam sob o efeito de nenhum medicamento, estes resultados podem estar relacionados ao trauma mecânico causado por essa abordagem. Já na análise histométrica no período 7 dias o resultado foi superior do grupo PTX comparado ao PTXR. Tal achado pode estar relacionado ao trauma mecânico causado pela raspagem como também ocorreu na análise microtomográfica. O grupo BIS se mostrou superior aos grupos PTX e CT, devido ao seu efeito diretamente sobre osteoclastos, reduzindo a reabsorção óssea e indiretamente sobre osteoblastos, promovendo aposição óssea^{48,49}, o que acaba acarretando em uma menor perda óssea frente a doença periodontal.

Na região de furca no período 15 dias o grupo BIS, diferentemente do que foi observado na região interproximal, não apresentou um resultado benéfico no reparo ósseo. No entanto quando comparou-se CTR com BISR os resultados foram semelhantes, apontando um efeito positivo da raspagem e estando de acordo com o estudo de Graziani et al.⁷⁹. O efeito da remoção do biofilme no momento da raspagem pode ter promovido um ambiente mais propício para reparação dos tecidos, possibilitando a ação dos medicamentos. Os resultados são diferentes do período de 7 dias uma vez os tecidos ainda estão no processo inicial de cicatrização após a instrumentação.

Na análise estereométrica houve maior formação óssea, uma reafirmação do efeito angiogênico da pentoxifilina e um resultado positivo em relação a porcentagem óssea na furca, que pode estar relacionado a um efeito benéfico da pentoxifilina na formação óssea, assim como demonstrado em estudo de Lima et al.⁷⁷. Esse efeito pode estar relacionado com a ação da pentoxifilina na modulação da liberação de citocinas, principalmente TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8⁸⁰, levando a uma menor reabsorção devido a ação protetiva do medicamento.

Por fim quando analisada a porcentagem de tecido conjuntivo uma maior quantidade relativa desse tecido nos grupos BISR e CTR foi observada. Diferentemente, o grupo PTXR apresentou menor quantidade de tecido conjuntivo,

este resultado pode estar associado ao efeito da pentoxifilina de inibir o fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF)⁸¹. Com o tratamento da doença periodontal busca-se a regeneração tecidual, no entanto na maioria das vezes o que se consegue é um reparo, ou seja, restituição dos tecidos com forma e arquitetura diferentes das originais. Diante disso o maior percentual nos grupos que foram submetidos à raspagem pode ser explicado por esse tipo de resposta. Somado a isso a pentoxifilina parece ter um efeito de aumento da atividade de collagenase⁸² e diminuição da síntese de componentes da matriz extracelular (colágenos tipo I e III)⁸³.

O efeito angiogênico da pentoxifilina traz como consequência uma facilidade da chegada de células na região afetada (periodonto do segundo molar). Na metodologia do primeiro estudo a inflamação local foi favorecida por esse efeito, uma vez que o fluxo celular pode ser mais intenso devido a maior vascularização. Da mesma maneira o fluxo de células reparadoras também é favorecido quando se foi aplicada a metodologia do segundo estudo, o que explica o resultado favorável obtido quanto a formação óssea.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no primeiro estudo foi possível observar um menor grau de perda óssea do grupo BIS e uma sutil ação do grupo PTX frente a indução de inflamação dos tecidos periodontais em ratos. Já no estudo 2 foi possível demonstrar uma tendência de efeito positivo da pentoxifilina no reparo periodontal após a remoção do fator local (ligadura). Novos estudos são necessários para observar a ação da pentoxifilina.

