



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO

PRISCYLLA GONÇALVES CORREIA LEITE DE MARCELOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA PERIODONTITE
INDUZIDA EM RATOS: ANÁLISE HISTOLÓGICA E MICROTOMOGRÁFICA**

Recife, PE

2017

Priscylla Gonçalves Correia Leite de Marcelos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO PERIODONTITE
INDUZIDA EM RATOS: ANÁLISE HISTOLÓGICA E MICROTOMOGRÁFICA**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, área de concentração em Clínica Integrada.

Orientadora: Prof^a Dr^a Flávia Maria de Moraes Ramos Perez

Co-orientador: Prof Dr Danyel Elias da Cruz Perez.

Recife, PE

2017

Catálogo na Fonte

Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M314a Marcelos, Priscylla Gonçalves Correia Leite de.

Avaliação do efeito do ácido zoledrônico na periodontite induzida em ratos: análise histológica e microtomográfica / Priscylla Gonçalves Correia Leite de Marcelos. – 2017.

74 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Flávia Maria de Moraes Ramos Perez.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2017.

Inclui referências e anexos.

1. Bisfosfonato. 2. Osteonecrose da arcada osseodentária associada à bisfosfonato. 3. Periodontite. 4. Microtomografia por raio-x. I. Perez, Flávia Maria de Moraes Ramos (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2017-192)

PRISCYLLA GONÇALVES CORREIA LEITE DE MARCELOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRONICO NA PROGRESSÃO DA
DOENÇA PERIODONTAL EM RATOS: ANÁLISE MORFOLÓGICA E
MICROTOMOGRÁFICA**

Aprovado em 15 de fevereiro de 2017

Orientadora: Profa. Dra. FLÁVIA MARIA DE MORAES RAMOS PEREZ

Banca Examinadora:

5º _____

Profa. Dra. FLÁVIA MARIA DE MORAES RAMOS PEREZ (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

4º _____

Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

3º _____

Profa. Dra. HELENA AGUIAR RIBEIRO DO NASCIMENTO (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

2º _____

Profa. Dra ANA MARLY ARAUJO MAIA. (Examinador Externo)

Universidade Estadual da Paraíba

1º _____

Prof. Dr. RENATO DE VASCONCELOS ALVES (Examinador Externo)

FOP/UPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prof^a. Dr^a. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

COLEGIADO

Prof^a. Dr^a. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof^a. Dr^a. Andrea Cruz Câmara

Prof^a. Dr^a. Andrea dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior

Prof^a. Dr^a. Bruna de Carvalho Farias Vajgel

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof^a. Dr^a. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Prof^a. Dr^a. Jurema Freire Lisboa de Castro

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof^a. Dr^a. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof^a. Dr^a. Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

Dedico meu trabalho ao anjo da minha vida: meu filho Bernardo! Ele é o meu maior mestre.

Mesmo tão pequeno, me ensinou a ser paciente, a seguir em frente mesmo em condições adversas. Me ensinou que os problemas podem ser pequenos se a vida for vivida com amor. Fui ausente por muitos momentos, não fui inteira em tudo que fiz, mas corri atrás para tentar dar a ele sempre o melhor e ser a melhor mãe que podia ser.

Sempre meu melhor será para você, meu filho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus;

À Universidade Federal de Pernambuco, em nome do Reitor Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia em nome da coordenadora Prof. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho, por proporcionar mais uma etapa na minha vida;

Aos Profs Dr Richard Heck e Antônio Celso D. Antonino do Departamento de Energia Nuclear (DEN) e aos seus alunos de pós-graduação que foram fundamentais na pesquisa;

Aos meus orientadores, Prof^a Dr^a Flávia Perez e Prof Dr Danyel Perez, pela formação, pela paciência e por toda colaboração. Meu sincero obrigada!;

À Prof^a Dr^a Ana Marly Araújo Maia pela ajuda em todas as etapas da microtomografia computadorizada, pela disponibilidade e gentileza que sempre tirou minhas dúvidas;

Aos meus pais, pelo apoio fundamental com a criação do meu filho e ao exemplo de busca pela educação;

Ao meu marido, Dário Marcelos, por ser o melhor parceiro que a vida podia me presentear, pelos anos de amor, lealdade e companheirismo, por não ter me deixado desistir e por acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma;

Aos meus amigos, Diego Moura e Samuel Araújo, pela amizade sólida e bonita que os anos dentro do biotério nos proporcionaram. Os sufocos foram mais divertidos ao lado deles;

Às colegas de doutorado, Marina Maymone e Angelinne Gomes, pela ajuda com a microtomografia computadorizada;

À histotécnica Silvania Paz pelos cortes histológicos e pela disponibilidade de sempre com que me trata e à Seu Paulo pelos 9 anos ajudando com os animais no biotério;

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas, o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O objetivo neste trabalho foi avaliar a ação do ácido zoledrônico (zometa) na progressão da periodontite induzida em primeiros molares inferiores de ratos. Foram utilizados 48 ratos Wistar distribuídos aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n=8 cada grupo), sendo 3 grupos expostos ao fármaco zometa (0,15mg/kg) e 3 grupos controles tratados com soro a 0,9%: Zom/Lig30 – animais expostos ao fármaco por 4 semanas com posterior indução da periodontite com fio de sutura no último dia de droga e eutanásia 30 dias após a indução; Zom/Lig15 – grupo tratado por 4 semanas com posterior indução da periodontite no último dia de droga e eutanásia 15 dias após a indução; Lig/Zom – grupo no qual foi induzida a periodontite e 15 dias após, o zometa foi administrado por 8 semanas. A eutanásia ocorreu 1 semana após a última dosagem. Os grupos Con/Lig30, Com/Lig15 e Lig/Con, representam, respectivamente, os controles dos grupos citados acima. Após o sacrifício, as hemimandíbulas esquerdas foram removidas e avaliadas por meio de microtomografia computadorizada (μ CT) e histometria. A perda óssea foi mensurada nas regiões de furca e raiz distal na microtomografia e na histometria. A presença da osteonecrose foi avaliada histologicamente. Os dados foram avaliados utilizando o teste t Student, para análise da microtomografia e Mann-Whitney para a histometria, ambos com nível de significância de 5%. Na histologia, foi possível evidenciar osteonecrose nos grupos Zom/Lig30, Zom/Lig15 e Con/Lig30. Na μ CT, a raiz distal no grupo Lig/Con apresentou maior reabsorção comparado com o Lig/Zom ($p<0,05$). Na histometria, o osso alveolar da raiz distal apresentou maior reabsorção nos grupos Zom/Lig30 ($p=0,005$), Con/Lig15 ($p<0,001$) e Lig/com ($p=0,001$). Enquanto que a furca teve maior reabsorção nos grupos Zom/Lig30 ($p=0,046$) e no grupo Lig/Con ($p<0,001$). Conclui-se que o ácido zoledrônico diminui a reabsorção óssea alveolar em periodontite induzida em ratos tratados com a droga a longo prazo, além de apresentar o risco de desenvolver osteonecrose dos maxilares associados a bisfosfonatos na presença de trauma tecidual e infecção.

Palavras-chave: Bisfosfonato. Osteonecrose da Arcada Osseodentária Associada à Bisfosfonato. Periodontite. Microtomografia por Raio-X.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the action of zoledronic acid (zometa) on the progression of periodontitis induced in the lower first molars of rats. A total of 48 Wistar rats randomly distributed in 6 experimental groups (n = 8 each) were used. Three groups were exposed to drug zometa (0.15mg/kg) and three control groups treated with 0.9% serum: Zom/Lig30 - Animals exposed to the drug for 4 weeks with subsequent induction of periodontitis with suture wire on the last day of drug and euthanasia 30 days after induction; Zom/Lig15 - group treated for 4 weeks with subsequent induction of periodontitis on the last day of drug and euthanasia 15 days after induction; Lig/Zom - group in which periodontitis was induced and 15 days later, zometa was given for 8 weeks. Euthanasia occurred 1 week after the last dosing. The groups Con/Lig30, Con/Lig15 and Lig/Con, respectively, represent the controls of the groups mentioned above. After sacrifice, the left hemi-jaws were removed and evaluated by means of Computerized Microtomography (μ CT) and histometry. Bone loss was measured in the furcation and distal root regions in microtomography and histometry. The presence of osteonecrosis was evaluated histologically. The data were evaluated using Student's t test for microtomography and Mann-Whitney for histometry, both with significance level of 5%. In histology, it was possible to show osteonecrosis in the Zom/Lig30, Zom/Lig15 and Con/Lig30 groups. In the μ CT, the distal root in the Lig/Con group presented greater resorption compared to the Lig/Zom ($p < 0.05$). In histometry, alveolar bone of the distal root presented greater resorption in the Zom/Lig30 ($p = 0.005$), Con/Lig15 ($p < 0.001$) and Lig/Con ($p = 0.001$) groups. While the furca had greater resorption in the Zom/Lig30 groups ($p = 0.046$) and in the Lig/Con group ($p < 0.001$). It is concluded that zoledronic acid decreases alveolar bone resorption in periodontitis induced in rats treated with the drug in the long term, and presents the risk of developing osteonecrosis of the maxilla associated with bisphosphonates in the presence of tissue trauma and infection.

Key words: Bisphosphonates. Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw. Periodontal Diseases. X-Ray Microtomography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diferença estrutural entre o Pirofosfato e o Bisfosfonato.....	16
Figura 2. Posicionamento da amostra no microtomógrafo.....	24
Figura 3. Microtomógrafo NIKON XT-H 225 ST acoplado a um computador de comando.....	25
Figura 4. Posicionamento do dente com as raízes perpendiculares ao solo. Corte axial (A), corte sagital (B) e corte coronal (C).....	27
Figura 5. Mensuração no corte coronal. Linhas de referência horizontais (brancas). Distância vertical entre as linhas de referência da face vestibular da raiz (amarela).....	27
Figura 6. Histometria. Linha horizontal de orientação e medição vertical da reabsorção óssea na raiz distal raiz distal (A). Medição vertical de toda extensão da furca (B). Aumento de 2x.....	29

Ilustrações do artigo

Figura 1. Reconstruções axial (A), sagital (B) e coronal (C) da área de interesse. Corte coronal utilizado para medição (D) traçando duas linhas horizontais (linhas brancas) na altura da junção amelo-cementária e na porção mais alta crista óssea alveolar. Mensuração da distância entre as linhas horizontais (linha amarela).....	47
Figura 2. Cortes da microCT (sagital). Zom/Lig30 (A), Con/Lig30 (B), Zom/Lig15 (C), Con/Lig15 (D), Lig/Zom (E), Lig/Con (F). Reabsorção alveolar na furca (seta amarela), sequestro ósseo (seta vermelha).....	48
Figura 3. Cortes histológicos da inflamação na periodontite induzida. Grupos Zom/Lig30 (A), Zom/Lig15 (C), Con/Lig30 (B), Con/Lig15 (D), Lig/Zom (E) e Lig/Con (F). Aumento de 2x. Infiltrado inflamatório leve (seta vermelha), infiltrado inflamatório moderado (seta amarela), osteonecrose com formação de sequestro ósseo (seta verde) e osso viável (seta preta).....	49

Figura 4. Osteonecrose nos grupos Zom/Lig30 (A e B) e Zom/Lig15 (C e D). Aumento de 10x (A, C) e de 5x (B, D). Osteonecrose com formação de sequestro ósseo (seta vermelha), osso necrótico (seta verde), infiltrado inflamatório (seta amarela) e perda de osteócitos confluentes (40x).....50

Figura 5. Osteonecrose nos grupos Con/Lig30 (E e F) e Lig/Con (G e H). Aumento de 10x (E, G) e de 5x (F, H). Osteonecrose com formação de sequestro ósseo (seta vermelha), infiltrado inflamatório (seta amarela) e perda de osteócitos confluentes (40x).....51

Lista de tabelas

Tabela 1. Média e desvio padrão (DP) da reabsorção óssea na raiz distal e na furca na microtomografia computadorizada.....	45
Tabela 2. Média e desvio padrão (DP) da reabsorção óssea na raiz distal e na furca na histometria.....	45
Tabela 3. Média e desvio padrão (DP) do grau de inflamação na região da furca na histologia.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOMS - Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

ATP - Adenosina Trifosfato

BFs - Bisfosfonato

kV - Kilovolts

kg - Kilogramas

LPS - Lipopolissacarídeo

LTC - Laboratório de Tomografia Computadorizada

mA - miliamper

MicroCT - Microtomografia Computadorizada

mg - Miligramas

NCE - Núcleo de Cirurgia Experimental

OMAB - Osteonecrose dos Maxilares Associada aos Bisfosfonatos

OPG - Osteoprotegerina

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

μ - microns

μm - micrômetros

μs - microssegundo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Considerações éticas	22
3.2 Tipo de estudo	22
3.3 Local de estudo	22
3.4 Hospedagem dos animais	22
3.5 Grupos de estudo	22
3.6 Indução da Periodontite com ligadura de algodão	23
3.7Preparação dos espécimes	24
3.8Análise por Microtomografia computadorizada (microCT)	24
3.9Processamento histológico	26
3.10Análise histológica	27
3.11Análise histomorfométrica	28
3.12Análise estatística	28
5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EM RATOS: ANÁLISE HISTOLÓGICA E MICROTOMOGRÁFICA	30
6 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	57
ANEXO A – Comitê De Ética	57
ANEXO B - Normas da Revista	58

1 INTRODUÇÃO

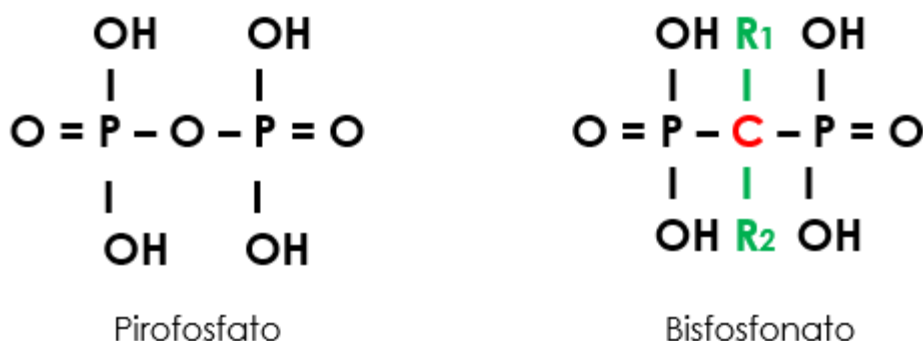
Ao longo das duas últimas décadas, os bisfosfonatos (BFs) foram apresentados como uma opção terapêutica no tratamento de doenças ósseas metabólicas. Estas drogas permitem o aumento da massa óssea e diminuem o risco de fratura em patologias como na doença de Paget, no mieloma múltiplo, em determinadas patologias congênitas como a osteogênese imperfeita e a osteoporose (Coleman, 2008).

