

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM
RESVERATROL NA PROGRESSÃO DA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL EM RATAS COM DEFICIÊNCIA
DE ESTROGÊNIO: ANÁLISE MORFOMÉTRICA,
IMUNOENZIMÁTICA E DE EXPRESSÃO GÊNICA**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Paulista – UNIP, para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia.

ANDRÉIA MANETTA MOLEZ

**SÃO PAULO
2018**

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM
RESVERATROL NA PROGRESSÃO DA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL EM RATAS COM DEFICIÊNCIA
DE ESTROGÊNIO: ANÁLISE MORFOMÉTRICA,
IMUNOENZIMÁTICA E DE EXPRESSÃO GÊNICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Grazieli Corrêa

ANDRÉIA MANETTA MOLEZ

SÃO PAULO

2018

Molez, Andreia Manetta.

Efeito do tratamento sistêmico com resveratrol na progressão da periodontite experimental em ratas com deficiência de estrogênio : análise morfométrica, imunoenzimática e de expressão gênica / Andreia Manetta Molez. - 2018.

50 f. : il. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Periodontia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mônica Grazieli Corrêa.

1. Resveratrol. 2. Zoledronato. 3. Periodontite al. 4. Deficiência de estrogênio. I. Corrêa, Mônica Grazieli (orientadora). II. Título.

ANDRÉIA MANETTA MOLEZ

**EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM
RESVERATROL NA PROGRESSÃO DA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL EM RATAS COM DEFICIÊNCIA
DE ESTROGÊNIO: ANÁLISE MORFOMÉTRICA,
IMUNOENZIMÁTICA E DE EXPRESSÃO GÊNICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

_____ - ____/____/____

Profa. Dra. Mônica Grazieli Corrêa
Universidade Paulista – UNIP

_____ - ____/____/____

Profa. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro
Universidade Paulista – UNIP

_____ - ____/____/____

Prof. Dr. Adilson Sakuno
Faculdade de Odontologia da APCD - FAOA

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao amigo, professor e mentor Adilson Sakuno, que sempre incentivou e acreditou no meu crescimento profissional e compartilhou seus conhecimentos científicos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio Braz Molez e Geny Manetta Molez, por todos os ensinamentos e diretrizes em minha vida, além de incentivos e vibrações diárias pelo meu crescimento.

À minha orientadora Profa. Dra. Mônica Grazieli Corrêa, pela paciência e disponibilidade de compartilhar seu exímio conhecimento.

À toda equipe de periodontia da UNIP, pelo exemplo de comprometimento e seriedade com a pesquisa e amor pela odontologia.

Ao meu amigo Rodrigo Soler Zamai, por ser companheiro leal nessa jornada e dividir os momentos de aprendizado e as dúvidas.

Aos amigos e professores da equipe BIRD GROUP, pelo incentivo e troca de conhecimentos.

Aos colaboradores da UNIP, que estiveram envolvidos neste trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, e à CAPES/PROSUP, pela bolsa de estudos.

Por fim, a Deus, pela oportunidade à vida, afinal, sem Ele, nada seria possível.

“Não se apegue a versão que já alcançou de si. O devir existencial é infinitamente mais prazeroso que a estagnação. Do já alcançado brota o que ainda se desconhece. Os acontecimentos partejam diariamente outras faces que estão ocultas em seu interior.

Observem bem os que te influenciam. Não demore nos que fazem regredir. Incorpore como parte irrenunciável os que fazem evoluir. Não se prive de estar com os que lhe concedem acesso ao profundo dos seus sentimentos, aos que lhe fazem pensar com maior fecundidade. Porque essa vida não se repetirá. E não seria interessante dela se despedir sem antes ter alcançado a riqueza de suas possibilidades.”

(Pe Fábio de Melo)