REFERÊNCIAS*

1. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*. 2011; 38 Suppl 11:60-84.
2. Gokhale SR, Padhye AM. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. *Br Dent J*. 2013; 214(9):467-71.
3. Lindhe J, Lang N. Tratado de periodontologia clínica e implantologia oral. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
4. Kantarci A, Hasturk H, Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2006; 40(1):144–63.
5. Gjoseva S, Geskovski N, Sazdovska SD, Popeski-Dimovski R, Petruševski G, Mladenovska K, et al. Design and biological response of doxycycline loaded chitosan microparticles for periodontal disease treatment. *Carbohydr Polym*. 2018; 186:260–72.
6. Abdel-Salam OME, Baiuomy AR, El-Shenawy SM, Arbid MS. The anti-inflammatory effects of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. *Pharmacol Res*. 2003; 47(4):331-40.
7. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. *Drugs*. 1987; 34(1):50–97.
8. Seiffge D, Bissinger T, Kremer E, Laux V, Schleyerbach R. Inhibitory effects of pentoxifylline on LPS-induced leukocyte adhesion and macromolecular extravasation in the microcirculation. *Inflamm Res*. 1995; 44(7):281–6.
9. van Furth AM, Verhard-Seijmonsbergen EM, van Furth R, Langermans JA. Effect of lisofylline and pentoxifylline on the bacterial-stimulated production of TNF-alpha, IL-1 beta IL-10 by human leucocytes. *Immunology*. 1997; 91(2):193–6.
10. Teng MS, Futran ND. Osteoradionecrosis of the mandible. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 13(4):217–21.
11. Horiuchi H, Saito N, Kinoshita T, Wakabayashi S, Tsutsumimoto T, Takaoka K. Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced new bone formation in mice by the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline. *Bone*. 2001; 28(3):290–4.
12. Fernandes JL, de Oliveira RTD, Mamoni RL, Coelho OR, Nicolau JC, Blotta MHS, et al. Pentoxifylline reduces pro-inflammatory and increases anti-inflammatory activity in patients with coronary artery disease- a randomized placebo-controlled study. *Atherosclerosis*. 2008; 196(1):434-442.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. Bombini G, Canetti C, Rocha FAC, Cunha FQ. Tumour necrosis factor- α mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2004; 496(1-3):197-204.
14. Queiroz-Junior CM, Bessoni RLC, Costa V V., Souza DG, Teixeira MM, Silva TA. Preventive and therapeutic anti-TNF- α therapy with pentoxifylline decreases arthritis and the associated periodontal co-morbidity in mice. *Life Sci.* 2013; 93(9–11):423–8.
15. Domínguez-Jiménez C, Sancho D, Nieto M, Montoya MC, Barreiro O, Sánchez-Madrid F, et al. Effect of pentoxifylline on polarization and migration of human leukocytes. *J Leukoc Biol.* 2002; 71(4):588-96.
16. Jacoby D, Mohler ER. Drug treatment of intermittent claudication. *Drugs.* 2004; 64(15):1657–70.
17. Zabel P, Schade FU, Schlaak M. Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline. *Immunobiology.* 1993; 187(3–5):447–63.
18. Schmidt-Choudhury A, Furuta GT, Lavigne JA, Galli SJ, Wershil BK. The regulation of tumor necrosis factor- α production in murine mast cells: pentoxifylline or dexamethasone inhibits IgE-dependent production of TNF- α by distinct mechanisms. *Cell Immunol.* 1996; 171(1):140–6.
19. Waage A, Sørensen M, Størdal B. Differential effect of oxpentifylline on tumour necrosis factor and interleukin-6 production. *Lancet.* 1990; 335(8688):543.
20. Strieter RM, Remick DG, Ward PA, Spengler RN, Lynch JP, Larrick J, et al. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor- α production by pentoxifylline. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 155(3):1230–6.
21. Han J, Thompson P, Beutler B. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J Exp Med.* 1990; 172(1):391–4.
22. Tsutsumimoto T, Wakabayashi S, Kinoshita T, Horiuchi H, Takaoka K. A phosphodiesterase inhibitor, pentoxifylline, enhances the bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-dependent differentiation of osteoprogenitor cells. *Bone.* 2002; 31(3):396–401.
23. Kinoshita T, Kobayashi S, Ebara S, Yoshimura Y, Horiuchi H, Tsutsumimoto T, et al. Phosphodiesterase inhibitors, pentoxifylline and rolipram, increase bone mass mainly by promoting bone formation in normal mice. *Bone.* 2000; 27(6):811–7.
24. Matzky R, Darius H, Schrör K. The release of prostacyclin (PGI₂) by pentoxifylline from human vascular tissue. *Arzneimittelforschung.* 1982; 32(10):1315–8.

25. Fahr A, Langer R, Sziegoleit W, Albert H, Liebal H, Mest HJ. Influence of pentoxifylline administered in vivo on the synthesis of PGI₂ in human varicose veins. *Biomed Biochim Acta*. 1988; 47(10-11):S238-40.
26. Görög P, Kovacs IB. Prostacyclin is a more potent stimulator of thrombolysis than inhibitor of haemostasis. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 1986; 16(5):337–45.
27. Lima V, Vidal FDP, Rocha FAC, Brito GAC, Ribeiro RA. Effects of tumor necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J Periodontol*. 2004; 75(1):162–8.
28. Labib GS, Farid RM. Osteogenic effect of locally applied pentoxifylline gel: in vitro and in vivo evaluations. *Drug Deliv*. 2015; 22(8):1094–102.
29. Atalay Y, Gunes N, Guner MD, Akpolat V, Celik MS, Guner R. Pentoxifylline and electromagnetic field improved bone fracture healing in rats. *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9:5195–201.
30. Brie D, Sahebkar A, Penson PE, Dinca M, Ursoniu S, Serban MC, et al. Effects of pentoxifylline on inflammatory markers and blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens*. 2016; 34(12):2318-2329.
31. Pal S, Porwal K, Khanna K, Gautam MK, Malik MY, Rashid M, et al. Oral dosing of pentoxifylline, a pan-phosphodiesterase inhibitor restores bone mass and quality in osteopenic rabbits by an osteogenic mechanism: a comparative study with human parathyroid hormone. *Bone*. 2019; 123:28-38.
32. Vashghani Farahani MM, Farahani RM, Abdollahifar MA, Ghatresamani M, Ghoreishi SK, Hajihossainlou B, et al. Effects of pentoxifylline and alendronate on fracture healing in ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *Vet Res Forum*. 2019; 10(2):93–100.
33. Pal S, Porwal K, Singh H, Malik MY, Rashid M, Kulkarni C, et al. Reversal of osteopenia in ovariectomized rats by pentoxifylline: evidence of osteogenic and osteo-angiogenic roles of the drug. *Calcif Tissue Int*. 2019; 105(3):294–307.
34. Gorji MM, Golestaneh A, Razavi SM. The effect of two phosphodiesterase inhibitors on bone healing in mandibular fractures (animal study in rats). *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2020; 46(4):258–65.
35. Neto NC, de Souza Bastos A, Chierici-Marcantonio RA, Marcantonio E. Is rheumatoid arthritis a risk factor for oral bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws? *Med Hypotheses*. 2011; 77(5):905–11.
36. Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014; 142:155–70.

37. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*. 2000; 88(12 Suppl):2961–78.
38. Tolia M, Zygogianni A, Kouvaris JR, Meristoudis C, Margari N, Karakitsos P, et al. The key role of bisphosphonates in the supportive care of cancer patients. *Anticancer Res*. 2014; 34(1):23–37.
39. Nase JB, Suzuki JB. Osteonecrosis of the jaw and oral bisphosphonate treatment. *J Am Dent Assoc*. 2006; 137(8):1115–9.
40. Ponte Fernández N, Estefania Fresco R, Aguirre Urizar JM. Bisphosphonates and oral pathology I. General and preventive aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006; 11(6):E456-61.
41. Choudhary S, Wadhwa S, Raisz LG, Alander C, Pilbeam CC. Extracellular calcium is a potent inducer of cyclo-oxygenase-2 in murine osteoblasts through an ERK signaling pathway. *J Bone Miner Res*. 2003; 18(10):1813-24.
42. Russell RGG. Bisphosphonates: Mode of action and pharmacology. *Pediatrics*. 2007; 119 Suppl 2:S150-62.
43. Rogers MJ, Munoz MA. From vesicle to cytosol. *Elife*. 2018; 7: e38847.
44. Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PJ, Rodan GA. Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase. *J Biol Chem*. 1999; 274(49):34967–73.
45. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman DG, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res*. 2009; 10(10):1478–87.
46. Boonekamp PM, van der Wee-Pals LJ, van Wijk-van Lennep MM, Thesing CW, Bijvoet OL. Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. *Bone Min*. 1986; 1(1):27-39.
47. Colucci S, Minielli V, Zambonin G, Cirulli N, Mori G, Serra M, et al. Alendronate reduces adhesion of human osteoclast-like cells to bone and bone protein-coated surfaces. *Calcif Tissue Int*. 1998; 63(3):230-5.
48. Flanagan AM, Chambers TJ. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. *Calcif Tissue Int*. 1991;49(6):407–15.
49. Piper K, Boyde A, Jones SJ. The effect of 3-amino-1-hydroxypropylidene-1,1-bisphosphonate (ADP) on the resorptive function of osteoclasts of known nuclear number. *Calcif Tissue Int*. 1994; 54(1):56–61.

50. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates: Current Status. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(20):6222s-30s.
51. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch K-H, Blaschke S, Gründker C, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 291(3):680–6.
52. Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Bisphosphonates: effects on osteoblast. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012; 68(7):1013–8.
53. Ohe J-Y, Kwon Y-D, Lee H-W. Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived osteoblasts. *Clin Oral Investig.* 2012; 16(4):1153–9.
54. Ledoux D, Hamma-Kourbali Y, Di Benedetto M, Foucault-Bertaud A, Oudar O, Sainte-Catherine O, et al. A new dimethyl ester bisphosphonate inhibits angiogenesis and growth of human epidermoid carcinoma xenograft in nude mice. *Anticancer Drugs.* 2006; 17(4):479–85.
55. Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res.* 2002; 62(22):6538–44.
56. Santini D, Vincenzi B, Avvisati G, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, et al. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenetic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(5):1080–4.
57. Vincenzi B, Santini D, Rocci L, Tonini G. Bisphosphonates: new antiangiogenic molecules in cancer treatment? *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2003; 14(5):806–7.
58. Cackowski FC, Anderson JL, Patrene KD, Choksi RJ, Shapiro SD, Windle JJ, et al. Osteoclasts are important for bone angiogenesis. *Blood.* 2010; 115(1):140–9.
59. Kapitola J, Zák J. Effect of pamidronate on bone blood flow in oophorectomized rats. *Physiol Res.* 1998; 47(4):237–40.
60. Schoutens A, Verhas M, L'Hermite-Baleriaux M, L'Hermite M, Verschaeren A, Dourov N, et al. Growth and bone haemodynamic responses to castration in male rats. Reversibility by testosterone. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1984; 107(3):428–32.
61. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid – related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2014; 42(6):744–50.