Os bisfosfonatos são análogos sintéticos do pirofosfato, contendo uma estrutura molecular P-C-P, onde o carbono substitui o oxigênio central do pirofosfato. Esta estrutura confere à droga resistência à hidrólise, à degradação e capacidade de se ligar a íons metálicos bivalentes, tais como Ca^{2+} (Roelofs et al., 2006) (Figura 1).

Ao carbono central se ligam as cadeias laterais R1 e R2. Essas cadeias podem variar de componente, permitindo a síntese de drogas com propriedades farmacológicas diferentes (Arantes et al., 2010). A pequena cadeia lateral R1 fornece a afinidade dos BFs aos cristais ósseos e pode ser hidrogênio (H), cloreto (Cl) ou um grupamento hidroxila (OH), tendo este último a interação mais estável com a matriz do osso por ter maior afinidade com o cálcio (Hampson e Fogelman, 2012).

A longa cadeia lateral R2 confere as propriedades características e a potência de ação (Arantes et al., 2010). A classificação dos bisfosfonatos se baseia na presença ou ausência de um átomo de nitrogênio na cadeia lateral R2. Os que contêm nitrogênio são inibidores mais potentes da ação dos osteoclastos (Yamashita et al., 2011).

Figura 1. Diferença estrutural entre o Pirofosfato e o Bisfosfonato.



Devido à grande afinidade por íons de cálcio, o fármaco é rapidamente eliminado da circulação e aderido às superfícies minerais do osso *in vivo* nos locais de remodelação óssea ativa, zonas submetidas à reabsorção osteoclástica (Dannemann et al., 2006). Os BFs ligados

à estrutura óssea sofrem endocitose junto com a matriz óssea durante o processo de reabsorção osteoclástica (Roelofs et al., 2010). Uma vez dentro da célula, alteram uma variedade de processos bioquímicos, resultando na perda da capacidade reabsortiva dos osteoclastos ou até mesmo antecipa a apoptose (Dannemann et al., 2006).

A ação dentro da célula ocorre de acordo com o grupo a que pertence. Bisfosfonatos que contêm nitrogênio, como o ácido zoledrônico, pertencem a um grupo mais potente. Esse grupo inibe a enzima farnesil-difosfato-sintase, uma etapa importante na via da síntese do colesterol. Como resultado, o recrutamento e a diferenciação dos precursores dos osteoclastos são inibidos, a ligação de osteoclastos ao osso é prejudicada e a ativação das unidades de remodelação óssea é reduzida. A apoptose dos osteoclastos, também é induzida, o que pode contribuir para o efeito anti-reabsorção (McClung, 2015).

Já os BFs não nitrogenados, dentro da célula produzem um análogo tóxico da Adenosina Trifosfato (ATP), interferindo na função mitocondrial, levando a apoptose. Como consequência dessa atividade, o recrutamento e a diferenciação dos precursores dos osteoclastos é inibido, a ligação do osteoclasto no osso é prejudicada e a remodelação ou reabsorção óssea é reduzida (Rosini et al., 2015).

Parte da ação inibitória da droga sobre os osteoclastos ocorre mediada pelos osteoblastos (Sahni et al., 1993). Estudos *in vitro* elucidaram que esses fármacos controlam funções osteoblásticas como a proliferação e diferenciação celular (Reinholz et al., 2000) e possuem a capacidade de prevenir a apoptose destas células (Plotkin et al., 1999).

Apesar dos benefícios, um efeito colateral importante nos ossos gnáticos pode ocorrer. A Osteonecrose dos Maxilares Associada aos Bisfosfonatos (OMAB) é definida pela Association of Oral and Maxillifacial Surgeons (AAOMS) como uma área de osso exposto, ou osso que pode ser sondado através de uma fístula intraoral ou extraoral na região maxilo-facial. Está alteração não se cura dentro de oito semanas, após a identificação por um profissional de saúde, em um paciente que estava recebendo ou foi exposto a um bisfosfonato e não recebeu a terapia de radiação na região craniofacial (Ruggiero et al., 2014; Vermeer et al., 2017).

Administração de pequenas doses de bisfosfonatos possuem prevalência baixa no desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares (<0,001%). Entretanto, altas doses intravenosas foram identificadas como um fator de risco em pacientes oncológicos (Reid & Cornish, 2012).

Acredita-se que os ossos gnáticos sejam altamente susceptíveis a esse tipo de osteonecrose devido à sua anatomia e a fatores fisiológicos. Os bisfosfonatos são altamente

concentrados nesses ossos por causa da alta vascularização e renovação óssea. As forças da mastigação e do ligamento periodontal ao redor dos dentes garantem a renovação óssea rápida em torno do periodonto e podem provocar microfraturas no osso acelular e avascular induzido por esta droga. A fina mucosa oral pode ser facilmente traumatizada durante procedimentos cirúrgicos, permitindo que os micro-organismos orais entrem no osso necrótico (Marx, 2003).

A patogênese da OMAB ainda não é bem elucidada, porém parece estar associada a supressão local da renovação óssea maxilar, e a inibição da angiogênese por altas doses de potentes bifosfonatos, complicado por trauma e infecção nos ossos gnáticos (Aghaloo et al., 2015). A presença da osteonecrose já foi relatada em pacientes submetidos à extração dentária ou trauma aos tecidos orais (Filleul et al., 2010; Barba-Recreo et al., 2014; Kolpakova et al., 2016), associada a doença periapical (Kang et al., 2013), a remoção de implantes dentais (Fernández Ayora et al., 2015) ou associada a periodontite (Aghaloo et al., 2011; Li et al., 2016).

Medicações anti-reabsortivas isoladamente não causam necrose óssea. Porém quando combinados com trauma local, inflamação/infecção proveniente de doença periapical ou periodontal estimulam a necrose óssea (Aghaloo et al., 2015).

A periodontite é uma inflamação nos tecidos de suporte dos dentes, caracterizada pelo desequilíbrio entre a microbiota oral e a resposta imune do paciente provocado pelo biofilme (Byrne et al., 2009), resultando em destruição tecidual do osso alveolar e do ligamento periodontal (Ng et al., 2016).

A cascata de destruição periodontal é iniciada pelos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa de bactérias gram-negativas presentes no biofilme (Giannobile, 2008). Monócitos e macrófagos são ativados e passam a liberar citocinas pró-inflamatórias que promovem processos destrutivos (Pussinen et al., 2007). Os osteoclastos por sua vez, liberam enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs), para promover a destruição do tecido ósseo durante a reabsorção (Ra & Parks, 2007).

Devido ao antagonismo dos bisfosfonatos na ação de várias metaloproteinases da matriz participantes da cascata de destruição periodontal, essa classe de droga já foi estudada como um possível adjuvante no tratamento da periodontite (Aghaloo et al., 2011; Akram et al., 2016).

Alencar et al. (2002) avaliaram o efeito profilático e modulador do clodronato em ratos submetidos a periodontite experimental, induzida por fio de sutura de nylon, 7 e 11 dias após a indução da doença. O grupo profilático recebeu a droga e uma hora depois a ligadura, sendo eutanasiados 7 dias depois. Já o terapêutico, recebeu droga por 5 dias antes de receber a

ligadura e, 11 dias depois, foram eutanasiados. Os grupos foram subdivididos de acordo com a dosagem recebida de 1, 5 ou 25 mg/kg. Na mensuração macroscópica, com auxílio de uma lupa 4x, foi observada a redução da perda óssea alveolar tanto no profilático, como no terapêutico, nas 3 dosagens. Mostrando assim, que o clodronato também modula a reabsorção óssea alveolar. Entretanto, a periodontite foi estudada no início do processo inflamatório.

Tani-Ishii et al. (2003) analisaram a ação do incadronato em periodontite induzida em ratos, por inoculação de *Porphyromonas gingivalis*, a fim de prevenir a destruição periodontal. Os animais foram infectados com a bactéria e em seguida receberam o tratamento com incadronato por 2, 4 e 8 semanas. Na histometria e na radiografia digital, os animais apresentaram uma menor perda óssea e uma maior densidade mineral óssea, respectivamente, nos 3 tempos do estudo. Além disso, após 8 semanas de administração, o incadronato evitou a destruição do ligamento periodontal. Sendo então, uma droga importante no controle da perda óssea provocada pela periodontite.

Aghaloo et al (2011) induziram a periodontite com fio de sutura de algodão, para investigar a importância da doença como um provável fator de risco para a osteonecrose, em ratos tratados com o ácido zoledrônico. Os autores observaram uma redução da perda óssea alveolar no grupo tratado com a droga na análise pela microtomografia computadorizada (microCT). A osteonecrose esteve presente no grupo tratado com a droga e no grupo controle, estando em maior proporção no grupo tratado. Mostrando assim, que o bisfosfonato é um fator importante para o desenvolvimento da osteonecrose, porém não decisivo. Entretanto, os autores não avaliaram a progressão da periodontite, pois o estudo foi realizado administrando droga 3 vezes por semana, durante 3 semanas, continuando por mais 12 semanas após a indução da periodontite.

De Almeida et al (2015) avaliaram o uso tópico do alendronato a 1%, como adjuvante no tratamento periodontal básico em ratos com periodontite induzida com fio de sutura de algodão. A ligadura foi mantida por 7 dias e em seguida foi removida e os ratos foram submetidos a raspagem radicular com irrigação de alendronato. A eutanásia ocorreu 7, 15 e 30 dias após a remoção da ligadura. Os animais que receberam o alendronato como adjuvante apresentaram mais osso na região da furca e um aumento no nível de inserção clínica nos três períodos estudados quando comparado com o grupo que só recebeu o tratamento periodontal básico.

A microtomografia computadorizada é um exame não destrutivo que permite a avaliação tridimensional de amostras inteiras, baseado nos mesmo princípios físicos da tomografia computadorizada (Park et al., 2007). Pode ser realizado em várias resoluções, de acordo com

a região de interesse, tendo como vantagem a alta resolução de estruturas menores, uma vez que os cortes são obtidos em microns (Vasquez et al., 2013) (Clark & Badea, 2014). Sendo, assim, uma técnica importante em estudos experimentais do ligamento periodontal e do osso alveolar (Aguirre et al., 2012; Kang et al., 2013).

Apesar do conhecimento sobre os benefícios e efeitos adversos dos bisfosfonatos, a literatura ainda é escassa sobre a avaliação do comportamento do ácido zoledrônico na progressão da periodontite. Dessa forma, o objetivo neste trabalho foi avaliar os efeitos do ácido zoledrônico na progressão da periodontite induzida e na periodontite já instalada em ratos, além de avaliar os efeitos locais da periodontite como um provável fator de risco para desenvolvimento da osteonecrose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo neste trabalho foi avaliar os efeitos do ácido zoledrônico na progressão da periodontite induzida e na periodontite já instalada em ratos, além de avaliar os efeitos locais da periodontite como um provável fator de risco para desenvolvimento da osteonecrose.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar quantitativamente o efeito do ácido zoledrônico na perda óssea alveolar na região da furca e raiz distal dos primeiros molares inferiores esquerdos de ratos;
- Avaliar o processo de progressão da periodontite induzida, por meio do exame histomorfológico da lesão;
- Quantificar o grau da inflamação na região de furca;
- Verificar se a periodontite é um fator predisponente à osteonecrose associada aos bisfosfonatos;
- Averiguar se o uso crônico do ácido zoledrônico tem influência na instalação e na progressão da periodontite;
- Verificar se o uso crônico do ácido zoledrônico tem interferência na periodontite instalada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Bioética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CBEA – UFPE) sob processo nº 23076.019257/2013-80.

3.2 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo do tipo experimental randomizado, onde foram determinados o objetivo do estudo

3.3 Local do estudo

O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Pernambuco. Sendo o estudo experimental realizado no Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE), a microtomografia computadorizada realizada no Laboratório de Tomografia Computadorizada (LTC) do Núcleo em Ensaios Não Destrutivos de Aplicações de Raios X (NENDARX) do Departamento de Energia Nuclear, e o processamento histológico, no Laboratório de Histotécnica do Programa de Pós-Graduação em Patologia.

3.4 Hospedagem dos animais

Foram utilizados 48 animais (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), machos, pesando entre 300 e 350g, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE. Os animais receberam a dieta padrão do biotério (LABINA - Purina do Brasil S/A) e água *ad libitum* e foram mantidos individualmente em gaiolas unitárias, em uma sala com temperatura de $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de claro e escuro de 12:12 horas (claro das 06 às 18 horas e escuro das 18 às 06 horas).