RESUMO

Este estudo teve como objetivo determinar o papel do resveratrol (RESV) e do zoledronato (ZDL), na progressão da perda óssea alveolar (POA) na periodontite experimental (PE), em animais ovariectomizados (OVT). Os animais foram distribuídos nos grupos: OVT+RESV (n:10): OVT+ resveratrol; OVT+PLA (n:10): OVT+ placebo; OVT+ZLD+PLA (n:10): OVT+ zoledronato + placebo; OVT+RESV+ZLD (n:10): OVT + RESV e ZLD; SHAM (n:10): animais não-ovariectomizados + placebo. A indução da PE foi realizada pela colocação de fios de algodão, nos segundos molares maxilares. Após a eutanásia, as maxilas foram submetidas à análise de microCT e à análise morfométrica para quantificação da POA. O tecido gengival coletado para análise imunoenzimática de marcadores locais pró e anti-inflamatórios (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, INF- γ , TNF- α) e/ou relacionados ao estresse oxidativo [superóxido dismutase -SOD1; e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase] pelo ensaio Luminex/MAGPix e ELISA, respectivamente e análise da expressão gênica (OPG, RANKL e Runx2). Foi coletado sangue para análise sérica de Telopectídeo Carboxiterminal do Colágeno Tipo I (CTX), por meio de Elisa. Os resultados morfométricos mostraram que o grupo OVT+PLAC apresentou maior perda óssea, quando comparado aos demais grupos ($p<0.05$). Os grupos que receberam ZLD apresentaram menor perda óssea alveolar quando comparados aos grupos OVT+RESV e SHAM+PLAC ($p<0.05$). Na análise de microCT, foi observada menor densidade óssea no grupo OVT+PLAC em comparação aos demais grupos ($p<0.05$) e menor porcentagem de volume ósseo no grupo OVT+PLAC em comparação a OVT+ZLD+PLAC, OVT+ZLD+RESV e SHAM+PLAC ($p<0.05$). O tratamento com ZLD promoveu maior densidade e porcentagem de volume ósseo quando comparado com OVT+RESV e SHAM+PLAC ($p<0.05$). Em relação à análise imunoenzimática, os níveis de IL-4 foram significativamente menores no grupo OVT+PLAC versus OVT+ZLD+RESV e SHAM+PLAC ($p<0.05$). Observaram-se maiores níveis de IL-1 β e IL-17 no grupo OVT+PLAC em comparação a SHAM+PLAC ($p<0.05$). A concentração de IL-6, INF- γ e TNF- α foi menor no OVT+ZLD+PLAC, quando comparado ao grupo OVT+PLAC ($p<0.05$). Quanto aos níveis dos marcadores relacionados ao estresse oxidativo, observou-se que NADPH oxidase apresentou níveis significativamente menores no grupo OVT+RESV quando comparado a OVT+PLAC ($p<0.05$). Já os níveis de SOD1

foram menores no grupo OVT+PLAC versus OVT+ZLD+PLAC e SHAM+PLAC ($p<0.05$). A análise da expressão gênica revelou diferenças significativas apenas nos níveis de mRNA de OPG, com menor concentração em OVT+PLAC comparado ao grupo SHAM+PLAC ($p<0.05$). Em relação aos níveis séricos de CTX, o grupo OVT+PLAC apresentou maiores níveis de CTX comparando-se a OVT+ZLD+PLAC, OVT+ZLD+RESV e SHAM+PLAC ($p<0.05$). Foi observado maior nível de CTX no grupo OVT+RESV versus SHAM+PLAC ($p<0.05$). Pode-se concluir que o ZDL reduziu a POA por meio da modulação dos níveis de IL-6, IFN- γ , TNF- α e SOD1, na presença da osteoporose. Na condição de deficiência de estrogênio, o RESV não modulou a POA e não trouxe benefícios adicionais quando associado ao ZDL.

Palavras-chave: Resveratrol; Zoledronato; Periodontite; Deficiência de Estrogênio.

ABSTRACT

This study aimed to determine the role of resveratrol (RESV) and zoledronate (ZLD) in the progression of alveolar bone loss (POA) in experimental periodontitis (EP) in ovariectomized animals (OVT). The animals were divided into the groups: OVT + RESV (n: 10): OVT + resveratrol; OVT + PLA (n: 10): OVT + placebo; OVT + ZLD + PLA (n: 10): OVT + zoledronate + placebo; OVT + RESV + ZLD (n: 10): OVT + RESV and ZLD; SHAM (n: 10): non-ovariectomized animals + placebo. The induction of PE was performed by the placement of cotton threads in the maxillary second molars. After euthanasia, the maxilla were submitted to microCT analysis and morphometric analysis to quantify the POA. The gingival tissue collected for the immunoenzymatic analysis of local pro and anti-inflammatory markers (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, INF γ , TNF- α) and / or oxidative stress related [superoxide dismutase - SOD1; and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase] by the Luminex / MAGPix and ELISA assays respectively and gene expression analysis (OPG, RANKL and Runx2). Blood was collected for serum analysis of Carboxyterminal Telopeptide of Type I Collagen (CTX), through Elisa. The morphometric results showed that the OVT + PLAC group presented greater bone loss when compared to the other groups ($p < 0.05$). The groups that received ZLD had lower alveolar bone loss when compared to OVT + RESV and SHAM + PLAC groups ($p < 0.05$). In the analysis of microCT, lower bone density was observed in the OVT + PLAC group compared to the other groups ($p < 0.05$) and lower bone volume percentage in the OVT + PLAC group compared to OVT + ZLD + PLAC, OVT + ZLD + RESV and SHAM + PLAC ($p < 0.05$). Treatment with ZLD promoted higher density and percentage of bone volume when compared to OVT + RESV and SHAM + PLAC ($p < 0.05$). In relation to immunoenzymatic analysis, IL-4 levels were significantly lower in the OVT + PLAC group versus OVT + ZLD + RESV and SHAM + PLAC ($p < 0.05$). Higher levels of IL-1 β and IL-17 in the OVT + PLAC group were observed compared to SHAM + PLAC ($p < 0.05$). The concentration of IL-6, IFN- γ and TNF- α was lower in OVT + ZLD + PLAC, when compared to OVT + PLAC group ($p < 0.05$). As for the levels of the markers related to oxidative stress, it was observed that NADPH oxidase had significantly lower levels in the OVT + RESV group when compared to OVT + PLAC ($p < 0.05$). Already the levels of SOD1 were lower in the OVT + PLAC group versus OVT + ZLD + PLAC and SHAM + PLAC ($p < 0.05$). Analysis of gene