62. de Molon RS, Shimamoto H, Bezouglaia O, Pirih FQ, Dry SM, Kostenuik P, et al. OPG-Fc but not zoledronic acid discontinuation reverses osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice. *J Bone Miner Res*. 2015; 30(9):1627–40.
63. Kang P, Xie X, Tan Z, Yang J, Shen B, Zhou Z, et al. Repairing defect and preventing collapse of femoral head in a steroid-induced osteonecrotic of femoral head animal model using strontium-doped calcium polyphosphate combined BM-MNCs. *J Mater Sci Mater Med*. 2015; 26(2):80.
64. Yanık S, Aras MH, Erkiş S, Bozdağ Z, Demir T, Çetiner S. Histopathological features of bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw in rats with and without vitamin d supplementation. *Arch Oral Biol*. 2016; 65:59–65.
65. Brunsvold MA, Chaves ES, Kornman KS, Aufdemorte TB, Wood R. Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontol*. 1992; 63(10):825–30.
66. Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG, Aufdemorte TB, Brunsvold M, Chaves E, et al. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontal Res*. 1994; 29(1):35–40.
67. Reddy MS, Weatherford TW, Smith CA, West BD, Jeffcoat MK, Jacks TM. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol*. 1995; 66(3):211–7.
68. Rocha ML, Malacara JM, Sánchez-Marin FJ, de la Torre CJV, Fajardo ME. Effect of alendronate on periodontal disease in postmenopausal women: a randomized placebo-controlled trial. *J Periodontol*. 2004; 75(12):1579–85.
69. Lane N, Armitage GC, Loomer P, Hsieh S, Majumdar S, Wang H-Y, et al. Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo-controlled study. *J Periodontol*. 2005; 76(7):1113–22.
70. Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel in adjunct to mechanotherapy in the treatment of aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2012; 83(1):19–26.
71. Tanna NK, Jeffcoat MK. Actonel® (risedronate) therapy for the maintenance of alveolar bone in adult chronic periodontitis. *Health (Irvine Calif)*. 2013; 5(7):12–7.
72. Bhavsar N V., Trivedi SR, Dulani K, Brahmbhatt N, Shah S, Chaudhri D. Clinical and radiographic evaluation of effect of risedronate 5 mg as an adjunct to treatment of chronic periodontitis in postmenopausal women (12-month study). *Osteoporos Int*. 2016;27(8):2611–9.

73. Akram Z, Abduljabbar T, Kellesarian SV, Abu Hassan MI, Javed F, Vohra F. Efficacy of bisphosphonate as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy in the management of periodontal disease: a systematic review. *Br J Clin Pharmacol.* 2017; 83(3):444-54.
74. Messer JG, Mendieta Calle JL, Jiron JM, Castillo EJ, Van Poznak C, Bhattacharyya N, 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.
75. Donos N, Graziani F, Mardas N, Kostopoulos L. The use of human hypertrophic chondrocytes-derived extracellular matrix for the treatment of critical-size calvarial defects. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22(12):1346–53.
76. Schwarz T, Schwarz A, Krone C, Luger TA. Pentoxifylline suppresses allergic patch test reactions in humans. *Arch Dermatol.* 1993; 129(4):513-4.
77. Lima V, Vidal FDP, Rocha FAC, Brito GAC, Ribeiro RA. Effects of tumor necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J Periodontol.* 2004; 75(1):162–8.
78. Gomes CC, Freitas DQ, Medeiros Araújo AM, Ramírez-Sotelo LR, Yamamoto-Silva FP, de Freitas Silva BS, et al. Effect of alendronate on bone microarchitecture in irradiated rats with osteoporosis: micro-CT and histomorphometric analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2018; 76(5):972–81.
79. Graziani F, Cei S, Guerrero A, La Ferla F, Vano M, Tonetti M, et al. Lack of short-term adjunctive effect of systemic neridronate in non-surgical periodontal therapy of advanced generalized chronic periodontitis: an open label-randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(5):419–27.
80. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs.* 1987; 34(1):50-97.
81. Lin SL, Chen RH, Chen YM, Chiang WC, Lai CF, Wu KD, et al. Pentoxifylline attenuates tubulointerstitial fibrosis by blocking Smad3/4-activated transcription and profibrogenic effects of connective tissue growth factor. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16(9):2702–13.
82. Scott PG, Dodd CM, Tredget EE, Ghahary A, Rahemtulla F. Chemical characterization and quantification of proteoglycans in human post-burn hypertrophic and mature scars. *Clin Sci.* 1996; 90(5):417–25.
83. Isaac C, Mathor MB, Bariani G, Paggiaro AO, Herson MR, Goldenstein-Schainberg C, et al. Pentoxifylline modifies three-dimensional collagen lattice model contraction and expression of collagen types I and III by human fibroblasts derived from post-burn hypertrophic scars and from normal skin. *Burns.* 2009; 35(5):701–6.