3.5 Grupos de estudo

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 6 grupos experimentais, contendo 8 animais cada, conforme descrito abaixo:

- Zom/Lig30 – Animais expostos ao Ácido Zoledrônico (Zometa, Novartis farmacêutica, Basel, Suíça) por injeção intraperitoneal durante 4 semanas (uma vez por semana), na dose de

0,15mg/Kg. No dia da última dose, a periodontite foi induzida com ligadura de fio de sutura. Após 30 dias da colocação da ligadura, ocorreu a eutanásia dos animais;

- Zom/Lig15 - Animais expostos ao Ácido Zoledrônico por injeção intraperitoneal durante 4 semanas (uma vez por semana), na dose de 0,15mg/Kg. No dia da última dose, a periodontite foi induzida com ligadura de fio de sutura. Após 15 dias da colocação da ligadura, ocorreu a eutanásia dos animais;

- Con/Lig30 - Animais tratados com Solução Salina por injeção intraperitoneal durante 4 semanas (uma vez por semana), na dose de 0,9% do peso do animal. No dia da última dose, a periodontite foi induzida com ligadura de fio de sutura. Após 30 dias da colocação da ligadura, ocorreu a eutanásia dos animais;

- Con/Lig15 - Animais tratados com Solução Salina por injeção intraperitoneal durante 4 semanas (uma vez por semana), na dose de 0,9%. No dia da última dose, a periodontite foi induzida com ligadura de fio de sutura. Após 15 dias da colocação da ligadura, ocorreu a eutanásia dos animais;

- Lig/Zom – Indução da periodontite com ligadura de fio de sutura por 15 dias, seguido expostos ao ácido zoledrônico, por injeção intraperitoneal, durante 8 semanas (uma vez por semana), na dose de 0,15mg/Kg. A eutanásia ocorreu 1 semana após a última aplicação da droga;

- Lig/Con - Indução da periodontite com ligadura de fio de sutura por 15 dias, seguido da administração de solução salina, por injeção intraperitoneal, durante 8 semanas (uma vez por semana), na dose de 0,9%. A eutanásia ocorreu 1 semana após a última aplicação da droga.

3.6 Indução da Periodontite com ligadura de algodão

Para indução da periodontite, os animais receberam atropina para controle do fluxo salivar e posteriormente, foram anestesiados com cloridrato de cetamina 1ml/Kg (SESP, Divisão Vetbrands Saúde Animal, Jacareí, São Paulo, Brasil) associado a xilazina 0,5 mlKg (Bayer do Brasil, Beford Roxo, Rio de Janeiro, Brasil), por via intramuscular. Quando confirmada a ausência da sensibilidade dolorosa, o animal foi posicionado no aparato de Doku modificado (Doku et al., 1966) e o primeiro molar inferior esquerdo sutilmente luxado com auxílio de uma agulha de calibre 40/12. A ligadura de fio de sutura de algodão 4.0 (Ethicon, Nova Jersey, EUA) foi colocada com o auxílio de duas pinças hemostáticas (Golgran, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil). O fio de sutura foi inserido no sulco

gingival com auxílio de um esculpido de holleback 3S (Golgran, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil) e mantido até o sacrifício. Após o procedimento, os animais foram mantidos sozinhos em gaiolas individuais para evitar estresse excessivo, sem restrição de ração e água.

3.7 Preparação dos espécimes

Após o período de estudo, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica com pentobarbital (Hypnol, Cristália, São Paulo, Brasil) por via intramuscular. As hemi-mandíbulas esquerdas foram desarticuladas da maxila e dissecadas. Em seguida, os espécimes foram imersos em recipientes contendo solução de formol tamponado a 5% por 72 horas para fixação, coberto com filme plástico para evitar a desidratação e mantidos em temperatura ambiente.

3.8 Análise por microtomografia computadorizada (microCT)

a. *Posicionamento da amostra*

O transporte da peça para o microtomógrafo foi realizado cuidadosamente com auxílio de uma pinça clínica odontológica, a fim de evitar danos ao material. O excesso de formol foi removido com papel toalha e a hemi-mandíbula esquerda foi aprisionada no incisivo por uma pinça apropriada do microtomógrafo, de forma que o longo eixo da hemi-mandíbula permanecesse perpendicular ao solo, para que toda mandíbula fosse captada pelo receptor (Figura 2).

Figura 2. Posicionamento da amostra no microtomógrafo



b. Parâmetros para aquisição das imagens

A hemi-mandíbula esquerda foi escaneada por um microtomógrafo de 3ª geração NIKON XT-H 225 ST (Geldenaaksebaan, Leuven, Bélgica) (Figura 3) no Laboratório de Tomografia Computadorizada (LTC) do Núcleo em Ensaios Não Destrutivos de Aplicações de Raios X (NENDARX) do Departamento de Energia Nuclear da UFPE, operando em 80 kV e 222 μ A, sem filtro e 500ms, utilizando protocolo com tamanho de voxel de 11 microns (μ) e tempo de exposição de 25 minutos.

c. Reconstrução das imagens

As imagens foram reconstruídas utilizando o software CT PRO 3D versão XT3.1.3 NIKON (Geldenaaksebaan, Leuven, Bélgica), na extensão .xteck, onde foi delimitado o volume de interesse. A área de estudo foi delimitada e em seguida, as reconstruções multiplanares (axial, sagital e coronal) do volume selecionado foram exportadas na extensão DICOM pelo software VGStudioMax 2.2 (Volume Graphics GmbH, Heidelberg, Alemanha).

Figura 3. Microtomógrafo NIKON XT-H 225 ST acoplado a um computador de comando.



d. Avaliação da perda óssea

Reconstruções de 11 μ em DICOM foram avaliadas no ImageJ (*National Institutes of Health*, EUA) por um examinador calibrado, utilizando um monitor de tela plana de 15" (CCE, Manaus, Amazonas, Brasil).

Para delimitar a região a ser analisada, foi utilizado o corte axial na região central do dente e o corte sagital foi rotacionado, usando ferramentas do software, até que as raízes se encontrassem perpendiculares ao solo (Figura 4). No corte coronal, foram realizadas as mensurações, onde duas linhas horizontais foram traçadas: uma na altura da junção amelocementária e outra na parte mais alta da crista óssea alveolar da raiz distal, por vestibular e lingual (Figura 5). A distância vertical entre as duas linhas horizontais foi capturada em pixel. A perda óssea da região da furca também foi quantificada realizando medições da dentina da furca até o osso alveolar da região, em toda a extensão do dente.

Todos os cortes referentes ao primeiro molar foram analisados e medidos no eixo coronal, mantendo a posição central obtida no corte axial.

Os dados foram tabulados no software Microsoft Office Excel 2013, onde foram obtidas as médias de reabsorção da furca, de cada face (vestibular e lingual) da raiz distal e a média geral de reabsorção da raiz distal.

3.9 Processamento histológico

As hemi-mandíbulas esquerdas foram descalcificadas em EDTA a 5% durante 30 dias. Após a descalcificação, as hemi-mandíbulas foram seccionadas no centro dos molares, da mesial para a distal, processadas convencionalmente para parafina, com a região central da mandíbula para baixo. Foram realizados cortes seriados de 5 μ m de espessura, utilizando um Micrótomo ECLYPSE 51 (NIKON, Tokyo, Japão), corados em hematoxilina-eosina.

Figura 4. Posicionamento do dente com as raízes perpendiculares ao solo. Corte axial (A), corte sagital (B) e corte coronal (C).

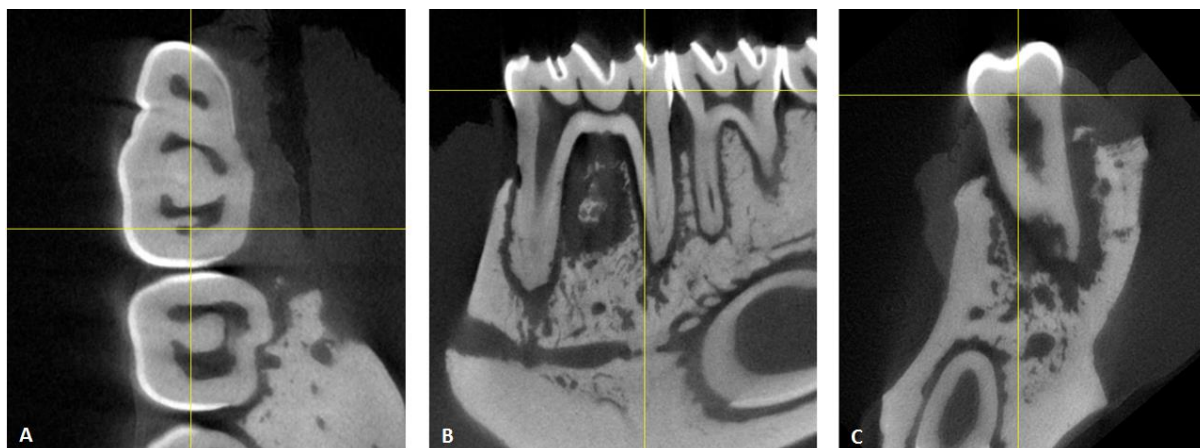
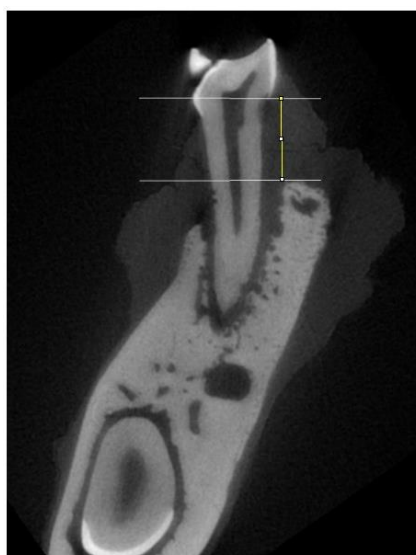


Figura 5. Mensuração no corte coronal. Linhas de referência horizontais (brancas). Distância vertical entre as linhas de referência da face vestibular da raiz (amarela).



3.10 Análise histológica

Na análise histológica, foi possível verificar a intensidade da reação inflamatória e a presença da osteonecrose. A intensidade da reação inflamatória foi avaliada na região de furca, onde foram atribuídos scores de acordo com o grau da inflamação: 1 – ausente; 2 – leve; 3 – moderada e 4 - intensa. Foi considerada inflamação leve quando poucas células inflamatórias estavam presentes, distribuídas focal ou difusamente; moderada quando havia presença de uma reação inflamatória focal, e intensa quando a região avaliada apresentava uma grande quantidade de células inflamatórias distribuídas de forma difusa (Castro, Koss,

López, 2014). A presença da osteonecrose foi considerada quando osso apresentou perda de mais de cinco osteócitos contíguos com áreas confluentes de lacunas vazias.

3.11 Análise histomorfométrica

Dezesseis lâminas de cada grupo, sendo duas pertencentes a cada animal, foram escaneadas pelo Panoramic MIDI (3DHISTECH Ltda, Budapeste, Hungria), para quantificar a área de reabsorção óssea alveolar. Cada lâmina possuía quatro cortes seriados, que foram analisadas utilizando o aumento de 2x.

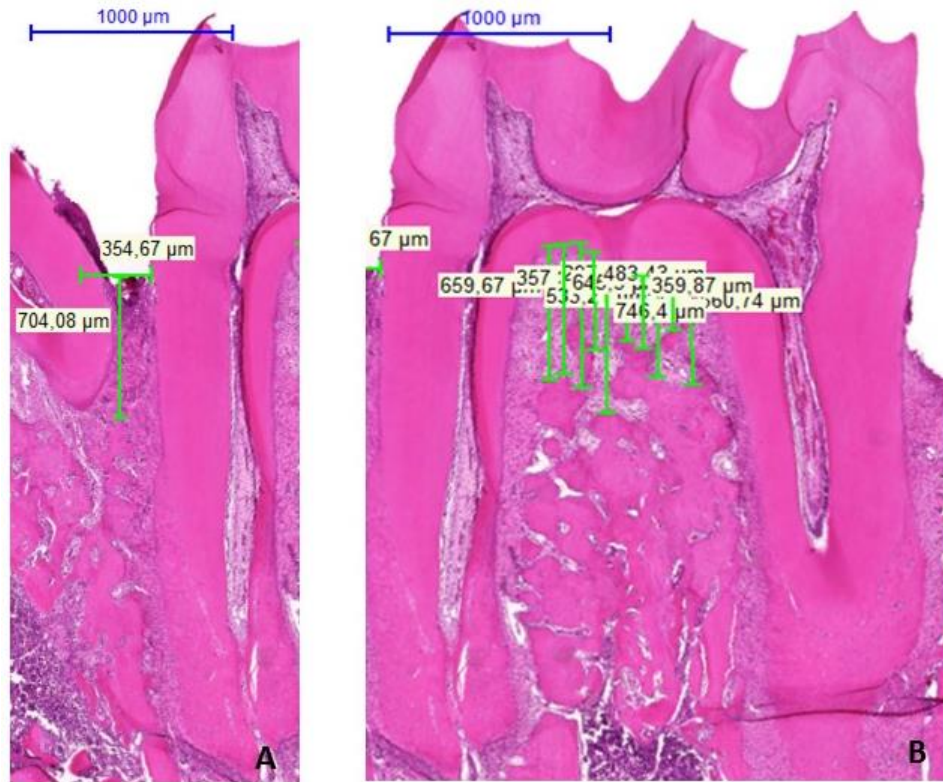
Utilizando o software Pannoramic Viewer (3DHISTECH Ltda, Budapeste, Hungria), as imagens foram rotacionadas a fim de deixar a raiz distal e a furca perpendiculares ao solo no momento em que cada uma estava sendo mensurada. Para medição da raiz distal, uma linha horizontal foi traçada na altura da junção amelocementária e, a distância existente entre a linha horizontal e a crista óssea alveolar foi mensurada (Figura 6). Toda a extensão da furca foi mensurada verticalmente, tendo como base a dentina da furca e a crista óssea alveolar da mesma região (Figura 6).

Os dados foram tabulados no software Microsoft Office Excel 2013 e submetidos a análise estatística.