expression revealed significant differences only in OPG mRNA levels, with a lower concentration in OVT + PLAC compared to the SHAM + PLAC group ($p < 0.05$). In relation to serum CTX levels, the OVT + PLAC group had higher levels of CTX compared to OVT + ZLD + PLAC, OVT + ZLD + RESV and SHAM + PLAC ($p < 0.05$). A higher CTX level was observed in the OVT + RESV group versus SHAM + PLAC ($p < 0.05$). It can be concluded that ZDL reduced POA by modulating levels of IL-6, IFN- γ , TNF- α and SOD1 in the presence of osteoporosis. In the estrogen deficiency condition, the RESV did not modulate the POA and did not bring additional benefits when associated to the ZDL.

Key words: Resveratrol; Zoledronate; Periodontal; Estrogen deficiency.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
3 CONCLUSÃO	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
ANEXOS	24

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença generalizada do esqueleto, caracterizada pela diminuição da massa óssea e degradação da microarquitetura do tecido ósseo (Friedlander, 2002). O principal fator etiológico dessa doença é a deficiência de estrogênio que ocorre no período pós-menopausa (Friedlander, 2002). A periodontite é uma doença inflamatória crônica, que tem como fator etiológico o biofilme bacteriano e é mediada pela resposta imunoinflamatória do hospedeiro, resultando em destruição tecidual e perda dentária (Kinane et al., 2011). A resposta imunoinflamatória do hospedeiro pode sofrer exacerbação diante de fatores sistêmicos, como a deficiência de estrogênio e, diante dessa modificação, a severidade e a progressão da periodontite podem ser alteradas.

Alguns estudos têm demonstrado que a deficiência de estrogênio pode desempenhar um importante papel na exacerbação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro frente ao desafio bacteriano. Evidências recentes apontam que mulheres portadoras de osteoporose no período pós-menopausa apresentam maior perda de inserção clínica periodontal, maiores profundidades de sondagem e redução significativa da crista óssea alveolar quando comparadas a mulheres com osteopenia ou saudáveis (Singh et al., 2014). Chang et al. (2014) também demonstraram em um estudo populacional, com cinco anos de acompanhamento, que pacientes com osteoporose apresentaram maior risco de periodontite. Recentemente, baseados em resultados de um estudo experimental em ratos, Dai et al. (2015) concluíram que o fenótipo osteoporótico possui um potencial importante para acelerar a progressão da doença periodontal, contribuindo para a degradação do periodonto.

Os bisfosfonatos são agentes antirreabsortivos amplamente utilizados no tratamento para o controle da osteoporose. Os bisfosfonatos e dentre eles, o zoledronato, podem controlar a reabsorção óssea e aumentar a aposição deste tecido (O’Ryan&Lo2012). Estudos em animais (Furlaneto et al., 2018, Dutra et al., 2017, Storrer et al., 2016, De Almeida et al. 2015, Furlaneto et al., 2014, Shinoda et al., 2008; Cetinkaya et al., 2008, Menezes et al., 2005, Duarte et al., 2004, Yaffe et al., 2003, Tani-ishii et al. 2003, Alencar et al., 2002, Mitsuta et al., 2002, O’Uchi et al., 1998, Shoji et al. 1995, Weinreb, 1994, Brunsvold et al., 1992) e clínicos(Pradeep