84. Yalcin-Ulker GM, Cumbul A, Duygu-Capar G, Uslu Ü, Sencift K. Preventive effect of phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline against medication-related osteonecrosis of the jaw: an animal study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017; 75(11):2354–68.
85. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, S. Bastos A, Guimarães M, Marcantonio E. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol.* 2013; 94(1):65-73.
86. da Silva LAB, da Silva RAB, Branco LGS, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dent J.* 2008; 19(4):296–300.
87. Odze RD, Marcial MA, Antonioli D. Gastric fundic gland polyps: a morphological study including mucin histochemistry, stereometry, and MIB-1 immunohistochemistry. *Hum Pathol.* 1996; 27(9):896–903.

APÊNDICE A – MATERIAL E MÉTODOS

Comitê de Ética

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal (processo nº 16/2018) (em anexo), dentro dos regulamentos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Grupos Experimentais de Acordo com os Estudos

ESTUDO 1 - Influência de alendronato e pentoxifilina na progressão da doença periodontal induzida (publicação 1)

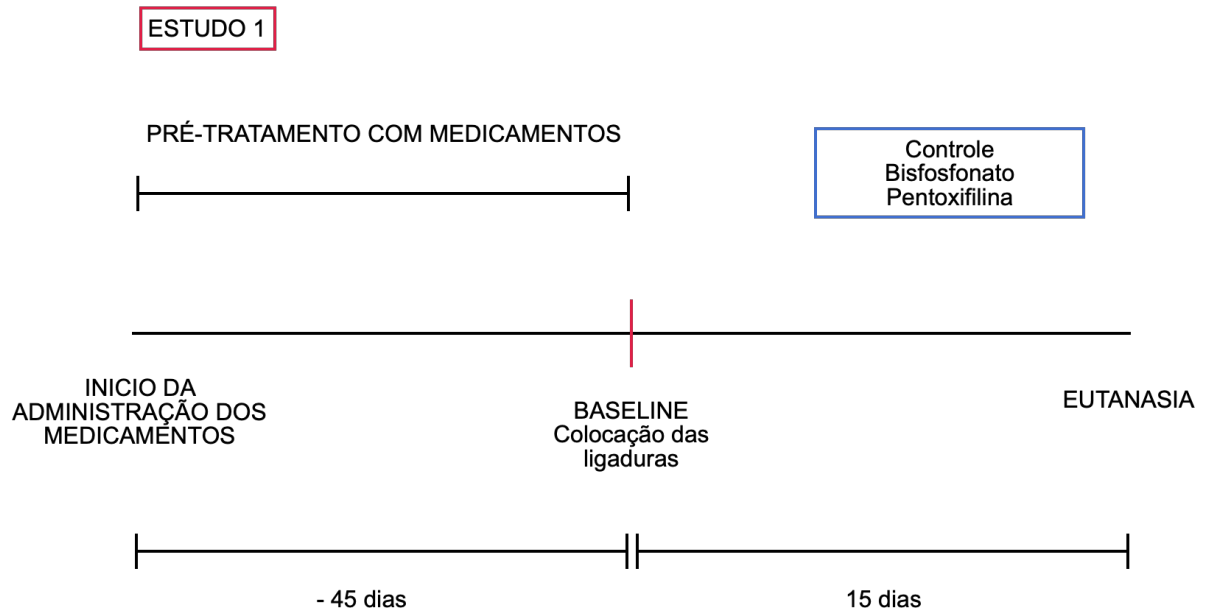
Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos com 7 animais em cada grupo (n=14 ligaduras/grupo). Os grupos foram divididos em:

Grupo controle (CT): Os animais foram submetidos a administração diária de soro fisiológico por injeção subcutânea durante 60 dias. Após 45 dias de início da administração do soro, foi induzida a doença periodontal com a inserção das ligaduras nos dois segundos molares superiores. Após 15 dias os animais foram eutanasiados.

Grupo pentoxifilina (PTX): Os animais foram submetidos a administração diária de pentoxifilina (Medley Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado 50 mg/kg/dia⁸⁴ por gavagem durante 60 dias. Após 45 dias de início da administração do medicamento, foi induzida a doença periodontal com a inserção das ligaduras nos dois segundos molares superiores. Após 15 dias os animais foram eutanasiados.

Grupo bisfosfonato (BIS): Os animais foram submetidos a administração diária de bisfosfonato (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia⁸⁵ durante 60 dias. Após 45 dias de início da administração do medicamento, foi induzida a doença periodontal com a inserção das ligaduras nos dois segundos molares superiores. Após 15 dias os animais foram eutanasiados.

Figura A1 - Esquema de distribuição dos animais nos grupos e períodos.



Fonte: Elaboração própria.