3.12 Análise estatística

Os dados obtidos nas avaliações foram tabulados no programa Microsoft Office Excel 2013, importados para o software SPSS 13.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows e submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, apresentando um valor de $p < 0,05$. Foi realizada a análise estatística analítica utilizando o Teste t Student (Distribuição Normal) para análise da microtomografia e Mann-Whitney (Não Normal) para a análise histomorfométrica. Os valores foram expressos como média e desvio-padrão, considerando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Figura 6. Histomorfometria. Linha horizontal de orientação e medição vertical da reabsorção óssea na raiz distal raiz distal (A). Medição vertical de toda extensão da furca (B). Aumento de 2x.



5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EM RATOS: ANÁLISE HISTOLÓGICA E MICROTOMOGRÁFICA

Priscylla Gonçalves Correia Leite de Marcelos¹

¹Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, Recife, Pernambuco, Brasil

INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BFs) são drogas análogas sintéticas do pirofosfato, onde o carbono substitui o oxigênio central na molécula (Conte N Neto et al., 2013), conferindo resistência à hidrólise, resistência à degradação e capacidade de se ligar aos íons metálicos bivalentes, tais como o do cálcio (Roelofs et al., 2006). Por esta razão, o fármaco é rapidamente eliminado da circulação e aderido às superfícies minerais do osso nos locais de remodelação óssea ativa, zonas submetidas à reabsorção osteoclástica (Izquierdo et al., 2011).

Apesar do efeito benéfico anti-reabsortivo, os ossos gnáticos podem ser acometidos com um efeito adverso potencialmente grave após administração prolongada de bisfosfonatos nitrogenado (Kos, 2014), onde a supressão excessiva do turnover ósseo, a redução da capacidade de remodelação e de reparar danos, pode levar ao acúmulo de micro-danos, causando osteonecrose dos maxilares associada aos bisfosfonatos (OMAB) (Hoefert et al., 2010; Vermeer et al., 2017).

A OMAB trata-se de uma área de osso exposto, ou osso que pode ser sondado através de uma fístula intraoral ou extraoral na região maxilo-facial que não se cura dentro de oito semanas após a identificação por um prestador de cuidados de saúde, em um paciente que estava recebendo ou foi exposto a um bisfosfonato e não recebeu a terapia de radiação para a região craniofacial (Ruggiero et al, 2014).

A OMAB foi evidenciada após extração dentária ou trauma aos tecidos orais (Filleul et al, 2010; Barba-Recreo et al., 2014; Kolpakova et al., 2016), após remoção de implantes dentais (Fernández Ayora et al., 2015), associada a doença periapical (Kang et al., 2013) e a periodontite (Aghaloo et al., 2011; Li et al., 2016).

A periodontite é uma doença inflamatória frequente, provocada pelo acúmulo de biofilme, que propicia o início da destruição do osso alveolar e do ligamento periodontal (Ng et al., 2016). Nela, enzimas proteolíticas são liberadas pelos osteoclastos, como as metaloproteinases de matriz (MMPs), para promover a destruição tecidual durante a reabsorção óssea (Ra e Parks, 2007).

Além das MMPs, outros fatores causais importantes no processo inflamatório estão envolvidos na perda óssea alveolar na periodontite, como os lipopolissacarídeos (LPS), as Prostaglandina E2 (PGE2), Interleucina 1 β (IL-1 β) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α) (Shinoda et al., 2008)

A cascata de destruição periodontal é iniciada pelos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa de bactérias gram-negativas presentes no biofilme (Giannobile, 2008). Monócitos e macrófagos são ativados e passam a liberar citocinas pró-inflamatórias que promovem processos destrutivos (Pussinen et al., 2007). Os osteoclastos por sua vez, liberam enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases de matriz (MMPs), que induzem a destruição do tecido ósseo durante a reabsorção (Ra e Parks, 2007).

Estudos anteriores foram realizados com alendronato, por atuar antagonizando a ação de fatores importantes na inflamação, como um possível adjuvante ao tratamento periodontal básico em periodontite induzida em ratos (De Almeida et al., 2015; Akram et al., 2016), para tratar topicamente defeitos intra-ósseos provocados por periodontite crônica (Kanoriya et al., 2016) e com a finalidade de evitar a perda óssea ao redor do implante, melhorando a osteointegração (Duarte et al., 2005). Entretanto, pouco se conhece a respeito da progressão da periodontite na presença do ácido zoledrônico.

Portanto, o objetivo neste trabalho foi avaliar, *in vivo*, os efeitos do ácido zoledrônico na progressão da periodontite em ratos, além de avaliar os efeitos locais da periodontite como um provável fator de risco para desenvolvimento da osteonecrose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Após aprovação pelo Comitê de Bioética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CBEA – UFPE) sob processo nº 23076.019257/2013-80, o estudo experimental foi realizado no Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE) da Universidade Federal de Pernambuco.

Grupos de estudo

Foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), pesando entre 300 e 350g, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, que receberam a dieta padrão do biotério (LABINA - Purina do Brasil S/A) e água *ad libitum*, hospedados individualmente em gaiolas unitárias. Os quais foram mantidos em sala com temperatura de $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de claro e escuro de 12:12 horas (claro das 06 às 18 horas e escuro das 18 às 06 horas).

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 6 grupos experimentais, cada um contendo 8 animais:

- Zom/Lig30 - Animais tratados com Ácido Zoledrônico (Zometa, Novartis farmacêutica, Basel, Suíça) por injeção intraperitoneal durante 4 semanas (uma vez por semana), na dose de 0,15mg/Kg. No dia da última dose, a lesão periodontal foi induzida com ligadura de fio de sutura. Após 30 dias da colocação da ligadura, ocorreu a eutanásia dos animais;

- Zom/Lig15 - Animais tratados com Ácido Zoledrônico por injeção intraperitoneal durante 4 semanas (uma vez por semana), na dose de 0,15mg/Kg. No dia da última dose, a lesão periodontal foi induzida com ligadura de fio de sutura. Após 15 dias da colocação da ligadura, ocorreu a eutanásia dos animais;

- Con/Lig30 - Animais tratados com Solução Salina por injeção intraperitoneal durante 4 semanas (uma vez por semana), na dose de 0,9% do peso do animal. No dia da última dose, a lesão periodontal foi induzida com ligadura de fio de sutura. Após 30 dias da colocação da ligadura, ocorreu a eutanásia dos animais;

- Con/Lig15 - Animais tratados Solução Salina por injeção intraperitoneal durante 4 semanas (uma vez por semana), na dose de 0,9%. No dia da última dose, a lesão periodontal foi induzida com ligadura de fio de sutura. Após 15 dias da colocação da ligadura, ocorreu a eutanásia dos animais;

- Lig/Zom – Indução da lesão periodontal com ligadura de fio de sutura por 15 dias. Após o tempo determinado, foi iniciada a administração do zometa por injeção intraperitoneal durante 8 semanas (uma vez por semana), na dose de 0,15mg/Kg. A eutanásia ocorreu 1 semana após a última aplicação da droga;

- Lig/Con - Indução da lesão periodontal com ligadura de fio de sutura por 15 dias. Após o tempo determinado, foi iniciada a de solução salina por injeção intraperitoneal durante 8

semanas (uma vez por semana), na dose de 0,9%. A eutanásia ocorreu 1 semana após a última aplicação da droga.

Indução da periodontite

Os animais receberam atropina para controle do fluxo salivar e posteriormente, foram anestesiados com cloridrato de cetamina 1ml/Kg (SESP, Divisão Vetbrands Saúde Animal, Jacareí, São Paulo, Brasil) associado a xilazina 0,5 mlKg (Bayer do Brasil, Beford Roxo, Rio de Janeiro, Brasil), por via intramuscular. Quando confirmada a ausência da sensibilidade dolorosa, o animal foi posicionado no aparato de Doku modificado (Doku et al., 1966) e o primeiro molar inferior esquerdo sutilmente luxado com auxílio de uma agulha de calibre 40/12. A ligadura de fio de sutura de algodão 4.0 (Ethicon, Nova Jersey, EUA) foi colocada com o auxílio de duas pinças hemostáticas e mantida até o dia do sacrifício. O fio de sutura foi inserido no sulco gengival com auxílio de um esculpador de hollembach 3S (São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil). Após o procedimento, os animais foram mantidos sozinhos em gaiolas individuais para evitar estresse excessivo, sem restrição de ração e água.

Preparação dos espécimes

Após o período de estudo, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica com pentobarbital (Hypnol, Cristália, São Paulo, Brasil) por via intramuscular. A hemi-mandíbula esquerda foi desarticulada da maxila, dissecada e imersa em recipientes contendo solução de formol tamponado a 5% por 72 horas para fixação.

Análise por microtomografia computadorizada (microCT)

a. Escaneamento da amostra

A hemi-mandíbula esquerda foi aprisionada no incisivo por uma pinça apropriada do microtomógrafo, de forma que o longo eixo do incisivo central permanecesse perpendicular ao solo. Em seguida, foram escaneadas por um microtomógrafo de 3ª geração NIKON XT-H 225 ST (Geldenaaksebaan, Leuven, Bélgica), operando em 80 kV e 222 μ A sem filtro e 500ms, utilizando protocolo com tamanho de voxel de 11 microns (μ) e tempo de exposição de 25 minutos.

c. Reconstrução das imagens

As imagens foram reconstruídas utilizando o software CT PRO 3D versão XT3.1.3 NIKON (Geldenaaksebaan, Leuven, Bélgica), na extensão .xteck, onde foi delimitado o volume de interesse. A área de interesse foi delimitada e em seguida, as reconstruções multiplanares (axial, sagital e coronal) do volume selecionado foram exportadas na extensão DICOM pelo software VGStudioMax 2.2 (Volume Graphics GmbH, Heidelberg, Alemanha).

Reconstruções de 11 μ em DICOM foram avaliadas no ImageJ (*National Institutes of Health*, EUA) por um examinador calibrado, utilizando um monitor de tela plana de 15" (CCE, Manaus, Amazonas, Brasil).

d. Avaliação da perda óssea

As imagens reconstruídas foram analisadas no software ImageJ. Para encontrar a região a ser analisada, o corte axial marcou a região central do dente e o corte sagital foi rotacionado afim de manter as raízes perpendiculares ao solo. As medições foram realizadas no corte coronal, onde duas linhas horizontais foram traçadas: uma na altura da junção amelocementária e outra na parte mais alta da crista óssea alveolar da raiz distal, por vestibular e lingual. A distância vertical entre as duas linhas horizontais foi capturada em pixel. A perda óssea da região da furca também foi analisada realizando medições verticais da dentina da furca até ao osso alveolar da região (Figura 1A, 1B, 1C). Todos os cortes referentes ao primeiro molar foram analisados e medidos no eixo coronal, mantendo a posição central obtida no corte axial (Figura 1D). Áreas de osso necrótico não foram incluídas na mensuração da perda óssea alveolar.

Os dados foram tabulados no software Microsoft Office Excel 2013, onde foram obtidas as médias de reabsorção da furca, de cada face (vestibular e lingual) da raiz distal e a média geral de reabsorção da raiz distal.

Processamento histológico

As hemi-mandíbulas esquerdas foram descalcificadas em EDTA a 5% durante 30 dias. Após a descalcificação, as hemi-mandíbulas foram seccionadas no centro dos molares, da mesial para a distal, processadas convencionalmente para parafina, com a região central da mandíbula para baixo. Foram realizados cortes seriados de 5 μ m de espessura, utilizando um Micrótomo ECLYPSE 51 (NIKON, Tokyo, Japão), corados em hematoxilina-eosina.

Análise histológica

Com a análise histológica foi possível verificar a intensidade da reação inflamatória e a presença da osteonecrose. A intensidade da reação inflamatória foi avaliada na região de furca e atribuída scores de acordo com o grau da inflamação: 1 – ausente; 2 – leve; 3 – moderada e 4 – intensa. Foi considerada inflamação leve quando poucas células inflamatórias estavam presentes, distribuídas focal ou difusamente; moderada quando havia presença de uma reação inflamatória focal, e intensa quando a região avaliada apresentava uma grande quantidade de células inflamatórias distribuídas de forma difusa (Castro, Koss, López, 2014). A presença da osteonecrose foi considerada quando osso apresentou perda de mais de cinco osteócitos contíguos com áreas confluentes de lacunas vazias.

Análise histomorfométrica

Dezesseis lâminas de cada grupo, sendo duas pertencentes a cada animal foram escaneadas pelo Panoramic MIDI (3DHISTECH Ltda, Budapest, Hungria), para quantificar a área de reabsorção óssea alveolar. Cada lâmina possuía quatro cortes seriados, que foram analisadas utilizando o aumento de 2x.

Para quantificar a área de reabsorção alveolar, as lâminas foram escaneadas pelo Panoramic MIDI (3DHISTECH Ltda, Budapest, Hungria). Utilizando o software Pannoramic Viewer (3DHISTECH Ltda, Budapest, Hungria), as imagens foram rotacionadas afim de deixar a raiz distal e a furca perpendiculares ao solo. Para medição da raiz distal, uma linha horizontal foi traçada na altura da junção amelocementária e a distância existente entre a linha horizontal e a crista óssea alveolar foi mensurada. Toda a extensão da região de furca foi mensurada verticalmente, tendo como base a dentina da furca e a crista óssea alveolar viável da mesma região. Áreas de osso necrótico não foram incluídas na mensuração da perda óssea alveolar.

Análise estatística

Os dados obtidos nas avaliações foram tabulados no programa Microsoft Office Excel 2013, importados para o software SPSS 13.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows e submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, apresentando um valor de $p < 0,05$. Foi realizada a análise estatística analítica utilizando o Teste t Student para análise da microtomografia e da inflamação, e Mann-Whitney para a análise

histométrica. Os valores foram expressos como média e desvio-padrão, considerando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Medições lineares na Micro-CT

Quando o ácido zoledrônico foi administrado previamente à indução da doença periodontal, não houve diferença significativa com relação à reabsorção óssea, independente do tempo de evolução da doença ($p > 0,05$) (Tabela 1A e 1B). No entanto, quando a droga foi administrada em animais com a doença já instalada, foi observada menor reabsorção óssea alveolar associada à raiz distal ($p < 0,01$) (Tabela 1C).