et al. 2017, Pradeep et al., 2012, Sharma&Pradeep, 2012a, b, Goya et al., 2006, Lane et al., 2005) têm mostrado que essas substâncias antirreabsortivas, aplicadas de forma tópica ou sistêmica, reduzem a perda óssea alveolar decorrente da periodontite. O zoledronato ou ácido zoledrônico é um potente bisfosfonato usado em doses anuais para o tratamento da osteoporose. Estudos mostram o efeito positivo do zoledronato na densidade óssea de pacientes com osteoporose (Grey et al., 2017, Tan et al., 2016, Dempster et al., 2016). Por outro lado, estudos em animais, que empregaram doses semelhantes ou maiores do que aquelas usadas em tratamentos oncológicos (com o objetivo de mimetizar o efeito do uso prolongado da substância), para verificar o efeito da periodontite no desenvolvimento da osteonecrose e de sua patogênese, mostraram a ocorrência de osteonecrose dos maxilares, um importante efeito adverso do uso da droga, que é potencializado na presença da periodontite (Soundia et al. 2018, 2017, Otto et al., 2017, Li et al, 2016, Li et al., 2015, Aghaloo et al., 2011).

Tendo em vista que a deficiência de estrogênio pode alterar a resposta imunoinflamatória do hospedeiro e que o emprego de drogas como os bisfosfonatos pode causar osteonecrose dos maxilares, o emprego de substâncias naturais, com potencial de modulação da resposta do hospedeiro e ausência de efeitos adversos ou efeitos adversos mínimos, se torna uma alternativa interessante. Neste contexto, o resveratrol(3,5,4'-triidroxiestilbeno), um polifenol derivado de plantas, com efeito antioxidante, antitumoral e anti-inflamatório, tem mostrado benefício na prevenção e tratamento de algumas doenças como câncer, distúrbios cardiovasculares, doenças degenerativas, autoimunes e metabólicas, incluindo o diabetes mellitus (Baur& Sinclair 2006, Schmatz et al. 2009, El-Mowafy et al. 2011, Lanzilli et al. 2012). Recentes estudos têm também demonstrado o efeito do resveratrol na prevenção e tratamento da osteoporose (Feng et al. 2014, Zhao et al. 2014, Guo et al. 2015, Hao et al. 2015, Tou 2015) com melhora na massa e densidade ósseas e restauração dos níveis de fosfatase alcalina (Tou 2015, Feng et al., 2014), sugerindo que o resveratrol possa ser utilizado como terapia adjuvante no tratamento e prevenção da osteoporose. Adicionalmente, o efeito positivo na redução da perda óssea alveolar na periodontite experimental com o uso sistêmico do resveratrol também tem sido mostrado, mesmo em condições de comprometimento sistêmico (Corrêa et al., 2018,

Ribeiro et al., 2017, Bhattarai et al., 2016, Corrêa et al., 2017, Casati et al., 2013, Zhen et al., 2015, Tamaki et al., 2014).

Tendo em vista o potencial do resveratrol na redução da perda óssea e controle e prevenção da osteoporose, seria interessante investigar os possíveis benefícios dessa substância na progressão da periodontite experimental na presença da deficiência de estrogênio. Embora existam alguns dados moleculares sobre os efeitos positivos do resveratrol na cascata imunoinflamatória e nos processos relacionados ao metabolismo ósseo, a influência deste composto na perda óssea alveolar na presença da osteoporose ainda não é conhecida. Além disso, não há informações quanto ao efeito da associação de resveratrol e zoledronato na progressão de PE, bem como quanto aos mecanismos moleculares dessa associação. Desta forma, este estudo teve como objetivo investigar o efeito do resveratrol sobre a progressão da periodontite experimental em ratas com deficiência de estrogênio.