ESTUDO 2 – Influência de alendronato e pentoxifilina no tratamento da doença periodontal induzida (publicação 2)

Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos com 2 sub-grupos cada (7 animais em cada sub-grupo/período; n=14 ligaduras/sub-grupo/período). Os grupos e sub-grupos foram divididos em:

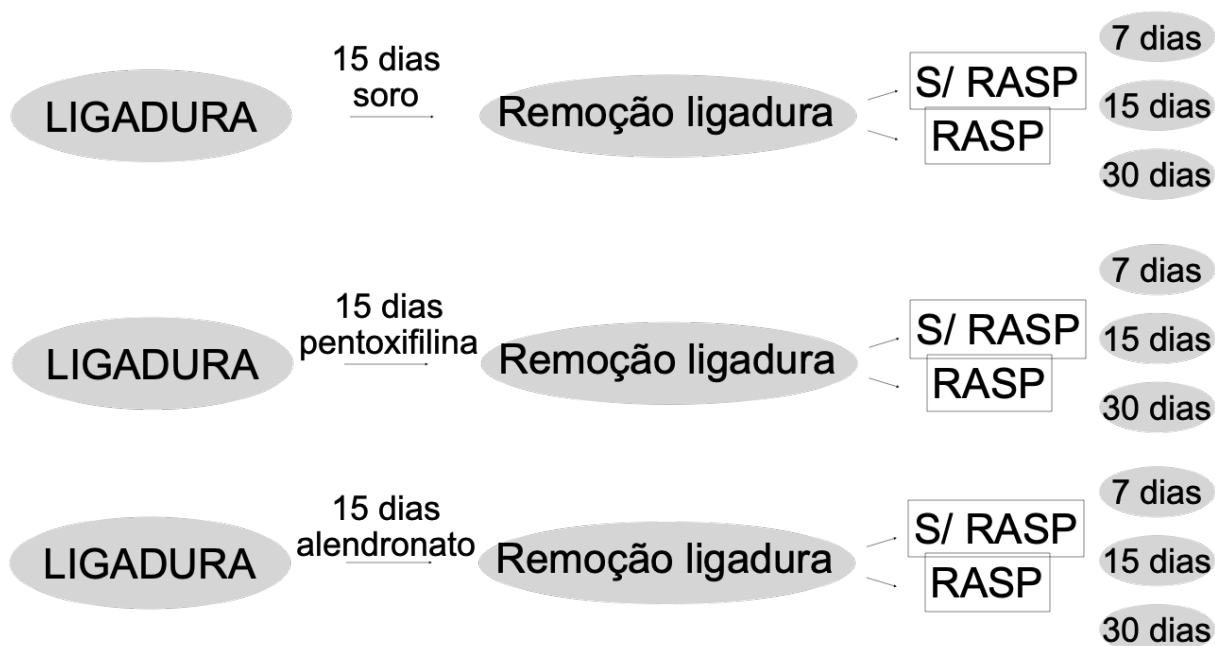
Controle (CT): No momento de indução da doença periodontal com ligaduras nos dois segundos molares superiores os animais foram submetidos a administração diária de soro fisiológico por injeção subcutânea até o momento da eutanásia. Após 15 dias da indução da doença periodontal, as ligaduras foram removidas. Neste momento um grupo de animais recebeu raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais (mini Gracey 5-6, HuFriedy, USA) (**grupo CTR**) e outro grupo (**grupo CT**) não recebeu nenhum tratamento. Após os períodos de 7, 15 e 30 dias os animais foram eutanasiados.

Grupo pentoxifilina (PTX): No momento de indução da doença periodontal com ligaduras nos dois segundos molares superiores os animais foram submetidos a administração diária de pentoxifilina (Medley Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado 50 mg/kg/dia⁸⁴ por gavagem até o momento da eutanásia. Após 15 dias da indução da doença periodontal, as ligaduras foram removidas. Neste momento um

grupo de animais recebeu raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais (mini Gracey 5-6, HuFriedy, USA) (**grupo PTXR**) e outro grupo (**grupo PTX**) não recebeu nenhum tratamento. Após os períodos de 7, 15 e 30 dias os animais foram eutanasiados.

Grupo bisfosfonato (BIS): No momento de indução da doença periodontal com ligaduras nos dois segundos molares superiores os animais foram submetidos a administração diária de bisfosfonato (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia⁸⁵ até o momento da eutanásia. Após 15 dias da indução da doença periodontal, as ligaduras foram removidas. Neste momento um grupo de animais recebeu raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais (mini Gracey 5-6, HuFriedy, USA) (**grupo BISR**) e outro grupo (**grupo BIS**) não recebeu nenhum tratamento. Após os períodos de 7, 15 e 30 dias os animais foram eutanasiados.

Figura A2 - Esquema de distribuição dos animais nos grupos e períodos.



Fonte: Elaboração própria.

Amostra

Neste estudo foram utilizados ratos (*Rattus Norvegicus*), variação *albinus*, *Holtzman*, adultos, com peso variando entre 180-220 gramas. Os animais foram mantidos em caixas com no máximo 5 animais/caixa, tratados com ração e água ad libitum antes e durante todo o período experimental, mantidos em ambiente com luz e temperatura controladas.

Indução da Doença Periodontal

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 80 mg/kg de massa corporal (Cloridrato de Quetamina - Francotar 3% – Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda.) e 7 mg/kg massa corporal (Cloridrato de Xilazina - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda). Posteriormente, os ratos foram colocados em posição supina na mesa operatória. Cada animal, para ganhar livre acesso aos dentes da região posterior da maxila, teve a boca retraída por um retrator para afastar queixo e língua, facilitando a abertura bucal. As ligaduras (fios de algodão, nº 24) foram inseridas através de sonda e pinça específicas na região subgengival em volta dos segundos molares superiores, para que fosse induzida a doença periodontal através do acúmulo de placa bacteriana. Após um período de 15 dias, as ligaduras foram removidas e os tratamentos aplicados em cada grupo.

Obtenção das Peças Cirúrgicas

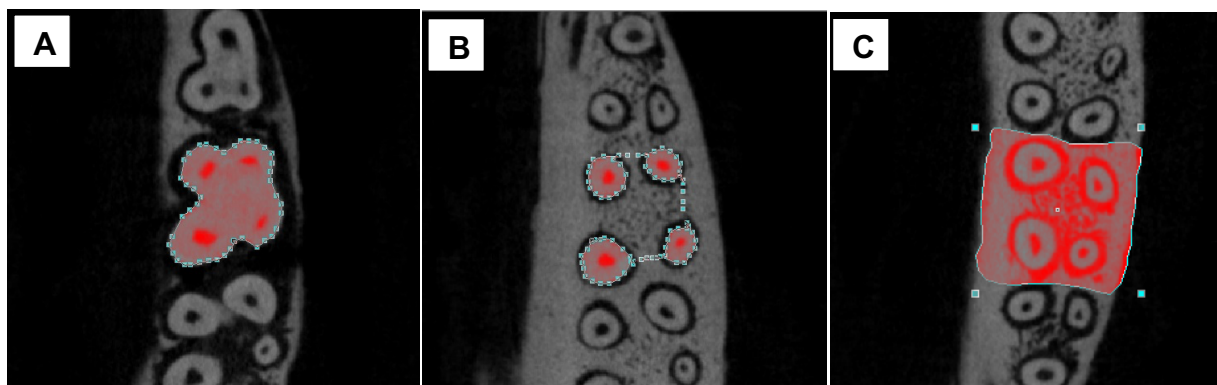
Após os períodos correspondentes os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica. As hemi-maxilas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10% por um período mínimo de 48 horas. Após este período as peças foram lavadas em água corrente e colocadas em álcool 70%.

Microtomografia Computadorizada (μCT)

Após o período de fixação em paraformaldeído, as hemi-maxilas foram armazenadas em álcool 70%, e submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada, que avaliou a porcentagem de volume ósseo presente na região do segundo molar superior. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker

MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), utilizando cortes de 18 μm (50Kv e 500 μ), filtro de Al 0.5mm; tamanho do voxel: 17,48 μm ; voltagem de 50KV e corrente elétrica de 500 μA . As imagens obtidas pela projeção dos raios X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas pelo software NRecon. Essas imagens foram rotacionadas e reposicionadas em uma orientação padrão, com o auxílio do software DataViewer e salvas no plano coronal. Em seguida, o software CTAnalyser – CTAn, foi utilizado para a delimitação área de interesse (ROI- *Region Of Interest*). Foram confeccionados dois ROIs para cada peça. O primeiro ROI foi localizado no segundo molar no sentido corono/apical da região do teto de furca até 1.000 micrometros no sentido apical até suas limitações proximais com os dentes vizinhos, do qual, foi extraído o valor de “tecido ósseo” dado pela leitura do segundo ROI, que possui a mesma delimitação anatômica, mas circundando apenas as raízes do segundo molar.

Figura A3 - Ilustração da análise microtomográfica representando o segundo molar superior. Em A e B tem-se o ROI 2 (a região de raízes e final de teto da furca) e em C está representado o ROI 1.



Fonte: Elaboração própria.

Análises Histológica, Histométrica e Estereométrica

Após o período de fixação, as peças foram lavadas em água corrente por 24h e submersas em solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético) para descalcificação. Posteriormente, as peças foram lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados com

5 μm de espessura, sendo alocados 3 cortes por lâmina e 12 lâminas foram obtidas por amostra.

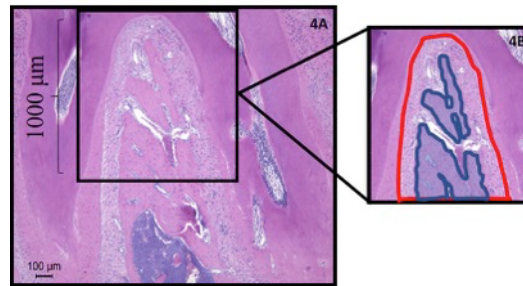
Análise histológica e histométrica

As lâminas para análise histológica foram coradas com Hematoxilina e eosina (HE). Para obtenção das imagens, elas foram posicionadas no microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) com objetiva para aumento de 4.0/20 vezes, através do qual as imagens foram captadas e enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo DXC-1107A/107AP (Sony Eletronics Inc, Japão). Na análise histológica foram observadas as reações inflamatórias do tecido conjuntivo em cada grupo experimental, processos de reabsorção óssea e neoformação tecidual. As avaliações foram realizadas por um examinador treinado, calibrado e cego para os grupos experimentais (FCG).

Para realização da histometria, um examinador cego e calibrado (FCG) selecionou 3 lâminas de cada grupo, equidistantes 50 μm entre si. As mensurações foram feitas utilizando o software de imagens ImageJ - Launcher versão 1.48b (National Institutes of Health, USA). Foi avaliada a quantidade de tecido ósseo na região de furca e proximais.

Área de furca: Para a área da região de furca foi considerada a metodologia de acordo com da Silva et al.⁸⁶ onde foi mensurado 1000 μm a partir do teto da furca delimitado pelas raízes, e medido a área de furca e a de osso, obtendo assim, a quantidade de osso presente na região de furca de cada corte histológico.

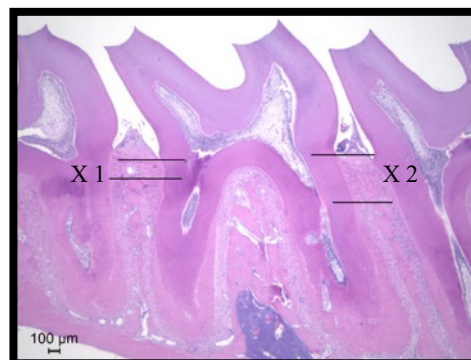
Figura A4 - Imagem representativa da delimitação da área de furca para análise de porcentagem de perda óssea. Em 4A representada a delimitação da área de furca, 1000µm abaixo do teto da furca, e em 4B, as delimitações de área total de furca (vermelho) e de osso presente (azul).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Área proximal: os valores da extensão da perda óssea para a área proximal foram obtidos nas imagens com aumento de 10 vezes. Foram traçadas linhas na altura da junção cemento-esmalte (X1 e X2), e na altura da crista óssea. Com a ajuda do software Image J a distância entre elas foi obtida, inicialmente em pixels e posteriormente transformados em milímetros.

Figura A5 - Imagem representativa para as medidas de perda óssea interproximal mesial e distal. Duas linhas horizontais foram traçadas nas alturas da crista óssea e junção cemento-esmalte. Então a distância entre as linhas primeiro na mesial e depois na distal era obtida e uma média foi calculada.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Análise estereométrica

Nas fotomicrotomografias, uma grade foi confeccionada com 130 pontos coincidentes das intersecções das linhas horizontais e verticais e posicionada sobre a imagem, nas áreas: A- Regiões proximais mesial e distal do segundo molar (regiões subepitelial e supracristal) e sobre B- Furca (sendo que nessa teve uma área de 30.000 μm^2). As células presentes sobre cada intersecção foram definidas. Em seguida, foi executada uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados, de acordo com Odze et al.⁸⁷. Dessa forma, foi determinada a densidade volumétrica relativa (ou proporção) dos seguintes componentes teciduais: tecido conjuntivo, osso, fibroblastos, tecido inflamatório (células não identificáveis), células inflamatórias e vasos sanguíneos. A análise foi realizada por um examinador cego e treinado (FCG)

Análise Estatística

Os dados gerados pelas análises histométricas, estereométrica, e microtomográficas foram numéricos. Dessa forma foram submetidos ao teste de Normalidade de Shapiro-Wilk para avaliar se os dados respeitaram a distribuição de acordo com o teorema da distribuição central. Como os dados foram normais, os testes paramétricos de Anova complementado pelo teste de Tukey foram utilizados para a análise inferencial dos dados. A significância estatística foi definida em $p < 0,05$.

ANEXO A – CERTIFICADO DE COMITÊ DE ÉTICA



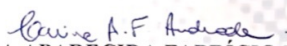
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"AVALIAÇÃO DE MEDICAMENTOS QUE INTERFEREM NA MODULAÇÃO ÓSSEA ASSOCIADO OU NÃO AO BISFOSFONATO. ESTUDO NA GENGIVITE EXPERIMENTAL EM RATOS"**, registrada com o nº 16/2018, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Rosemary Adriana Chierici Marcantonio** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 25/06/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Março/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato – Rattus Norvegicus, albinus, Holtzmann
Nº de animais	616
Peso/Idade	180-220g – 8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Não autorizo a publicação deste trabalho até 23/06/2023.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 23 de junho de 2021.

Isabella Fernanda dos Santos