Histometria

A análise histométrica confirma os achados da micro-CT, com relação a diminuição da reabsorção óssea alveolar na raiz distal dos animais com a doença periodontal já instalada ($p = 0,001$). A mesma tendência de reabsorção óssea foi observada na região de furca ($p < 0,001$) (Tabela 2C).

Houve também diminuição da reabsorção óssea na raiz distal quando os animais desenvolveram a doença após o uso da droga ($p < 0,001$) (Tabela 2B). No entanto, quando a indução da doença se prolonga até 30 dias, o efeito da droga foi inverso, ou seja, aumentou a reabsorção óssea em todos os sítios estudados ($p < 0,005$) (Tabela 2A).

Histologia

Quando o ácido zoledrônico foi administrado previamente à indução da doença periodontal, houve um grau de inflamação da furca moderado nos animais tratados com a droga e leve nos tratados com soro, no início da doença periodontal induzida (15 dias) ($p = 0,018$) (Tabela 3B). No entanto, nos animais com 30 dias de doença periodontal e tratamento prévio, o grau de inflamação foi moderado no grupo tratado e o no controle ($p = 0,733$) (Tabela 3A).

Quando a indução da doença periodontal ocorreu previamente ao tratamento, o grau de inflamação foi leve para o grupo tratado e para o controle ($p = 0,0853$) (Tabela 3C).

A osteonecrose esteve presente nos grupos tratados que receberam o ácido zoledrônico previamente à indução da doença periodontal, independentemente do tempo de tratamento,

sendo 3 animais no grupo Zom/Lig30 e 1 no grupo Zom/Lig15. Entretanto, grupos controles apresentaram o padrão de 5 osteócitos contíguos vazios, sendo eles o Con/Lig30 e o Lig/Con, apresentando cada um apenas um animal com osteonecrose.

DISCUSSÃO

O processo inflamatório na doença periodontal ocorre devido às alterações na composição da microbiota do biofilme na cavidade oral e na resposta imune do hospedeiro, iniciando assim, o processo destrutivo do ligamento periodontal e reabsorção do osso alveolar através de células clásticas (Byrne et al., 2009; Bale et al., 2016). O modelo experimental de indução de doença periodontal com ligadura de algodão favorece o acúmulo de biofilme, induzindo um processo inflamatório local dependente não só da placa, como também da resposta imune do hospedeiro¹⁹ (De Almeida et al., 2015).

Modelos experimentais foram utilizados para explicar a osteonecrose nos maxilares induzida por bisfosfonatos, sendo possível observar que esse efeito colateral ocorre na presença de trauma na cavidade oral e infecção, como cirurgias orais ou patologias, doença periodontal e periapical induzida (Aghaloo et al., 2011; Yamamoto-Silva et al., 2013; Kang et al., 2013; Silva et al., 2015; Kolpakova et al., 2016). De forma semelhante ao reportado na literatura, neste estudo foi utilizado um modelo experimental em ratos para avaliar o comportamento do ácido zoledrônico na progressão da doença periodontal.

A administração do ácido zoledrônico previamente à indução da doença periodontal diminuiu a reabsorção óssea alveolar nos animais com doença recentemente estabelecida (Zom/Lig15). Nesse momento, o grau de inflamação da doença periodontal variou de moderada no grupo tratado a leve no grupo controle. O mesmo ocorreu quando os animais começaram a receber a droga após a doença periodontal já está instalada (Lig/Zom). Porém, nesse período do estudo, o grau de inflamação se apresentou leve no grupo tratado e controle.

A menor reabsorção óssea encontrada nesses grupos ocorreu provavelmente devido ao poder anti-reabsortivo da droga, modulando a ação osteoclástica e osteoblástica (Li et al., 2016). Ações dentro dessas células, como a inibição da enzima farnesil-difosfato-sintase na via de síntese do colesterol, inibem consequentemente o recrutamento de osteoclastos maduros e a diferenciação de osteoclastos imaturos (McClung, 2015). Isso resulta na perda da capacidade reabsortiva dos osteoclastos ou até mesmo na antecipação da apoptose (Dannemann et al., 2006).

Pequenas quantidades desta droga também são absorvidas por células semelhantes, como: macrófagos, osteoblastos e condroblastos (Roelofs et al., 2010). Viereck et al (2002) forneceram evidências de que o ácido zoledrônio e pamidronato atuam também sobre os osteoblastos aumentando a secreção de osteoprotegerina (OPG), um membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral. Uma vez que a produção de OPG está aumentada devido ao efeito da droga, efeitos estimuladores ocorrem sobre a diferenciação dos osteoblastos, inibindo também a reabsorção óssea.

Apesar da ação anti-reabsortiva, este estudo mostrou que a droga não interferiu nas células inflamatórias. Isso porque o grau da inflamação provocada pela periodontite progrediu com o tempo, sem interferência da droga, nos sítios em que estava ocorrendo o acúmulo de biofilme, quando a droga foi administrada previamente a indução da doença periodontal. Da mesma forma, a ausência de interferência ocorreu quando a droga foi administrada após a doença periodontal já estar instalada.

Achados semelhantes ao grau da inflamação foram relatados por De Almeida et al. (2015) em um modelo de periodontite induzida, semelhante ao utilizado pelo presente trabalho, onde foi avaliada a ação do alendronato como adjuvante ao tratamento periodontal básico em periodontite induzida em ratos. Essa investigação relatou que tanto no grupo que recebeu o alendronato topicamente associado à raspagem radicular, quanto no grupo controle, o infiltrado inflamatório foi intenso em todo tecido conjuntivo da furca; com 15 dias ainda existia infiltrado inflamatório, porém em menor volume; e, com 30 dias poucas células inflamatórias permeavam o tecido conjuntivo. Entretanto, os autores destacaram que o grupo sob a ação do alendronato apresentou sinais de menor reabsorção óssea com o progredir do tempo.

A maior reabsorção óssea apresentada nos grupos controles são semelhantes aos achados de Aghaloo et al. (2011). Assim como, o modelo de estudo e a concentração da droga utilizados neste estudo. Entretanto, o tempo de administração da droga foi prolongado por 15 semanas e da indução da doença periodontal permaneceu por mais tempo, 12 semanas, não avaliando a doença periodontal em outro tempo. Os autores encontraram maior reabsorção no osso alveolar da distal do 1º molar, no grupo controle. Além disso, apontaram a presença de osteonecrose com formação de sequestros ósseos na região onde recebeu a ligadura.

Do mesmo modo, Kang et al. (2013), ao desenvolver um modelo de osteonecrose induzido por doença periapical, em animais tratados com altas doses de zometa por oito

semanas, obtiveram menor reabsorção na região óssea periapical dos animais que receberam zometa, nas análises microtomográfica e histológica.

Os resultados também foram semelhantes aos relatados por Moreira et al. (2014), entretanto, usando alendronato de sódio na progressão da periodontite experimental em ratos. Os animais tratados com o alendronato tiveram raros sinais de reabsorção após 14 dias de indução de doença periodontal e tratamento com a droga. Além disso, o processo inflamatório não foi inibido com a administração da droga, sendo observado maior contaminação bacteriana e presença de osteonecrose com exposição óssea com 21 dias de uso da ligadura.

Contudo, o resultado do presente estudo foi oposto quando a droga foi administrada previamente à indução da doença periodontal e progrediu por 30 dias (Zom/Lig30.) O grupo tratado com a droga teve uma maior reabsorção em todos os sítios estudados. Este resultado ocorreu provavelmente porque a osteonecrose esteve presente em mais animais do grupo Zom/Lig30 e uma maior reabsorção esteve presente na furca do grupo Con/Lig3. Além disso, a área de osso necrótico não foi mensurado na histometria e não foi visto no corte coronal da microtomografia, diminuindo a diferença estatística entre os grupos e divergindo o resultado nas duas análises.

Apesar da menor reabsorção, os grupos tratados previamente à indução da periodontite (Zom/Lig30 e Zom/Lig15) apresentaram porções ósseas separadas do rebordo alveolar com borda irregular na região da furca sugerindo sequestro ósseo nas imagens da microtomografia. A análise histológica confirmou a necrose na furca dos dois grupos. Achados imaginológicos como sequestro, formação óssea periosteal e expansão da crista alveolar são comuns em pacientes com osteonecrose dos maxilares associados a bisfosfonatos (Bedogni et al., 2008). Acredita-se que a fisiopatologia da osteonecrose esteja ligada a inibição de remodelação óssea por apoptose dos osteoclastos, presença de inflamação ou de infecção, inibição da angiogênese, toxicidade do tecido mole e a disfunção de imunidade nata ou adquirida (Aghaloo et al., 2015), situações presentes na doença periodontal.

Aghaloo et al. (2011) relataram a presença da osteonecrose nos animais tratados com o zometa. Radiograficamente, animais tratados com zometa e com veículo apresentaram osteonecrose, que foi caracterizada por fragmentos de bordas irregulares destacados do resto do alvéolo circundante, caracterizando a formação de sequestro ósseo. Esse achado foi confirmado na histologia, sendo a área de osteonecrose considerada como região de 5

osteócitos vazios contíguos. No grupo tratado, a osteonecrose foi associada aos bisfosfonatos e a do grupo controle, considerada infecção-induzida.

Bonnet et al. (2013), no entanto, estudando ratos com periodontite induzida pela deficiência de periostina, usaram doses de zometa para tratamento de câncer metastático e não detectaram osteonecrose ao exame histológico. Ao exame clínico, os autores encontraram a presença de infiltrado inflamatório no periodonto dos grupos tratado e controle característico da inflamação periodontal. O zometa diminuiu o número de osteócito, porém o osso alveolar não apresentou a característica de cinco osteoplastos adjacentes. Os resultados divergentes podem acontecer devido à variação dos modelos experimentais utilizados para investigar osteonecrose e doença periodontal (Li et al., 2016).

A osteonecrose dos animais dos grupos controle (Con/Lig30 e Lig/Com) pode ter acontecido devido a desnudação óssea da região provocada pelo trauma da ligadura e consequentemente morte celular dos osteócitos. Yamashita e colaboradores³⁸ (2011), estudando reparo de feridas ósseas no palato de animais tratados com ácido zoledrônico apontaram que pode ocorrer necrose nos animais tratados com zometa e com veículo, sendo a necrose no grupo controle considerada induzida pelo trauma na presença de infecção, comprometendo a vascularização tecidual.

No presente trabalho, o ácido zoledrônico modulou a intensidade da reabsorção óssea da doença periodontal induzida em ratos. Entretanto, no grupo em que a osteonecrose dos maxilares associada aos bisfosfonatos esteve presente, a reabsorção óssea foi mais expressiva. As características histológicas e os achados da microtomografia computadorizada do presente estudo confirmam que a associação de reabsorção óssea, contaminação bacteriana e inflamação favoreceu os sinais de osteonecrose. Dado que o ácido zoledrônico é largamente utilizado em doenças com destruição da microestrutura óssea e que a doença periodontal é frequente na clínica odontológica, como citado anteriormente, o profissional de saúde deve prestar atenção ao risco do desenvolvimento da osteonecrose.

Portanto, pode-se concluir que o ácido zoledrônico diminui a reabsorção óssea alveolar em periodontite induzida em ratos tratados com a droga a longo prazo, entretanto o grau de inflamação independe do tempo em que a doença periodontal está presente. Além disso, o ácido zoledrônico apresenta-se como fator de risco para o desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares associados a bisfosfonatos na presença de trauma tecidual e infecção.

AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Laboratório de Tomografia Computadorizada (LTC) do Núcleo em Ensaios Não Destrutivos de Aplicações de Raios X (NENDARX) do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

- 1- Conte N Neto, Spolidorio LC, Andrade CR, Esteves JC, Marcantonio E Jr. Experimental osteonecrosis: development of a model in rodents administered alendronate. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):e99.
- 2 - Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res.* 2006;12(20 Pt 2):6222s-6230s.
- 3 - Izquierdo CM, Oliveira MG, Weber JBB. Terapêutica com bisfosfonatos: implicações no paciente odontológico – revisão de literatura. *RFO.* 2011;16(3):347-352.
- 4 - Kos M. Association of dental and periodontal status with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. A retrospective case controlled study. *Arch Med Sci.* 2014;10(1):117-23.
- 5 - Hoefert S, Schmitz I, Tannapfel A, Eufinger H. Importance of microcracks in etiology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a possible pathogenetic model of symptomatic and non-symptomatic osteonecrosis of the jaw based on scanning electron microscopy findings. *Clin Oral Investig.* 2010;14(3):271-84.
- 6 - Vermeer J, Renders G, van Duin MA, Jansen I, Bakker LF, Kroon SA, de Vries TJ, Everts V. Bone-site-specific responses to zoledronic acid. *Oral Dis.* 2017;23(1):126-133.
- 7 - Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw-2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72:1938.
- 8 - Filleul O, Crompton E, Saussez S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010; 136: 1117–1124.

- 9 - Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid e Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014; 42(6):744-50.
- 10 - Kolpakova ME, Zubareva AA, Artamonova TD, Lisovskaya EK, Chefu SG, Yagmurov OD, Yaremenko AI, Vlasov TD. Experimental model of osteonecrosis of the jaw in rats treated with zoledronic acid. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2016;22.
- 11 - Fernández Ayora A, Herion F, Rompen E, Reginster JY, Magremanne M, Lambert F. Dramatic Osteonecrosis of the jaw associated with oral bisphosphonates, periodontitis, and dental implant removal. *J Clin Periodontol*. 2015;42(2):190-5.
- 12 - Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Atti E, Dry SM, Pirih FQ, Aghaloo TL, Tetradis S. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res*. 2013;28(7):1631-40.
- 13 - Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, Bezouglaia O, Dry SM, Tetradis S. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res*. 2011;26(8):1871-82.
- 14 – Ng HM, Kin LX, Dashper SG, Slakeski N, Butler CA, Reynolds EC. Bacterial interactions in pathogenic subgingival plaque. *Microb Pathog*. 2016;94:60-9.
- 15 - Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol*. 2007;26:587–596.
- 16 - Shinoda H, Takeyama S, Suzuki K, Murakami S, Yamada S. Pharmacological topics of bone metabolism: a novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis. *J Pharmacol Sci*. 2008;106(4):555-8.
- 17 - Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol*. 2008;79(8 Suppl):1592-600.
- 18 - Pussinen PJ, Paju S, Mantyla P, Sorsa T. Serum microbial- and host-derived markers of periodontal diseases: A review. *Curr Med Chem*. 2007;14:2402–2412.
- 19 - De Almeida J, Ervolino E, Bonfietti LH, Novaes VC, Theodoro LH, Fernandes LA, Martins TM, Faleiros PL, Garcia VG. Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2015;86(10):1166-75.

- 20 - 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 therapy in the management of periodontal disease: a systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2016.
- 21- Kanoriya D, Pradeep AR, Singhal S, Garg V, Guruprasad CN. Synergistic approach using platelet-rich fibrin and 1% alendronate for intrabony defect treatment in chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2016;87(12):1427-1435.
- 22- Duarte PM, de Vasconcelos Gurgel BC, Sallum AW, Filho GR, Sallum EA, Nociti FH Jr. Alendronate therapy may be effective in the prevention of bone loss around titanium implants inserted in estrogen-deficient rats. *J Periodontol*. 2005;76(1):107-14.
- 23 - Doku HC, Shklar G, Bugbee B. The effect of epsilon aminocaproic acid on the healing of extraction wounds in hamsters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966;22(5):569-77.
- 24 - Castro CE, Koss MA, López ME. Cytological analysis of the periodontal pocket in patients with aggressive periodontitis and chronic periodontitis. *Contemp Clin Dent*. 2014;5(4):495-500.
- 25 - Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progressive of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticula* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(6):469-77.
- 26 - Bale BF, Doneen AL, Vigerust DJ. High-risk periodontal pathogens contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. *Postgrad Med J*. 2016;29.
- 27 - Yamamoto-Silva FP, Bradaschia-Correa V, Lima LA, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunohistochemical study of early repair of alveolar sockets after the extraction of molars from alendronate-treated rats. *Microsc Res Tech*. 2013;76(6):633-40.
- 28 - Silva PG, Ferreira Junior AE, Teófilo CR, Barbosa MC, Lima Júnior RC, Sousa FB, Mota MR, Ribeiro R de A, Alves AP. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(9): 1237-45.

- 29 - Li CL, Lu WW, Seneviratne CL, Leung WK, Zwahlen RA, Zheng LW. Role of periodontal disease in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws ovariectomized rats. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(1):1-6.
- 30 - McClung, MR. Bisphosphonate therapy: how long is long enough? *Osteoporos Int.* 2015; May;26(5):1455-7.
- 31 - Dannemann C, Zwahlen R, Grätz KW. Clinical experiences with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws. *Swiss Med Wkly.* 2006 Aug 5;136(31-32):504-9.
- 32 - Roelofs AJ, Coxon FP, Ebetino FH et al. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res.* 2010; 25: 606–616.
- 33 - Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blascheke S, Gründker C, Hofbauer LC. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;29(3):680-6.
- 34 - Moreira MM, Bradaschia-Correa V, Marques ND, Ferreira LB, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunohistochemical study of the effect of sodium alendronate in the progression of experimental periodontitis in rats. *Microsc Res Tech.* 2014;77(11):902-9.
- 35 - Bedogni A, Blandamura S, Lokmic Z, et al. Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105:358–364.
- 36 - Aghaloo T, Hazboun R, Tetradis S. Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaws. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2015;27(4):489-96.
- 37 - Bonnet N, Lesclous P, Saffar JL, Ferrari S. Zoledronate effects on systemic and jaw osteopenias in ovariectomized periostin-deficient mice. *PLoS One.* 2013;8(3):e58726.
- 38 - Yamashita J, Koi K, Yang DY, McCauley LK. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. *Clin Cancer Res.* 2011;17(6):1405-14.

ANEXO – FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Média e desvio padrão (DP) da reabsorção óssea na raiz distal e na furca na microtomografia computadorizada

		Zom/Lig30	Con/Lig30	p**
		Média ± DP	Média ± DP	
A	REGIÃO			
	Furca	0,60 ± 0,20	0,75 ± 0,57	0,522
	Língual (RD)	1,06 ± 0,16	1,25 ± 0,23	0,090
	Vestibular (RD)	1,14 ± 0,17	1,19 ± 0,33	0,700
	Valor médio (RD)	1,10 ± 0,12	1,22 ± 0,22	0,21
		Zom/Lig15	Con/Lig15	p**
		Média ± DP	Média ± DP	
B	Furca	0,28 ± 0,07	0,63 ± 0,50	0,119
	Língual (RD)	0,95 ± 0,83	1,05 ± 0,28	0,399
	Vestibular (RD)	0,90 ± 0,14	0,82 ± 0,18	0,383
	Valor médio (RD)	0,93 ± 0,1	0,94 ± 0,22	0,927
		Lig/Zom	Lig/Con	p**
		Média ± DP	Média ± DP	
C	Furca	0,86 ± 0,77	0,91 ± 1,06	0,933
	Língual (RD)	0,96 ± 0,12	1,23 ± 0,64	0,001
	Vestibular (RD)	0,89 ± 0,15	1,36 ± 0,28	0,003
	Valor médio (RD)	0,91 ± 0,12	1,30 ± 0,6	< 0,001

RD- Raiz distal; Valor Médio – Média de reabsorção da raiz distal
 Valores em mm
 (**) Teste t Student

Tabela 2. Média e desvio padrão (DP) da reabsorção óssea na raiz distal e na furca na histometria

Grupos				
Variáveis		Zom/Lig30	Con/Lig30	p-valor
		Média ± DP	Média ± DP	
A				
	O.A			
	distal	0,620 ± 0,096	0,490 ± 0,128	0,005 *
	Furca	1,276 ± 0,689	0,836 ± 0,376	0,046 **

Grupos

B	Variáveis		Zom/Lig15		p-valor
			Média ± DP	Média ± DP	
	O.A	raiz	0,323 ±	0,608 ±	< 0,001 *
	distal		0,143	0,301	
	Furca		0,429 ±	0,492 ±	0,516 **
			0,157	0,337	

C	Variáveis		Grupos		p-valor
			Lig/Zom	Lig/Con	
			Média ± DP	Média ± DP	
	O.A	raiz	0,408 ±	0,589 ±	0,001 *
	distal		0,058	0,159	
	Furca		0,363 ±	0,798 ±	< 0,001 *
			0,179	0,215	

O.A – Osso alveolar

Valores em mm

(*) Teste t Student (**) Teste de Mann-Whitney

Tabela 3. Média e desvio padrão (DP) do grau de inflamação na região da furca na histologia

		Grupos		p
		Zom/Lig30	Con/Lig30	
REGIÃO		Média ± DP	Média ± DP	
A	furca	3,6 ± 0,89	3,4 ± 0,89	0,733
		Zom/Lig15	Con/Lig15	
		Média ± DP	Média ± DP	
B	furca	3,0 ± 0,81	2,0 ± 0,01	0,018
		Lig/Zom	Lig/Com	

		Média ± DP		
		Média ± DP		
C	furca	2,4 ± 0,55	2,5 ± 1,0	0,853

Valores em mm
Teste t Student

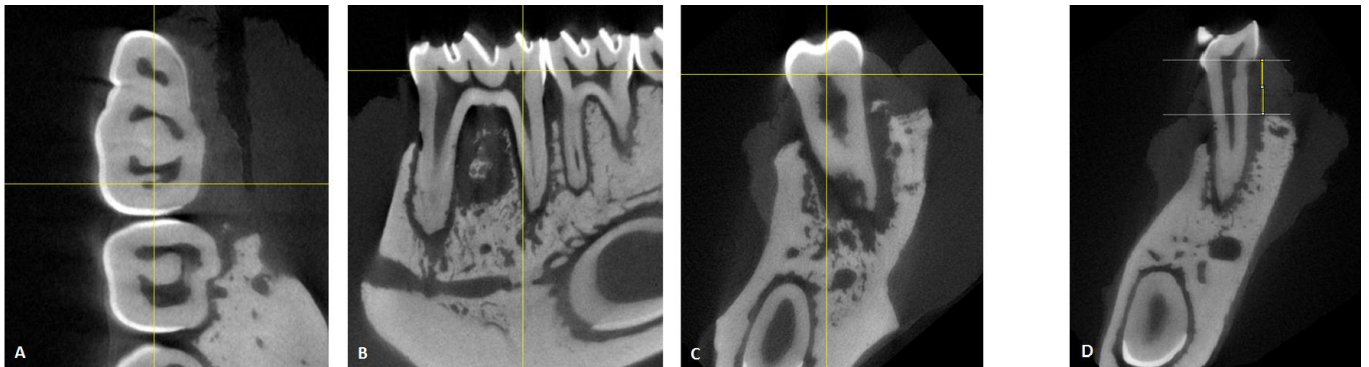


Figura 1. Reconstruções axial (A), sagital (B) e coronal (C) da área de interesse. Corte coronal utilizado para medição (D) traçando duas linhas horizontais (linhas brancas) na altura da junção amelo-cementária e na porção mais alta crista óssea alveolar. Mensuração da distância entre as linhas horizontais (linha amarela).

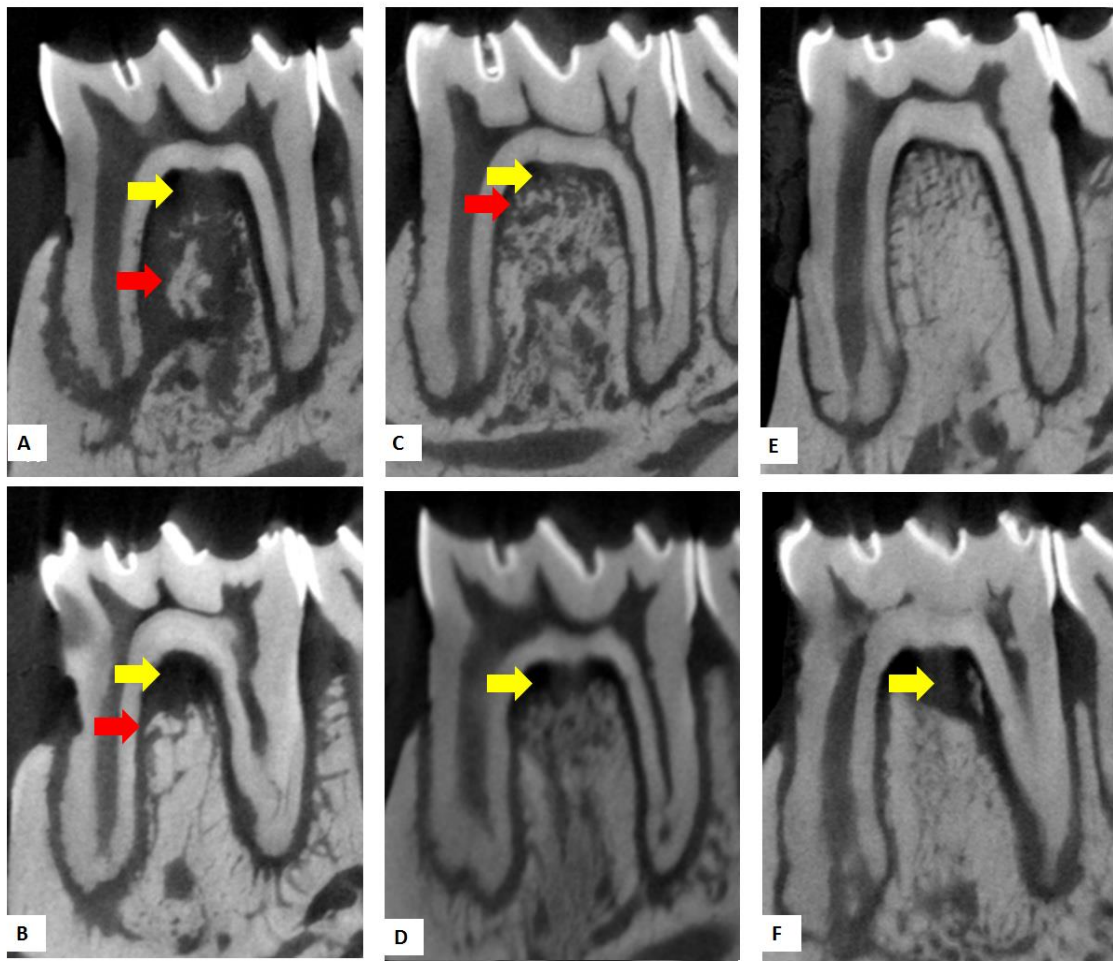


Figura 2. Cortes da microCT (sagital). Zom/Lig30 (A), Con/Lig30 (B), Zom/Lig15 (C), Con/Lig15 (D), Lig/Zom (E), Lig/Con (F). Reabsorção alveolar na furca (seta amarela), sequestro ósseo (seta vermelha).

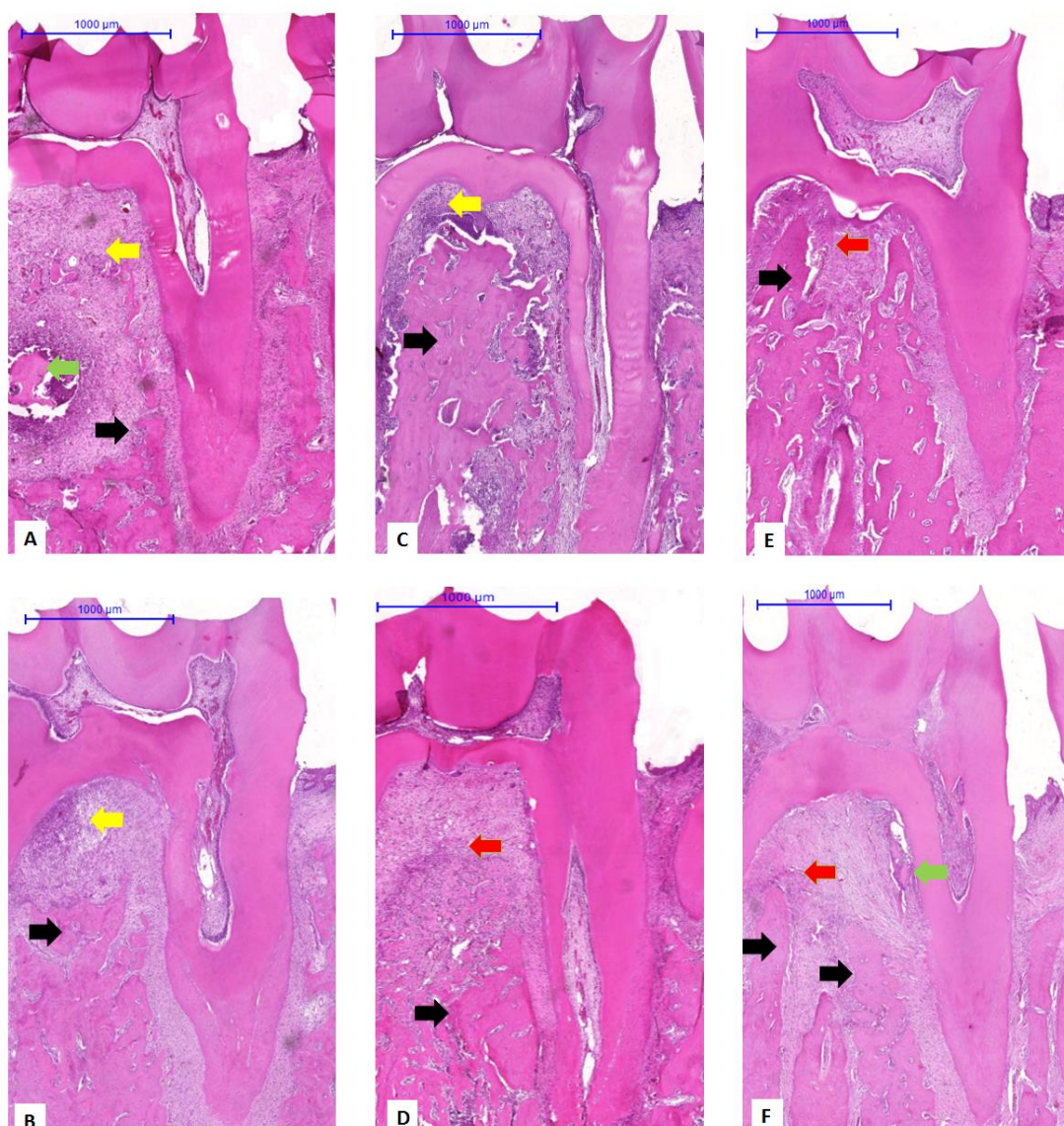


Figura 3. Cortes histológicos da inflamação na doença periodontal induzida. Grupos Zom/Lig30 (A), Zom/Lig15 (C), Con/Lig30 (B), Con/Lig15 (D), Lig/Zom (E) e Lig/Con (F). Aumento de 2x. Infiltrado inflamatório leve (seta vermelha), infiltrado inflamatório moderado (seta amarela), osteonecrose com formação de sequestro ósseo (seta verde) e osso viável (seta preta).

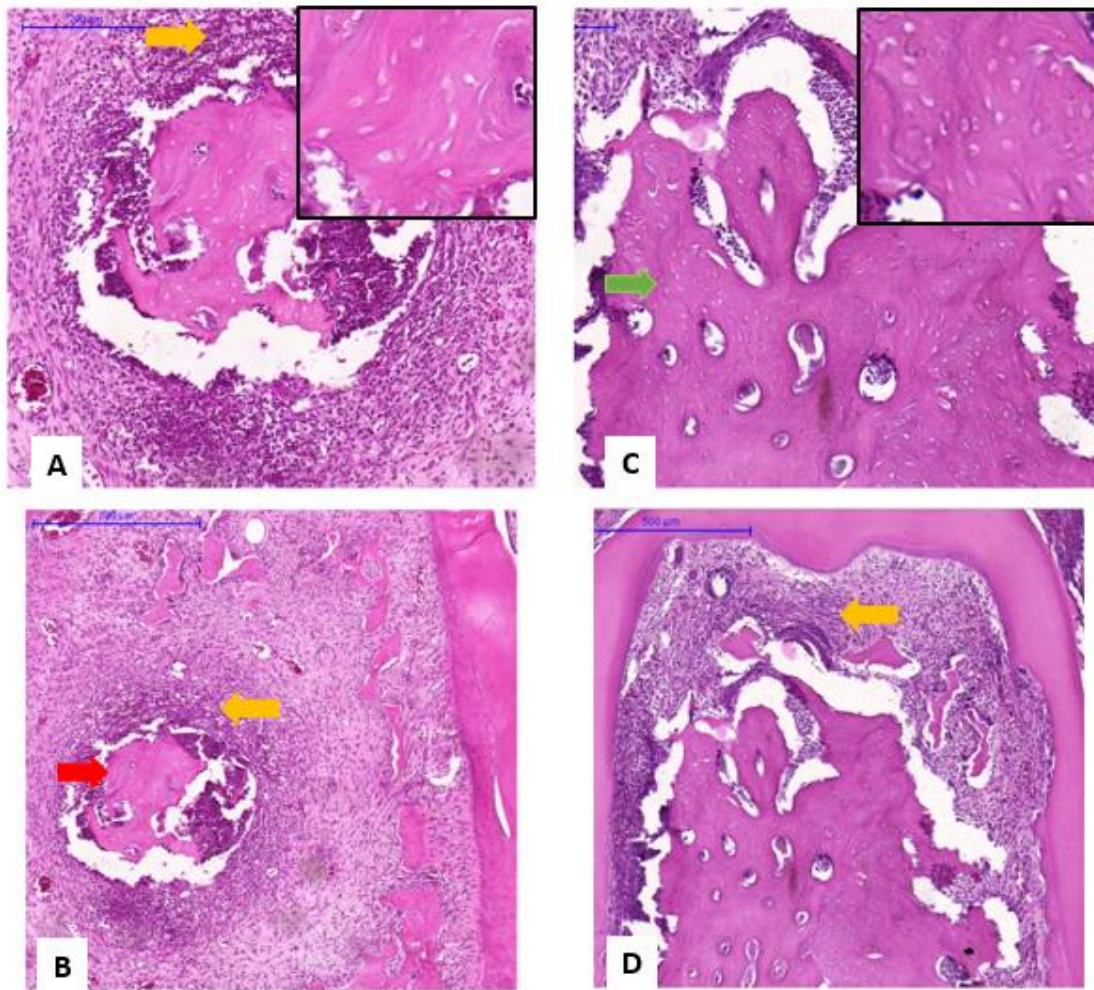


Figura 4. Osteonecrose nos grupos Zom/Lig30 (A e B) e Zom/Lig15 (C e D). Aumento de 10x (A, C) e de 5x (B, D). Osteonecrose com formação de sequestro ósseo (seta vermelha), osso necrótico (seta verde), infiltrado inflamatório (seta amarela) e perda de osteócitos confluentes (40x).

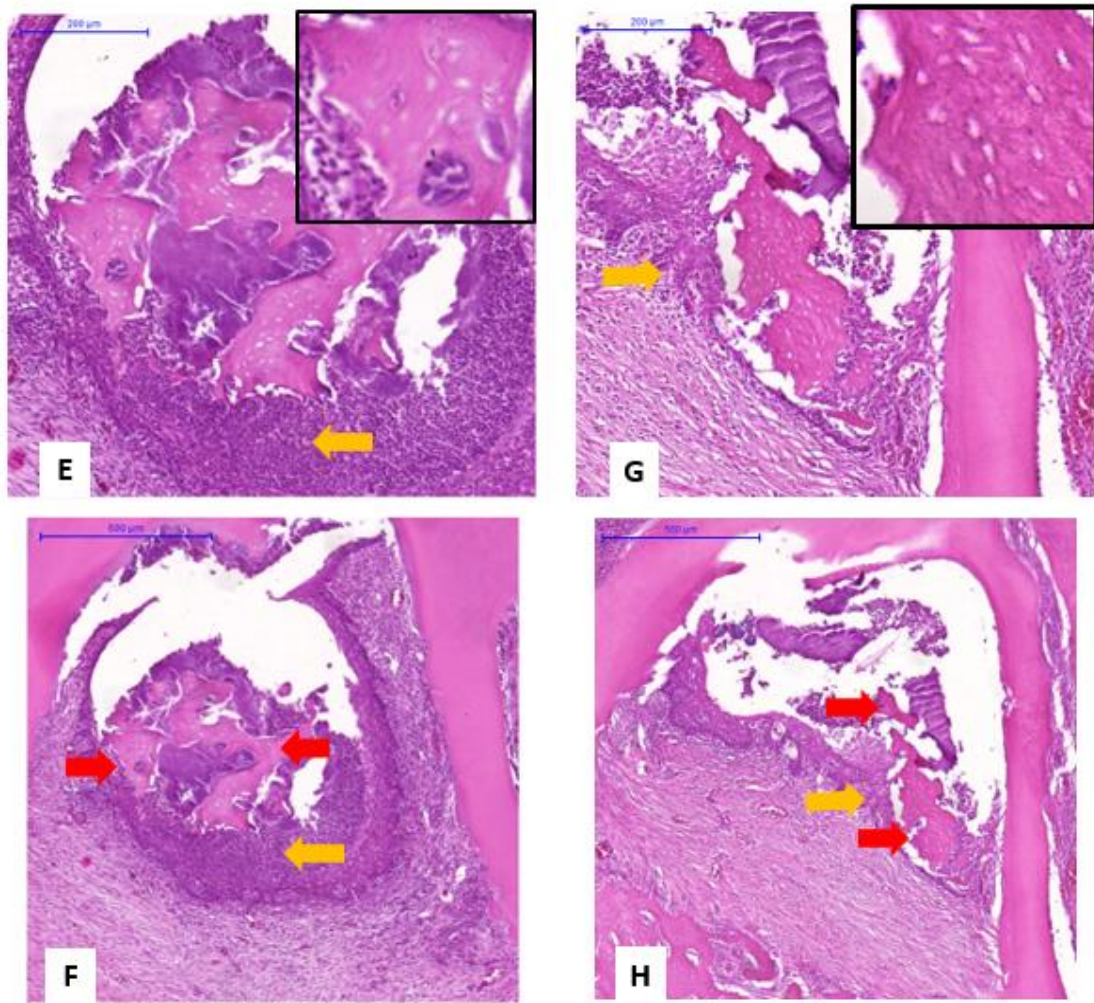


Figura 5. Osteonecrose nos grupos Con/Lig30 (E e F) e Lig/Con (G e H). Aumento de 10x (E, G) e de 5x (F, H). Osteonecrose com formação de sequestro ósseo (seta vermelha), infiltrado inflamatório (seta amarela) e perda de osteócitos confluentes (40x).

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o ácido zoledrônico diminui a reabsorção óssea alveolar em periodontite induzida em ratos tratados com a droga a longo prazo, entretanto o grau de inflamação independe do tempo em que a doença periodontal está presente. Além disso, o ácido zoledrônico apresenta-se como fator de risco para o desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares associados a bisfosfonatos na presença de trauma tecidual e infecção.

REFERÊNCIAS

DUNSTAN C. R, FELSEBERG D., SEIBEL M. J. Therapy insight: the risks and benefits of bisphosphonates for the treatment of tumor-induced bone disease. **Nat Clin Pract Oncol.**, v. 4, n. 1, p. 42-55, jan. 2007.

ASSAEL L. A. Oral bisphosphonates as a cause of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: clinical findings, assessment of risks, and preventive strategies. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 67, n. 5, p. 35-43, maio 2009.

KANG B., CHEONG S., CHAICHANASAKUL T., BEZOUGLAIA O., ATTI E., DRY S. M., PIRIH F. Q, AGHALOO T. L, TETRADIS S. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 7, p.1631-40, jul. 2013.

SUNYECZ J. A. Zoledronic acid infusion for prevention and treatment of osteoporosis. **Int J Womens Health**, v. 14, n. 2, p. 353-60, oct. 2010.

HAMPSON G., FOGELMAN I. Clinical role of bisphosphonate therapy. **Int J Womens Health**, v. 4, p. 455-69, 2012.

AGHALOO T. L., KANG B., SUNG E. C., SHOFF M., RONCONI M., GOTCHER J. E., BEZOUGLAIA O., DRY S. M., TETRADIS S. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 8, p.1871-82, aug. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2010. **Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Resultados Principais.** Brasília, 2012.

LI C. L., LU W. W., SENEVIRATNE C. L., LEUNG W. K., ZWAHLEN R. A., ZHENG L. W. Role of periodontal disease in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws ovariectomized rats. **Clin Oral Implants Res**, v. 27, n. 1, p.1-6, jan. 2016.

COLEMAN R. E. Risks and benefits of bisphosphonates. **Br J Cancer**, v. 98, n. 11, p. 1736-40, jun. 2008.

ROELOFS A. J., THOMPSON K., GORDON S., ROGERS M. J. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. **Clin Cancer Res**, v. 15, n.12, p. 6222s-6230s, oct. 2006.

ARANTES H. P., SILVA A. G., LAZARETTI-CASTRO M. Bisphosphonates in the treatment of metabolic bone diseases. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 54, n. 2, p. 206-12, mar. 2010.

YAMASHITA J., KOI K., YANG D. Y., MCCAULEY L. K. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 6, p. 1405-14, mar. 2011.

DANNEMANN C., ZWAHLEN R., GRÄTZ K. W. Clinical experiences with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws. **Swiss Med Wkly**, v. 5, n. 136, p. (31-32):504-9, aug. 2006.

ROELOFS A. J., COXON F. P., EBETINO F. H. et al. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. **J Bone Miner Res**, v. 25, p. 606–616, mar. 2010.

MCCLUNG, M. R. Bisphosphonate therapy: how long is long enough? **Osteoporos Int**, v. 26, n. 5, p.1455-7, may. 2015.

ROSINI S., ROSINI S., BERTOLDI I., FREDIANI B. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 19, n. 17, p. 3309-17, sep. 2015.

SAHNI M., GUENTHER H. L., FLEISCH H., COLLIN P., MARTIN T. J. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. **J Clin Invest**, v. 91, n. 5, p. 2004-11, may. 1993.

REINHOLZ G. G, GETZ B., PEDERSON L., SANDERS E. S., SUBRAMANIAM M., INGLE J. N., SPELSBERG T. C. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. **Cancer Res**, v. 60, n. 21, p. 6001–6007, nov. 2000.

PLOTKIN L. I., WEINSTEIN R. S., PARFITT A. M., ROBERSON P. K., MANOLAGAS S. C., BELLIDO T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. **J Clin Invest**, v. 104, n. 10, p. 1363–1374, nov. 1999.

RUGGIERO S. L., DODSON T. B., FANTASIA J., GOODDAY R., AGHALOO T., MEHROTRA B., O'RYAN F. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw-2014 Update. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 72, n. 10, p. 1938, oct. 2014. Erratum in **J Oral Maxillofac Surg**, v. 73, n. 7, p. 1440, jul. 2015.

VERMEER J., RENDERS G., VAN DUIN M. A., JANSEN I., BAKKER L. F., KROON S. A., De VRIES T. J., EVERTS V. Bone-site-specific responses to zoledronic acid. **Oral Dis**, v. 23, n. 1, p. 126-133, jan. 2017.

REID I. R., CORNISH J. Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. **Nat Rev Rheumatol**, v. 8, n. 2, p. 90–96, nov. 2012.

MARX R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 61, n. 9, p. 1115-7, sep. 2003.

AGHALOO T., HAZBOUN R., TETRADIS S. Pathophysiology of Osteonecrosis of the Jaws. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 27, n. 4, p. 489-96, 2015.

FILLEUL O., CROMPOT E., SAUSSEZ S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 136, n. 8, p. 1117–1124, aug. 2010.

BARBA-RECREO P., DEL CASTILLO PARDO DE VERA J. L., GARCÍA-ARRANZ M., YÉBENES L., BURGUEÑO M. Zoledronic acid e Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 42, n. 6, p. 744-50, sep. 2014.

KOLPAKOVA M. E., ZUBAREVA A. A., ARTAMONOVA T. D., LISOVSKAYA E. K., CHEFU S. G., YAGMUROV O. D., YAREMENKO A. I., VLASOV T. D. Experimental model of osteonecrosis of the jaw in rats treated with zoledronic acid. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 55, n. 2, p. 156 – 159, feb. 2017.

FERNÁNDEZ AYORA A., HERION F., ROMPEN E., REGINSTER J.Y., MAGREMANNE M., LAMBERT F. Dramatic Osteonecrosis of the jaw associated with oral bisphosphonates, periodontitis, and dental implant removal. **J Clin Periodontol**, v. 42, n. 2, p. 190-5, feb. 2015.

BYRNE S. J., DASHPER S. G., DARBY I. B., ADAMS G. G., HOFFMANN B., REYNOLDS E. C. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in subgingival plaque. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, n. 6, p. 469-77, dec. 2009.

NG H. M., KIN L. X., DASHPER S. G., SLAKESKI N., BUTLER C. A., REYNOLDS E. C. Bacterial interactions in pathogenic subgingival plaque. **Microb Pathog**, v. 94, p. 60-9, may. 2016.

GIANNOBILE W. V. Host-response therapeutics for periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 79, p. 1592-600, aug. 2008.

PUSSINEN P. J., PAJU S., MANTYLA P., SORSA T. Serum microbial- and host-derived markers of periodontal diseases: A review. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 22, p. 2402–2412, 2007.

PUSSINEN P. J., PAJU S., MANTYLA P., SORSA T. Serum microbial- and host-derived markers of periodontal diseases: A review. **Curr Med Chem**, v. 14, p. 2402–2412, 2007.

RA H. J., PARKS W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol**, v. 26, n. 8, p. 587–596, oct. 2007.

AKRAM Z., ABDULJABBAR T., KELLESARIAN S. V., ABU HASSAN M. I., JAVED F., VOHRA F. Efficacy of bisphosphonate as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy in the management of periodontal therapy in the management of periodontal disease: a systematic review. **Br J Clin Pharmacol**. V. 83, n. 3, p. 444–454, 2017.

ALENCAR V. B., BEZERRA M. M., LIMA V., ABREU A. L., BRITO G. A., ROCHA F. A., RIBEIRO R. A. Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 73, n. 3, p. 251-6, mar. 2002.

TANI-ISHII N., MINAMIDA G., SAITOH D., et al. Inhibitory effects of incadronate on the progression of rat experimental periodontitis by porphyromonas gingivalis infection. **J Periodontol**, v. 74, n. 5, p. 603-9, may. 2003.

DE ALMEIDA J., ERVOLINO E., BONFIETTI L. H., et al. Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 86, n. 10, p. 1166-75, oct. 2015.

PARK C. H., ABRAMSON Z. R., TABA M. Jr., JIN G., et al. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. **J Periodonol**, v. 78, n. 2, p. 273-81, aug. 2007.

CLARK D. P., BADEA C. T. Micro-CT of rodents: state-of-the-art and future perspectives. **Phys Med**, v. 30, n. 6, p. 619-34, sep. 2014.

AGUIRRE J. I., AKHTER M. P., KIMMEL D. B., PINGEL J. E., et al. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. **J Bone Miner Res**, v. 27, n. 10, p. 2130-43, oct. 2012.

DOKU H. C., SHKLAR G., BUGBEE B. The effect of epsilon aminocaproic acid on the healing of extraction wounds in hamsters. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 22, n. 5, p. 569-77, nov. 1966.

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de Ética

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 11 de junho de 2013.

Ofício nº 592/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Profª. Flávia Maria de Moraes Ramos Perez**

Núcleo de Cirurgia Experimental – CCS

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.019257/2013-80

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Avaliação do efeito do ácido zoledrônico na progressão da doença periodontal em ratos: análise morfológica, tomográfica e imunohistoquímica**".

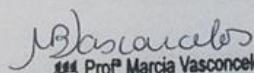
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério; Animais: Ratos Novergicus Albinos; Linhagem: Wistar; Idade: 30 dias; Peso: 300-350g; Sexo: Machos; Nº total de animais: 48

Atenciosamente,


Profª Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUACCB-UFPE
SUAPE 2199635

Recife, 11 de junho de 2013.

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO B - Normas da Revista

Journal of Periodontology

Submissions to the *Journal of Periodontology* should be limited to one of the categories defined below. Specific information regarding length and format is provided for each category. Please also refer to the instructions provided under [General Format](#) and [Style](#). All manuscripts will be reviewed by the Editors for novelty, potential to extend knowledge, and relevance to clinicians and researchers in the field. Some manuscripts will be returned without review, based on the Editors' judgment of the appropriateness of the manuscript for the *Journal of Periodontology*.

ORIGINAL ARTICLES

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

Format

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

Abstract

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

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

Introduction

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

Materials and Methods

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

Results

Results should be presented in a logical sequence with reference to tables, figures, and supplemental material as appropriate.

Discussion

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

Publication of Accepted Original Articles

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

REVIEW ARTICLES

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

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

1. Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* [serial on the Internet]. September 2008; version 5.0.1. Available at: www.cochrane-handbook.org.
2. Humphrey L, Fu R, Buckley D, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: A systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med* 2008;23:2079-2086.
3. Moher D, Cook D, Eastwood S, Olkin I, Rennie D, Stroup D. Improving the quality of reports of meta-analyses of randomized controlled trials: The QUOROM statement. *Lancet* 1999;354:1896-1900.
4. Cook D, Mulrow C, Haynes R. Systematic reviews: Synthesis of best evidence for clinical decisions. *Ann Intern Med* 1997;126:376-380.
5. Mulrow C, Langhorne P, Grimshaw J. Integrating heterogeneous pieces of evidence in systematic reviews. *Ann Intern Med* 1997;127:989-995.

Format

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

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

COMMENTARIES

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

Introduction

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

Body

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

Summary

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

Acknowledgment(s)

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

CASE SERIES

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

Case Series report a sufficient number of consecutive or randomized cases to make a persuasive argument for or against the procedure, technique, or concept under discussion. Cases should be relatively homogeneous so that a systematic evaluation of

one type of disease, lesion, or condition is made for the procedure under consideration. Also, treatment and documentation should be consistent and standardized for all cases. It is recognized that definitive evidence for the safety and efficacy of any procedure, drug, or device comes primarily from well-designed, randomized, controlled trials. However, well-executed Case Series may lead to hypotheses about the usefulness of new and innovative procedures, drugs, or devices and may therefore be of value to the progress of clinical science.

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

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

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

Requirement for Ethics Board Approval

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

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

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

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

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

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

Privacy in Case Series

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

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

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

Format

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

Abstract

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

- Background: Describes the clinical situation being discussed.

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

Introduction

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

Case Description and Results

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

Discussion

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

GUEST EDITORIALS

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

LETTERS TO THE EDITOR

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

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

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

Citations should be handled as standard references.

GENERAL FORMAT

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

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

Figures should not be embedded in the manuscript. Please see the *Journal of Periodontology* [Digital Art Guidelines](#) for more information on submitting figures. Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

TITLE PAGE

The title page should contain:

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

KEY WORDS

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

ACKNOWLEDGMENT(S) AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgment(s)

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

Conflicts of Interest

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

Authors are required to submit:

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

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

Example of Conflict of Interest Statement

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

REFERENCES

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

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

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

Journals

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

Books and Other Monographs

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

Electronic

Citations

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

9. Online-only article. Rasperini G, Acunzo R, Limiroli E. Decision making in gingival recession treatment: Scientific evidence and clinical experience. *Clin Adv Periodontics* 2011;1:41-52. doi:10.1902/cap.2011.100002.
10. Ahead of print. McGuire MK, Scheyer ET, Nevins M, et al. Living cellular construct for increasing the width of keratinized gingiva. Results from a randomized, within-patient, controlled trial [published online ahead of print March 29, 2011]. *J Periodontol*; doi:10.1902/jop.2011.100671.

11. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Periodontal Disease. Available at: http://www.cdc.gov/OralHealth/topics/periodontal_disease.htm. Accessed September 29, 2010.

TABLES

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

FIGURES

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

Figure

Legends

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

FOOTNOTES

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

SUPPLEMENTARY MATERIAL

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

Supplementary Figures and Tables
Journal of Periodontology articles are limited to a combined total of six figures and tables in the print publication. Any additional figures and tables should be submitted as

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

Supplementary

Videos

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

STYLE

Please follow the guidelines below when preparing a manuscript:

- Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- Do not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, e.g., or i.e.
- Use a block style; do not tabulate or indent material.
- Refer to the newest edition of the [Glossary of Periodontal Terms](#) published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.
- Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the [Annals of Periodontology, volume 4](#) (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).
- Create equations as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.
- Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal/National) numbering system.
- Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results

should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

AUTHORSHIP

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

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

Conflict of Interest and Financial Disclosure Forms

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

CLINICAL TRIALS

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

All clinical trials must be registered prior to submission to the *Journal of Periodontology* at one of the registration sites listed below. The registration number and

date of registration should be included in the Materials and Methods section. **Starting January 1, 2016, all clinical trials must be registered prior to initiation (i.e., recruitment) of the trial.** Please see <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/about-studies/learn#WhatIs> for more information regarding clinical trials. U.S. National Institutes of Health Clinical Trials Registry - <http://www.clinicaltrials.gov>

- EU Clinical Trials Register - <https://www.clinicaltrialsregister.eu>
- WHO International Clinical Trials Registry Platform - <http://www.who.int/ictrp/en>

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

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

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

PRODUCT IDENTIFICATION

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

REVISED MANUSCRIPTS

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

1. A detailed response to each reviewer comment for the original manuscript should be included. This response should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews.

2. Only the most recent version of each file should be uploaded. You may have to delete older files from the Author Center.
3. **Please upload a version of the manuscript with changes highlighted or track changes enabled. This should be uploaded as a supplemental file.**
4. Figures and tables should be resubmitted with revised manuscripts, even if they were not revised.

REVIEW PROCESS

Peer Review

The *Journal of Periodontology* is a peer-reviewed publication. All manuscripts, including Reviews, Commentaries, and Case Series are submitted to a minimum of two reviewers and, when appropriate, to a statistical reviewer. Authors are given reviewer comments and additional information or observations as the Editor believes would be helpful. Revised manuscripts are due within 30 days of receipt of the Editor's communication.

Checking the Status of a Manuscript

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

MANUSCRIPT ACCEPTANCE

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

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

Reprints

Corresponding authors may purchase reprints at the time pages are received for

proofreading. Reprints can be purchased in 4-color or black and white. Electronic reprints are also available.

Online-Only Publication

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

Funding Agency Requirements

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