2 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, torna-se evidente que mais estudos são necessários afim de investigar doses mais altas do resveratrol na condição de deficiência de estrogênio. Considerando-se os limites do presente estudo, pode-se concluir que o resveratrol não modulou a perda óssea alveolar na presença da deficiência de estrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Friedlander AH. The physiology, medical management and oral implications of menopause. *J Am Dent Assoc.* 2002 Jan;133(1):73-81.
2. Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG; Working Group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2011; 38 Suppl 11: 44-48.
3. Singh A, Sharma RK, Siwach RC, Tewari S, Narula SC. Association of bone mineral density with periodontal status in postmenopausal women. *J Investig Clin Dent.* 2014 Nov;5(4):275-82.
4. Chang WP, Chang WC, Wu MS, Pai JT, Guo YC, Chen KC, Liu ME, Chiu WT, Hung KS. Population-based 5-year follow-up study in Taiwan of osteoporosis and risk of periodontitis. *J Periodontol.* 2014 Mar;85(3):e24-30.
5. Dai J, Ma Y, Shi M, Cao Z, Zhang Y, Miron RJ. Initial changes in alveolar bone volume for SHAM-operated and ovariectomized rats in ligature-induced experimental periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2015 Jul 17. [Epub ahead of print]
6. O'Ryan FS, Lo JC. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure: clinical course and outcomes. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70:1844-1853.
7. Furlaneto FAC, Nunes NLT, Souza RB, Yamamoto KO, Oliveira Filho IL, Frota NPR, Chaves H, Lisboa M, Taba M Jr, Ervolino E, Messoria MR. Local administration of Tiludronic Acid downregulates important mediators involved in periodontal tissue destruction in experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2018 Apr;88:1-9.
8. Dutra BC, Oliveira AMSD, Oliveira PAD, Manzi FR, Cortelli SC, Cota LOM, Costa FO. Effect of 1% sodium alendronate in the non-surgical treatment of periodontal intraosseous defects: a 6-month clinical trial. *J Appl Oral Sci.* 2017 May-Jun;25(3):310-317.
9. Storrer CLM, Deliberador TM, Giovanini AF, Crivellaro V, Zielak JC, Romito GA. Effect of alendronate on the progression of periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: a study in rats. *Clin*

- Oral Investig. 2016 Dec;20(9):2565-2573. doi: 10.1007/s00784-016-1769-4. Epub 2016 Mar 9. PubMed PMID: 26955836.
10. 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 Oct;86(10):1166-75.
 11. Furlaneto FA, Nunes NL, Oliveira Filho IL, Frota NP, Yamamoto KO, Lisboa MR, Ervolino E, Taba M Jr, Rêgo RO, Messoria MR. Effects of locally administered tetracycline acid on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2014 Sep;85(9):1291-301.
 12. Shinoda H, Takeyama S, Suzuki K, Murakami S, Yamada S (2008) Pharmacological topics of bone metabolism: a novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis. *J Pharmacol Sci* 106:555–558.
 13. Cetinkaya BO, Keles GC, Ayas B, Gurgor P. Effects of risedronate on alveolar bone loss and angiogenesis: a stereologic study in rats. *J Periodontol*. 2008 Oct;79(10):1950-61.
 14. Menezes et al., 2005 Menezes AM, Rocha FA, Chaves HV, Carvalho CB, Ribeiro RA, Brito GC (2005) Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 76:1901–1909
 15. Duarte PM, de Assis DR, Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH Jr. Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. *J Periodontol*. 2004 Sep;75(9):1196-202.
 16. Yaffe A, Kollerman R, Bahar H, Binderman I (2003) The influence of alendronate on bone formation and resorption in a rat ectopic bone development model. *J Periodontol* 74:44–50.
 17. Tani-ishi N, Minamida G, Saitoh D, Chieda K, Omuro H, Sugaya A, et al. (2003) Inhibitory effects of incadronate on the progression of rat experimental periodontitis by *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Periodontol* 74:603–609.
 18. Alencar VBM, Bezerra MM, Lima V, Abreu ALC, Brito GAC, Rocha FAC, et al. (2002) Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 73:251–256

19. Mitsuta T, Horiuchi H, Shinoda H. Effects of topical administration of clodronate on alveolar bone resorption in rats with experimental periodontitis. *J Periodontol*. 2002 May;73(5):479-86.
20. O'uchi N, Nishikawa H, Yoshino T, Kanoh H, Motoie H, Nishimori E, Shimaoka T, Abe T, Shikama H, Fujikura T, Matsue M, Matsue I. Inhibitory effects of YM175, a bisphosphonate, on the regression of experimental periodontitis in beagle dogs. *J Periodontal Res*. 1998 May;33(4):196-204. PubMed PMID: 9689615.
21. Shoji K, Horiuchi H, Shinoda H. Inhibitory effects of a bisphosphonate (risedronate) on experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 1995 Jul;30(4):277-84.
22. Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG, Aufdemorte TB, Brunsvold M, Chaves E, Kornman KS, Rodan GA. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontal Res*. 1994 Jan;29(1):35-40.
23. Brunsvold MA, Chaves ES, Kornman KS, Aufdemorte TB, Wood R. Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontol*. 1992 Oct;63(10):825-30.
24. Pradeep AR, Kanoriya D, Singhal S, Garg V, Manohar B, Chatterjee A. Comparative evaluation of subgingivally delivered 1% alendronate versus 1.2% atorvastatin gel in treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Investig Clin Dent*. 2017 Aug;8(3).
25. Pradeep AR, Sharma A, Rao NS, Bajaj P, Naik SB, Kumari M. Local drug delivery of alendronate gel for the treatment of patients with chronic periodontitis with Diabetes Mellitus: a double-masked controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2012;83(10):1322-8.
26. Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2012 Jan;83(1):11-8. A
27. Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel in adjunct to mechanotherapy in the treatment of aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2012 Jan;83(1):19-26. B

28. Goya JA, Paez HA, Mandalunis PM. Effect of topical administration of monosodiumolpadronate on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2006 Jan;77(1):1-6.
29. Lane N, Armitage GC, Loomer P, Hsieh S, Majumdar S, Wang HY. Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo-controlled study. *J Periodontol.* 2005;76(7):1113-22.
30. Grey A, Bolland MJ, Horne A, Mihov B, Gamble G, Reid IR. Duration of antiresorptive activity of zoledronate in postmenopausal women with osteopenia: a randomized, controlled multidose trial. *CMAJ.* 2017 Sep 11;189(36):E1130-E1136.
31. Tan W, Sun J, Zhou L, Li Y, Wu X. Randomized trial comparing efficacies of zoledronate and alendronate for improving bone mineral density and inhibiting bone remodelling in women with post-menopausal osteoporosis. *J Clin Pharm Ther.* 2016 Oct;41(5):519-23.
32. Dempster DW, Roschger P, Misof BM, Zhou H, Paschalis EP, Alam J, Ruff VA, Klaushofer K, Taylor KA. Differential Effects of Teriparatide and Zoledronic Acid on Bone Mineralization Density Distribution at 6 and 24 Months in the SHOTZ Study. *J Bone Miner Res.* 2016 Aug;31(8):1527-35.
33. Soundia A, Hadaya D, Esfandi N, Gkouveris I, Christensen R, Dry SM, Bezouglaia O, Pirih F, Nikitakis N, Aghaloo T, Tetradis S. Zoledronate Impairs Socket Healing after Extraction of Teeth with Experimental Periodontitis. *J Dent Res.* 2018 Mar;97(3):312-320. doi: 10.1177/0022034517732770. Epub 2017 Sep 27.
34. Soundia A, Hadaya D, Esfandi N, Gkouveris I, Christensen R, Dry SM, Bezouglaia O, Pirih F, Nikitakis N, Aghaloo T, Tetradis S. Zoledronate Impairs Socket Healing after Extraction of Teeth with Experimental Periodontitis. *J Dent Res.* 2018 Mar;97(3):312-320. doi: 10.1177/0022034517732770. Epub 2017 Sep 27.
35. Otto S, Pautke C, Martin Jurado O, Nehrbass D, Stoddart MJ, Ehrenfeld M, Zeiter S. Further development of the MRONJ minipig large animal model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017 Sep;45(9):1503-1514. doi: 10.1016/j.jcms.2017.07.002. Epub 2017 Jul 18. PubMed PMID: 28803745.

36. Li CL, LU WW, Seneviratne CJ, Leung WK, RA Zwahlen, Zheng LW. Papel dedoença periodontal na osteonecrose dos maxilares relacionada a bifosfonatosratosovariectomizados. *Implantes orais da Clin Res*. 2016 Jan; 27 (1): 1-6. doi:10.1111 / cl.12502. Epub 2014 Nov 5. PubMed PMID: 25371026.
37. Li CL, Seneviratne CJ, Huo L, Lu WW, Zheng LW. Impact of *Actinomyces naeslundii* on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats with periodontitis. *J Craniomaxillofac Surg*. 2015 Oct;43(8):1662-9. doi:10.1016/j.jcms.2015.07.001. Epub 2015 Jul 14. PubMed PMID: 26293192.
38. 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 Aug;26(8):1871-82.
39. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Jun;5(6):493-506.
40. Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2009 May 21;610(1-3):42-8.
41. El-Mowafy AM, Salem HA, Al-Gayyar MM, El-Mesery ME, El-Azab MF. Evaluation of renal protective effects of the green-tea (EGCG) and red grape resveratrol: role of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Nat Prod Res*. 2011 Apr;25(8):850-6.
42. Lanzilli G, Cottarelli A, Nicotera G, Guida S, Ravagnan G, Fuggetta MP. Anti-inflammatory Effect of Resveratrol and Polydatin by In Vitro IL-17 Modulation. *Inflammation* 2012 Feb;35(1):240-8
43. Feng J, Liu S, Ma S, Zhao J, Zhang W, Qi W, Cao P, Wang Z, Lei W. Protective effects of resveratrol on postmenopausal osteoporosis: regulation of SIRT1-NF- κ B signaling pathway. *Acta BiochimBiophysSin (Shanghai)*. 2014 Dec;46(12):1024-33.
44. Zhao H, Li X, Li N, et al. Long-term resveratrol treatment prevents ovariectomy-induced osteopenia in rats without hyperplastic effects on the uterus. *Br J Nutr*. 2014 Mar 14;111(5):836-46.

45. Guo et al. 2015 Guo DW, Han YX, Cong L, Liang D, Tu GJ. Resveratrol prevents osteoporosis in ovariectomized rats by regulating microRNA-338-3p. *Mol Med Rep*. 2015 Aug;12(2):2098-106.
46. Hao XD, Chang J, Qin BY, et al. Synthesis, estrogenic activity, and anti-osteoporosis effects in ovariectomized rats of resveratrol oligomer derivatives. *Eur J Med Chem*. 2015 Jul 26;102:26-38.
47. Tou JC. Resveratrol supplementation affects bone acquisition and osteoporosis: Pre-clinical evidence toward translational diet therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1852(6):1186-94.
48. Corrêa MG, Pires PR, Ribeiro FV, Pimentel SZ, Cirano FR, Napimoga MH, Casati MZ, Casarin RC. Systemic treatment with resveratrol reduces the progression of experimental periodontitis and arthritis in rats. *Plos One*. 2018 Ahead of print.
49. Ribeiro FV, Pino DS, Franck FC et al. Resveratrol Inhibits Periodontitis-Related Bone Loss in Rats Subjected to Cigarette Smoke Inhalation. *J Periodontol* 2017; 88:788-798.
50. Bhattarai G, Poudel SB, Kook SH, Lee JC. Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis. *Acta Biomater* 2016;29:398-408.
51. Corrêa MG, Pires PR, Ribeiro FV, Pimentel SZ, Casarin RC, Cirano FR, Tenenbaum HT, Casati MZ. Systemic treatment with resveratrol and/or curcumin reduces the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol Res* 2017; 52:201-209.
52. Casati MZ, Algayer C, Cardoso da Cruz G, et al. Resveratrol decreases periodontal breakdown and modulates local levels of cytokines during periodontitis in rats. *J Periodontol* 2013;84:e58–e64.
53. Zhen et al., 2015, Zhen L, Fan DS, Zhang Y, Cao XM, Wang LM. Resveratrol ameliorates experimental periodontitis in diabetic mice through negative regulation of TLR4 signaling. *Acta*
54. Tamaki N, Cristina Orihuela-Campos R, Inagaki Y, Fukui M, Nagata T, Ito HO. Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model. *Free Radic Biol Med* 2014; 75: 222-229.

55. Shuai B, Shen L, Yang Y, Ma C, Zhu R, Xu X. Assessment of the Impact of Zoledronic Acid on Ovariectomized Osteoporosis Model Using Micro-CT Scanning. PLoSOne.
56. Chen H, Xu X, Liu M, Zhang W, Ke HZ, Qin A, Tang T, Lu E. Sclerostin antibody treatment causes greater alveolar crest height and bone mass in an ovariectomized rat model of localized periodontitis. Bone. 2015 Jul;76:141-8.
57. Kim JW, Tatad JC, Landayan ME, Kim SJ, Kim MR. Animal model for medication-related osteonecrosis of the jaw with precedent metabolic bone disease. Bone. 2015 Dec;81:442-8.
58. Oliveira ML, Tosoni GM, Lindsey DH, Mendoza K, Tetradis S, Mallya SM. Assessment of CT numbers in limited and medium field-of-view scans taken using Accuitomo 170 and Veraviewepocs 3De cone-beam computed tomography scanners. ImagingSciDent. 2014;44:279-85.
59. Sevilla RS, Cruz F, Chiu CS, Xue D, Bettano KA, Zhu J, Chakravarthy K, et al. Development and optimization of a high-throughput micro-computed tomography imaging method incorporating a novel analysis technique to evaluate bone mineral density of arthritic joints in a rodent model of collagen induced arthritis. Bone. 2015;73:32-41.
60. Conte et al., 20 Conte A, Ghiraldini B, Casarin RC, et al. Impact of type 2 diabetes on the gene expression of bone-related factors at sites receiving dental implants. Int J Oral Maxillofac Surg 2015; 44: 1302-1308.
61. Robbie-Ryan M, Pacifici R, Weitzmann MN. IL-7 drives T cell-mediated bone loss following ovariectomy. Ann N Y Acad Sci. 2006 Apr;1068:348-51. PubMed PMID:16831936.
62. Pacifici R. Estrogen deficiency, T cells and bone loss. Cell Immunol. 2008 Mar-Apr;252(1-2):68-80. Epub 2007 Sep 20. Review. PubMed PMID: 17888417.
63. Ernst M, Heath JK, Schmid C, Froesch RE, Rodan GA. Evidence for a direct effect of estrogen on bone cells in vitro. J Steroid Biochem. 1989;34(1-6):279-84. Review. PubMed PMID: 2696848.
64. Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Aug 1;88(15):6613-7. PubMed PMID: 1907373; PubMed Central PMCID: PMC52137.

65. Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA, Urry ZL, Chambers TJ. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest*. 2003 Sep;112(6):915-23. PubMed PMID: 12975476; PubMed Central PMCID: PMC193670.
66. Lean JM, Jagger CJ, Kirstein B, Fuller K, Chambers TJ. Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology*. 2005 Feb;146(2):728-35. Epub 2004 Nov 4. PubMed PMID: 15528306.
67. Grassi F, Tyagi AM, Calvert JW, Gambari L, Walker LD, Yu M, Robinson J, Li JY, Lisignoli G, Vaccaro C, Adams J, Pacifici R. Hydrogen Sulfide Is a Novel Regulator of Bone Formation Implicated in the Bone Loss Induced by Estrogen Deficiency. *J Bone Miner Res*. 2016 May;31(5):949-63. doi: 10.1002/jbmr.2757. Epub 2015 Dec 23. PubMed PMID: 26614970; PubMed Central PMCID: PMC4862919.
68. Aboodi GM, Goldberg MB, Glogauer M. Refractory periodontitis population characterized by a hyperactive oral neutrophil phenotype. *J Periodontol* 2011; 82: 726-733.
69. Sakallioğlu U, Aliyev E, Eren Z, Akşimşek G, Keskiner I, Yavuz U. Reactive oxygen species scavenging activity during periodontal mucoperiosteal healing: an experimental study in dogs. *Arch Oral Biol* 2005;50:1040-1046.
70. Kantarci A, Oyaizu K, Van Dyke TE. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74:66-75.
71. Katsuragi H, Ohtake M, Kurasawa I, Saito K. Intracellular production and extracellular release of oxygen radicals by PMNs and oxidative stress on PMNs during phagocytosis of periodontopathic bacteria. *Odontology* 2003;91:13-18.
72. Ambati S, Miller CN, Bass EF, Hohos NM, Hartzell DL, Kelso EW, Trunnell ER, Yang JY, Della-Fera MA, Baile CA, Rayalam S. Synergistic Phytochemicals Fail to Protect Against Ovariectomy Induced Bone Loss in Rats. *J Med Food*. 2018 May 24. doi: 10.1089/jmf.2017.0113. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29792544.

73. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Mary Ann Vasbinder MA. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011 Sep; 50(5): 600–613.
74. Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation*. 2007 Apr; 30(1-2):1-6.
75. Kabashima H, Nagata K, Hashiguchi I, et al. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-4 in gingival crevicular fluid of patients with inflammatory periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 1996; 25:449-55.
76. te Velde AA, Huijbens RJF, Heije K, de Vries JE, Figdor CG. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 β , tumor necrosis factor- α and interleukin-6 by human monocytes. *Blood* 1990; 76:1392–1397.
77. Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor necrosis factor α , interleukin 1 and prostaglandin E₂. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:3803–3807.
78. Vieira JGH. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 1999; 43(6):415-22.
79. Soufi FG, Sheervalilou R, Vardiani M, Khalili M, Alipour MR. Chronic resveratrol administration has beneficial effects in experimental model of type 2 diabetic rats. *Endocr Regul* 2012; 46:83–90.
80. Bhatt SR, Lokhandwala MF, Banday AA. Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2011; 30:258–264

ANEXOS



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada " PAPEL DO RESVERATROL NO CONTROLE DAS ALTERAÇÕES ÓSSEAS ASSOCIADA À OSTEOPOROSE: ESTUDO EM RATAS OVARECTOMIZADAS ", registrada com o nº 094/16, sob responsabilidade de " SUZANA PERES PIMENTAL , ANDRÉIA MANETTA MOLEZ, MARCELO VITALE e RODRIGO SOLER ZAMAI " que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais (CEUA) da UNIP, em reunião de 17 /11 /2016.

Finalidade	Ensino ()	Pesquisa Científica (x)
Vigência de autorização	01/09/2016 A 31/08/2018	
Espécie / linhagem/ raça	RATO ISOGÊNICO	
Nº de animais	50	
Peso / idade		
Sexo		
Origem	BIOTÉRIO -ANILAB	

Juliana Guizi

Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA