

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ODONTOLOGIA BASEADA EM EVIDÊNCIAS

GUIA DE DELINEAMENTO

Discentes: Allícia Silva

Ana Maria Damião

Docentes: Cecy Martins

Hércules Dias

Jesuína Lamartine

Sandro Loretto

Belém - Pará
2026

DIRETRIZES ARRIVE 2.0

As diretrizes ARRIVE (**Pesquisa Animal: Relato de Experimentos *In Vivo***) são uma lista de recomendações para o relato completo e transparente de pesquisas envolvendo animais – maximizando a qualidade e a confiabilidade das pesquisas publicadas e permitindo que outros as examinem, avaliem e reproduzam melhor.



Os 10 itens essenciais		
Estes itens são o mínimo a ser incluído em um manuscrito. Sem estas informações, leitores e revisores não serão capazes de avaliar a confiabilidade dos resultados.		
Desenho do Estudo	1	Para cada experimento, descreva detalhes resumidos do desenho do estudo: a. Os grupos comparados, incluindo o(s) grupo(s) controle. Se um grupo controle não foi usado, isto deve ser justificado. b. A unidade experimental (ex: um único animal, uma ninhada, ou uma gaiola de animais).
Tamanho da amostra	2	a. Especifique o número exato de unidades experimentais alocadas em cada grupo, e o número total em cada experimento. Indique também o número total de animais utilizados. b. Explique como o tamanho da amostra foi definido. Descreva os detalhes do cálculo amostral, caso ele tenha sido realizado.
CrITÉRIOS de inclusão e exclusão	3	a. Descreva quaisquer critérios utilizados para inclusão e exclusão de animais (ou unidades experimentais) durante o experimento, e de dados durante a análise. Especifique se estes critérios foram definidos a priori. Se nenhum critério foi definido, declare explicitamente. b. Para cada grupo experimental, relate quaisquer animais, unidades experimentais ou dados não incluídos na análise e explique por que foram excluídos. Caso não haja exclusões, declare explicitamente. c. Para cada análise, relate o valor exato do n em cada grupo experimental.
Randomização	4	a. Declare se foi utilizada randomização para alocar as unidades experimentais nos grupos controle e tratado. Caso tenha sido, descreva o método utilizado para gerar a sequência de randomização. b. Descreva a estratégia utilizada para minimizar potenciais variáveis de confusão, como a ordem dos tratamentos e medidas ou a localização dos animais/gaiolas no biotério. Se variáveis de confusão não foram controladas, declare explicitamente.
Cegamento	5	Descreva quem estava ciente da alocação das unidades experimentais nos grupos nos diferentes momentos do experimento (durante a alocação, condução do experimento, avaliação dos desfechos e análise de dados).
Desfechos	6	a. Defina claramente todos os desfechos avaliados (ex: morte celular, marcadores moleculares ou mudanças comportamentais). b. Para estudos que testam hipóteses, especifique o desfecho primário, ou seja, o desfecho utilizado para determinar o tamanho da amostra.
Métodos estatísticos	7	a. Descreva em detalhes os métodos estatísticos usados em cada análise, incluindo o software utilizado. b. Descreva quaisquer métodos usados para avaliar se os dados atendem às premissas da abordagem estatística, e o que foi feito caso elas não tenham sido atendidas.
Animais experimentais	8	a. Descreva detalhes apropriados à espécie sobre os animais utilizados, incluindo espécie, linhagem e sublinhagem, sexo, idade ou estágio de desenvolvimento e, caso seja relevante, peso. b. Descreva informações adicionais relevantes sobre a procedência dos animais, estado de saúde/ imunidade, modificações genéticas, genotipagem, e quaisquer procedimentos prévios.
Procedimentos experimentais	9	Para cada grupo experimental, incluindo controles, descreva os procedimentos com detalhes suficientes para permitir que outros os repitam, incluindo: a. O que foi feito, como foi feito e o que foi utilizado. b. Quando e com que frequência. c. Onde (incluindo detalhes de quaisquer períodos de aclimação). d. Por quê (justifique os procedimentos).
Resultados	10	Para cada experimento conduzido, incluindo replicações independentes, relate: a. Estatísticas resumidas/descriptivas para cada grupo experimental, com uma medida de variabilidade quando aplicável (ex: média e desvio-padrão, ou mediana e amplitude). b. Se aplicável, o tamanho de efeito com um intervalo de confiança.

Os itens recomendáveis		
Estes itens complementam os 10 essenciais e adicionam contexto relevante ao estudo. Relatar os itens nos dois conjuntos representa a prática ideal.		
Resumo	11	Inclua um resumo preciso dos objetivos da pesquisa, espécie animal utilizada, linhagem/vraça e sexo, métodos e resultados principais e conclusões do estudo.
Embasamento científico	12	a. Inclua embasamento científico suficiente para compreender a justificativa e o contexto do estudo, e explique a abordagem experimental. b. Explique como a espécie e modelo animal utilizados atendem aos objetivos científicos e, quando aplicável, sua relevância para a biologia humana.
Objetivos	13	Descreva claramente a pergunta e objetivos da pesquisa e, quando apropriado, a(s) hipótese(s) específica(s) sendo testada(s).
Declaração ética	14	Inclua o nome do Comitê de Ética para Uso de Animais ou equivalente que aprovou o uso de animais neste estudo, e quaisquer números de licença ou protocolo (caso aplicável). Caso a aprovação ética não tenha sido solicitada ou concedida, justifique.
Alojamento e manejo	15	Descreva detalhes das condições de alojamento e criação, incluindo qualquer enriquecimento ambiental.
Cuidados com animais e monitoramento	16	a. Descreva quaisquer intervenções ou cuidados tomados nos protocolos experimentais para minimizar dor, sofrimento e angústia. b. Relate qualquer evento adverso esperado ou inesperado. c. Descreva os critérios de ponto final humanitário estabelecidos para o estudo, os sinais monitorados e a frequência de monitoramento. Caso não tenha havido critérios de ponto final humanitário, declare explicitamente.
Interpretação / Implicações científicas	17	a. Interprete os resultados, levando em conta os objetivos e hipóteses do estudo, teorias atuais e outros estudos relevantes na literatura. b. Comente as limitações do estudo, incluindo fontes potenciais de viés, limitações do modelo animal e imprecisões associadas aos resultados.
Aplicabilidade / tradução	18	Comente sobre a probabilidade dos achados deste estudo serem generalizáveis para outras espécies ou condições experimentais, incluindo qualquer relevância para a biologia humana (quando apropriado).
Registro do Protocolo	19	Faça uma declaração indicando se um protocolo (incluindo a pergunta do estudo, principais pontos do desenho experimental e plano de análise) foi preparado antes do estudo e, caso tenha sido, onde foi registrado.
Acesso aos dados	20	Apresente uma declaração descrevendo se e onde os dados do estudo estão disponíveis.
Declaração de interesses	21	a. Declare quaisquer potenciais conflitos de interesse, sejam eles financeiros ou não. Caso não exista nenhum, isso deve ser declarado. b. Liste todas as fontes de financiamento (incluindo o identificador da verba) e o papel do(s) financiador(es) no desenho, análise e relato do estudo.

Diretrizes ARRIVE 2.0: diretrizes atualizadas para relato de pesquisas com animais. Originalmente publicado na *PLOS Biology*, Julho de 2020.



Article

Biological Activity of Copaiba in Damage to the Alveolar Bone in a Model of Periodontitis Induced in Rats

Vinicius Ruan Neves dos Santos ^{1,†} , João Victor da Silva Motta ^{1,†}, Deborah Ribeiro Frazão ¹ ,
Railson de Oliveira Ferreira ¹ , Deiweson Souza-Monteiro ¹ , Daiane Claydes Baia-da-Silva ¹,
Paulo Fernando Santos Mendes ¹ , Leonardo Oliveira Bittencourt ¹ , João Daniel Mendonça de Moura ¹ ,
Osmar Alves Lameira ², Gabriela de Souza Balbinot ³, Fabrício Mezzomo Collares ³ ,
Cassiano Kuchenbecker Rösing ⁴ and Rafael Rodrigues Lima ^{1,*} 

¹ Laboratory of Functional and Structural Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil

² Laboratory of Biotechnology, Embrapa Amazônia Oriental, Belém 66075-110, PA, Brazil

³ Dental Materials Laboratory, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90040-060, RS, Brazil

⁴ Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90040-060, RS, Brazil

* Correspondence: rafalima@ufpa.br

† These authors contributed equally to this work.



Atividade biológica da copaíba em danos ao osso alveolar em um modelo de periodontite induzida em ratos

OBJETIVO DO ESTUDO:

Investigar os efeitos da administração sistêmica de oleorresina de copaíba na periodontite induzida por ligadura em ratos.

A Animal experimentation



Wistar rats♂
N= 21

Control
(n= 7)

Experimental periodontitis
(n= 7)

Experimental periodontitis + Copaiba
oleoresin (n= 7)



Day 1:
Induction of
EP



Day 8:
Beginning of
copaiba gavage



Day 14: Sample
collection

B Sample collection



C Histopathological evaluation



D Microtomographic analysis (micro-CT)



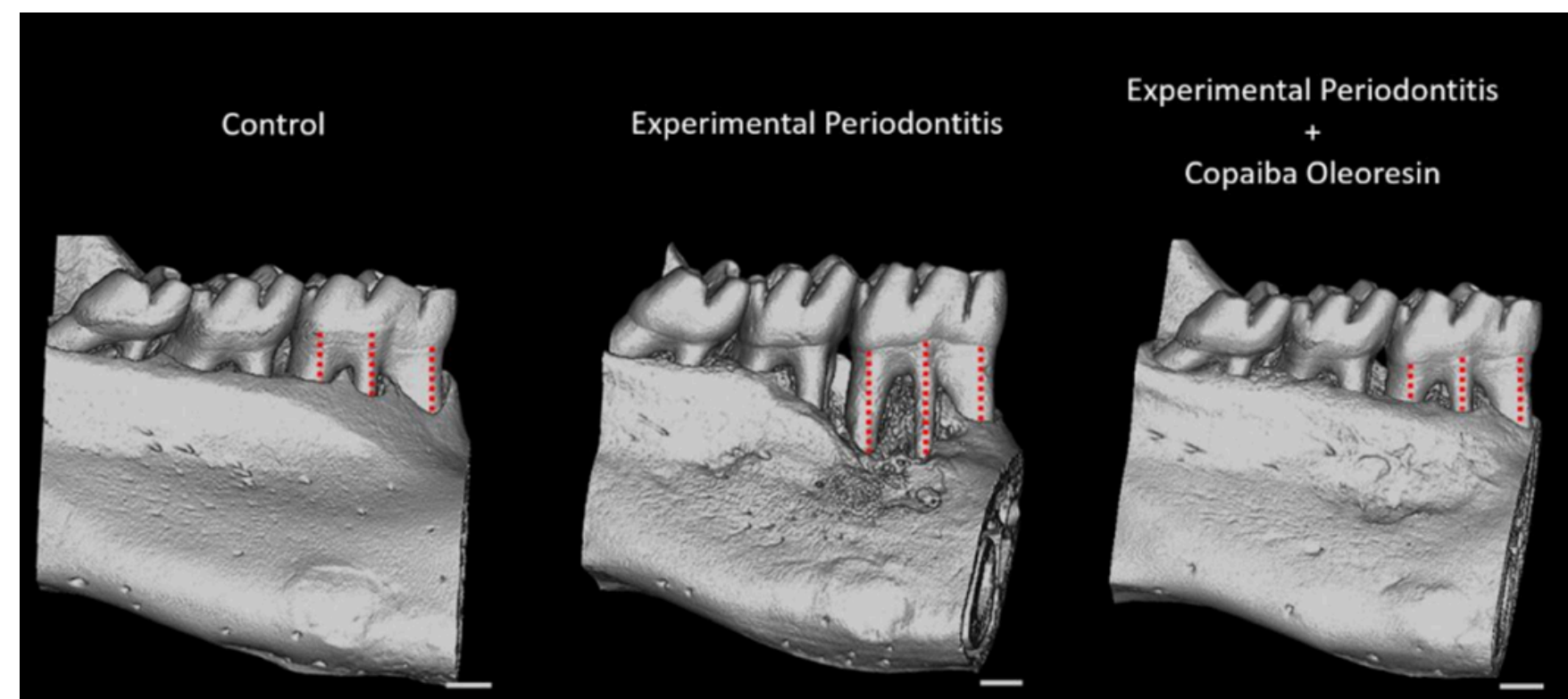
- CEJ-ABC distance
- Trabecular thickness
- Number of trabeculae
- Bone volume fraction

METODOLOGIA:

- 21 ratos adultos foram divididos em 3 grupos (n = 7): grupo controle, grupo de periodontite induzida por ligadura e grupo de periodontite induzida por ligadura tratados com copaiba oleorresina (200 mg/kg/dia);
- A ligadura permaneceu do dia 0 ao 14, e a oleorresina de copaiba foi administrada por gavagem oral nos últimos sete dias;
- No 14º dia, os animais foram eutanasiados e as mandíbulas foram coletadas para avaliação histopatológica e análise por tomografia microcomputadorizada.

RESULTADOS:

- A copaíba reduziu consideravelmente o perfil inflamatório;
- Também limitou a perda óssea alveolar;
- Aumentou a espessura trabecular e a proporção de volume osso-tecido;
- Diminiu o número de trabéculas em comparação com s do grupo de periodontite experiemntal não tratada.



CONCLUSÃO:

A oleorresina de copaíba foi capaz de reduzir o processo inflamatório gerado pela periodontite. Além disso, a administração de oleorresina resultou em menor perda óssea alveolar, mesmo na presença de periodontite.



ITENS ESSENCIAIS

Desenho do Estudo

- 1 Para cada experimento, descreva detalhes resumidos do desenho do estudo:
 - a. Os grupos comparados, incluindo o(s) grupo(s) controle. Se um grupo controle não foi usado, isto deve ser justificado.
 - b. A unidade experimental (ex: um único animal, uma ninhada, ou uma gaiola de animais).

p. A unidade experimental (ex: um único animal, uma ninhada, ou uma gaiola de animais).

4. Materials and Methods**4.1. Animals and Experimental Groups**

This study was approved by the Ethical Committee for the Use of Animals of the Federal University of Pará (UFPA) (No. 2478020320). Twenty-one male *Rattus norvegicus* (Wistar) rats, 60 days old, weighing 150–200 g, were provided by the Federal University of Pará central animal room and randomly divided into three experimental groups ($n = 7$ per group): a control group, an experimental periodontitis group, and an experimental periodontitis group treated with copaiba oleoresin. Animals were maintained under a 12 h light/dark cycle at a controlled temperature (25 ± 1 °C), and received water and food ad libitum.

Foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal do Pará e distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais ($n = 7$ por grupo): um grupo controle, um grupo experimental com periodontite e um grupo experimental com periodontite tratado com oleorresina de copaíba.

Tamanho da amostra

2

- a. Especifique o número exato de unidades experimentais alocadas em cada grupo, e o número total em cada experimento. Indique também o número total de animais utilizados.
-  b. Explique como o tamanho da amostra foi definido. Descreva os detalhes do cálculo amostral, caso ele tenha sido realizado.

4. Materials and Methods

4.1. *Animals and Experimental Groups*

This study was approved by the Ethical Committee for the Use of Animals of the Federal University of Pará (UFPA) (No. 2478020320). Twenty-one male *Rattus norvegicus* (Wistar) rats, 60 days old, weighing 150–200 g, were provided by the Federal University of Pará central animal room and randomly divided into three experimental groups ($n = 7$ per group): a control group, an experimental periodontitis group, and an experimental periodontitis group treated with copaiba oleoresin. Animals were maintained under a 12 h light/dark cycle at a controlled temperature (25 ± 1 °C), and received water and food ad libitum.

Vinte e um ratos machos

($n = 7$ por grupo)

Critérios de inclusão e exclusão

3

- a. Descreva quaisquer critérios utilizados para inclusão e exclusão de animais (ou unidades experimentais) durante o experimento, e de dados durante a análise. Especifique se estes critérios foram definidos a priori. Se nenhum critério foi definido, declare explicitamente.
-  b. Para cada grupo experimental, relate quaisquer animais, unidades experimentais ou dados não incluídos na análise e explique por que foram excluídos. Caso não haja exclusões, declare explicitamente.
- c. Para cada análise, relate o valor exato do n em cada grupo experimental.

c. Para cada análise, relate o valor exato do n em cada grupo experimental.

4. Materials and Methods

4.1. Animals and Experimental Groups

This study was approved by the Ethical Committee for the Use of Animals of the Federal University of Pará (UFPA) (No. 2478020320). Twenty-one male *Rattus norvegicus* (Wistar) rats, 60 days old, weighing 150–200 g, were provided by the Federal University of Pará central animal room and randomly divided into three experimental groups ($n = 7$ per group): a control group, an experimental periodontitis group, and an experimental periodontitis group treated with copaiba oleoresin. Animals were maintained under a 12 h light/dark cycle at a controlled temperature (25 ± 1 °C), and received water and food ad libitum.

Vinte e um ratos machos *Rattus norvegicus* (Wistar), com 60 dias de idade e peso entre 150–200 g e distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais ($n = 7$ por grupo): um grupo controle, um grupo experimental com periodontite e um grupo experimental com periodontite tratado com oleorresina de copaíba.

Randomização	4	a. Declare se foi utilizada randomização para alocar as unidades experimentais nos grupos controle e tratado. Caso tenha sido, descreva o método utilizado para gerar a sequência de randomização. b. Descreva a estratégia utilizada para minimizar potenciais variáveis de confusão, como a ordem dos tratamentos e medidas ou a localização dos animais/gaiolas no biotério. Se variáveis de confusão não foram controladas, declare explicitamente.
---------------------	---	---

4. Materials and Methods

4.1. *Animals and Experimental Groups*

This study was approved by the Ethical Committee for the Use of Animals of the Federal University of Pará (UFPA) (No. 2478020320). Twenty-one male *Rattus norvegicus* (Wistar) rats, 60 days old, weighing 150–200 g, were provided by the Federal University of Pará central animal room and randomly divided into three experimental groups ($n = 7$ per group): a control group, an experimental periodontitis group, and an experimental periodontitis group treated with copaiba oleoresin. Animals were maintained under a 12 h light/dark cycle at a controlled temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), and received water and food ad libitum.

distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais ($n = 7$ por grupo): um grupo controle, um grupo experimental com periodontite e um grupo experimental com periodontite tratado com oleorresina de copaíba. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h, sob temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), e receberam água e alimento ad libitum.

Cegamento

- 5  Descreva quem estava ciente da alocação das unidades experimentais nos grupos nos diferentes momentos do experimento (durante a alocação, condução do experimento, avaliação dos desfechos e análise de dados).

(2026-09-26 15:26:02)

4. Materials and Methods

4.1. *Animals and Experimental Groups*

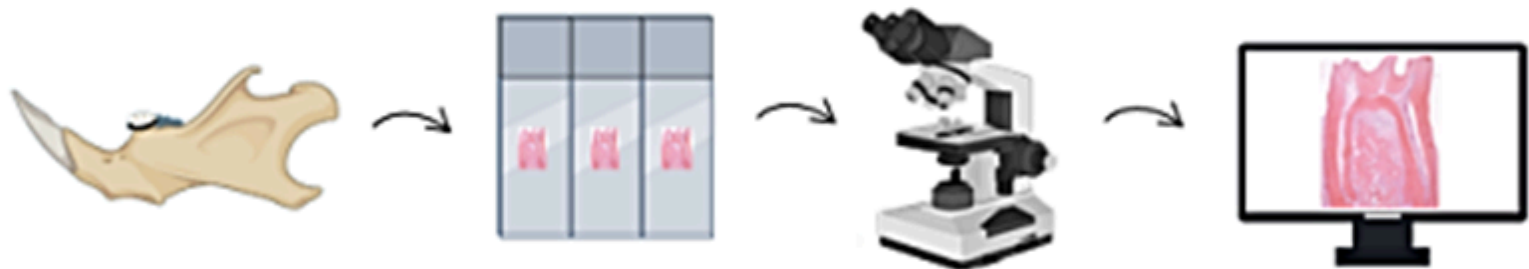
This study was approved by the Ethical Committee for the Use of Animals of the Federal University of Pará (UFPA) (No. 2478020320). Twenty-one male *Rattus norvegicus* (Wistar) rats, 60 days old, weighing 150–200 g, were provided by the Federal University of Pará central animal room and randomly divided into three experimental groups ($n = 7$ per group): a control group, an experimental periodontitis group, and an experimental periodontitis group treated with copaiba oleoresin. Animals were maintained under a 12 h light/dark cycle at a controlled temperature (25 ± 1 °C), and received water and food ad libitum.

- Desfechos**
- 6
- a. Defina claramente todos os desfechos avaliados (ex: morte celular, marcadores moleculares ou mudanças comportamentais).

b. Para estudos que testam hipóteses, especifique o desfecho primário, ou seja, o desfecho utilizado para determinar o tamanho da amostra.

utilizado para determinar o tamanho da amostra.

C Histopathological evaluation



D Microtomographic analysis (micro-CT)



Os desfechos foram amplamente mapeados na metodologia:
perfil inflamatório (análise histopatológica) e parâmetros ósseos no micro-CT (como a distância junção cimento-esmalte ao topo da crista óssea alveolar, espessura trabecular, número de trabéculas e fração de volume ósseo).

Métodos estatísticos

7

- a. Descreva em detalhes os métodos estatísticos usados em cada análise, incluindo o software utilizado.
- b. Descreva quaisquer métodos usados para avaliar se os dados atendem às premissas da abordagem estatística, e o que foi feito caso elas não tenham sido atendidas.

abordagem estatística, e o que foi feito caso elas não tenham sido atendidas.

4.7. *Statistical Analyses*

To test the normality of the data, the statistical Shapiro–Wilk test was performed. One-way ANOVA was then applied, followed by Tukey’s post-test for comparison between groups, allowing a statistical significance level of $p < 0.05$. GraphPad Prism 8.0.2 software (San Diego, CA, USA) was used for all analyses. The data are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

Em seguida, foi aplicada a ANOVA de uma via, seguida pelo teste post-hoc de Tukey para comparação entre os grupos, permitindo um nível de significância estatística de $p < 0,05$. O software GraphPad Prism 8.0.2 (San Diego, CA, EUA) foi utilizado para todas as análises. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Animais experimentais	8	a. Descreva detalhes apropriados à espécie sobre os animais utilizados, incluindo espécie, linhagem e sublinhagem, sexo, idade ou estágio de desenvolvimento e, caso seja relevante, peso. b. Descreva informações adicionais relevantes sobre a procedência dos animais, estado de saúde/ imunidade, modificações genéticas, genotipagem, e quaisquer procedimentos prévios.
-----------------------	---	---

4. Materials and Methods

4.1. Animals and Experimental Groups

This study was approved by the Ethical Committee for the Use of Animals of the Federal University of Pará (UFPA) (No. 2478020320). Twenty-one male *Rattus norvegicus* (Wistar) rats, 60 days old, weighing 150–200 g, were provided by the Federal University of Pará central animal room and randomly divided into three experimental groups ($n = 7$ per group): a control group, an experimental periodontitis group, and an experimental periodontitis group treated with copaiba oleoresin. Animals were maintained under a 12 h light/dark cycle at a controlled temperature ($25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), and received water and food ad libitum.

Ratos machos (sexo) , da espécie *Rattus norvegicus* e linhagem Wistar , com 60 dias de idade , peso corporal entre 150–200 g e provenientes do biotério central da Universidade Federal do Pará.

Procedimentos experimentais

- 9 Para cada grupo experimental, incluindo controles, descreva os procedimentos com detalhes suficientes para permitir que outros os repitam, incluindo:
- a. O que foi feito, como foi feito e o que foi utilizado.
 - b. Quando e com que frequência.
 - c. Onde (incluindo detalhes de quaisquer períodos de aclimatação).
 - d. Por quê (justifique os procedimentos).

4.3. Induction of Experimental Periodontitis and Administration of Copaiba Oleoresin

On the first day of the experiment, all animals were anesthetized with xylazine hydrochloride (8 mg/kg) (Syntec do Brasil LTDA, São Paulo, Brazil) and ketamine hydrochloride (75 mg/kg) (Ceva do Brasil LTDA, São Paulo, Brazil). A cotton thread dressing (Coats, Corrente, São Paulo, Brazil) was placed around the cervical region of the mandibular first molars to induce periodontitis and maintained until euthanasia (14 days) [25]. Animals in the copaiba oleoresin group received 200 mg/kg/day of copaiba oleoresin by gavage from day 7 until 14 of the experimental period. Control animals were only gavaged with distilled water without ligature-induced experimental periodontitis. For bodyweight measurement, all animals were weighed weekly.

No dia 1 ocorreu a indução da periodontite via ligadura. No Dia 8, iniciou-se o protocolo de tratamento via gavage oral com a oleorresina de copaíba na dose de 200mg/kg/dia No Dia 14, realizou-se a eutanásia e a coleta das mandíbulas para processamento.

- Procedimentos experimentais** 9 Para cada grupo experimental, incluindo controles, descreva os procedimentos com detalhes suficientes para permitir que outros os repitam, incluindo:
- a. O que foi feito, como foi feito e o que foi utilizado.
 - b. Quando e com que frequência.
 - c. Onde (incluindo detalhes de quaisquer períodos de aclimação).
 - d. Por quê (justifique os procedimentos).

4.3. Induction of Experimental Periodontitis and Administration of Copaiba Oleoresin

On the first day of the experiment, all animals were anesthetized with xylazine hydrochloride (8 mg/kg) (Syntec do Brasil LTDA, São Paulo, Brazil) and ketamine hydrochloride (75 mg/kg) (Ceva do Brasil LTDA, São Paulo, Brazil). A cotton thread dressing (Coats, Corrente, São Paulo, Brazil) was placed around the cervical region of the mandibular first molars to induce periodontitis and maintained until euthanasia (14 days) [25]. Animals in the copaiba oleoresin group received 200 mg/kg/day of copaiba oleoresin by gavage from day 7 until 14 of the experimental period. Control animals were only gavaged with distilled water without ligature-induced experimental periodontitis. For bodyweight measurement, all animals were weighed weekly.

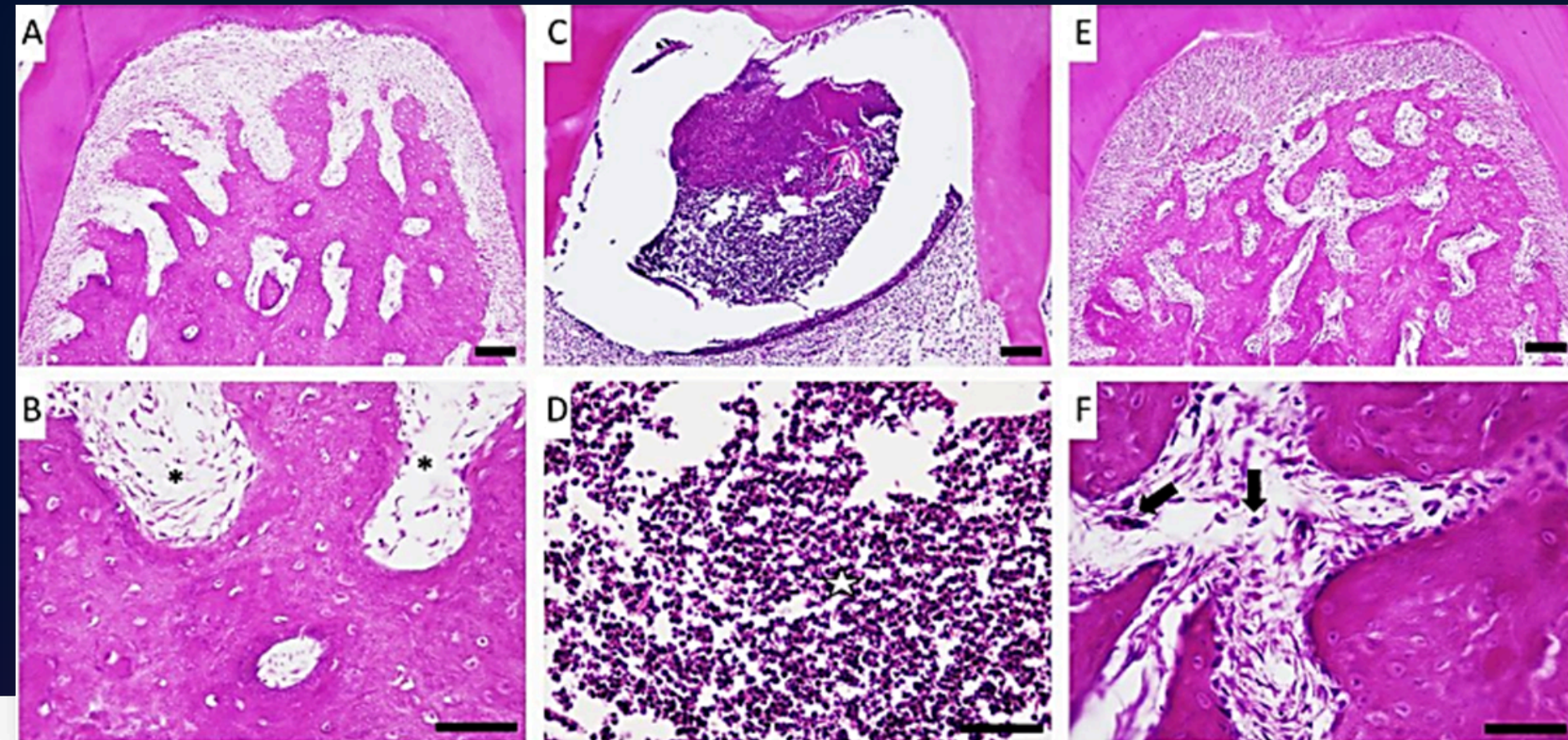
Os animais do grupo controle receberam apenas água destilada por gavagem, sem periodontite experimental induzida por ligadura. Para a medição do peso corporal, todos os animais foram pesados semanalmente.

Resultados

10 Para cada experimento conduzido, incluindo replicações independentes, relate:

- a. Estatísticas resumidas/descritivas para cada grupo experimental, com uma medida de variabilidade quando aplicável (ex: média e desvio-padrão, ou mediana e amplitude).
- b. Se aplicável, o tamanho de efeito com um intervalo de confiança.

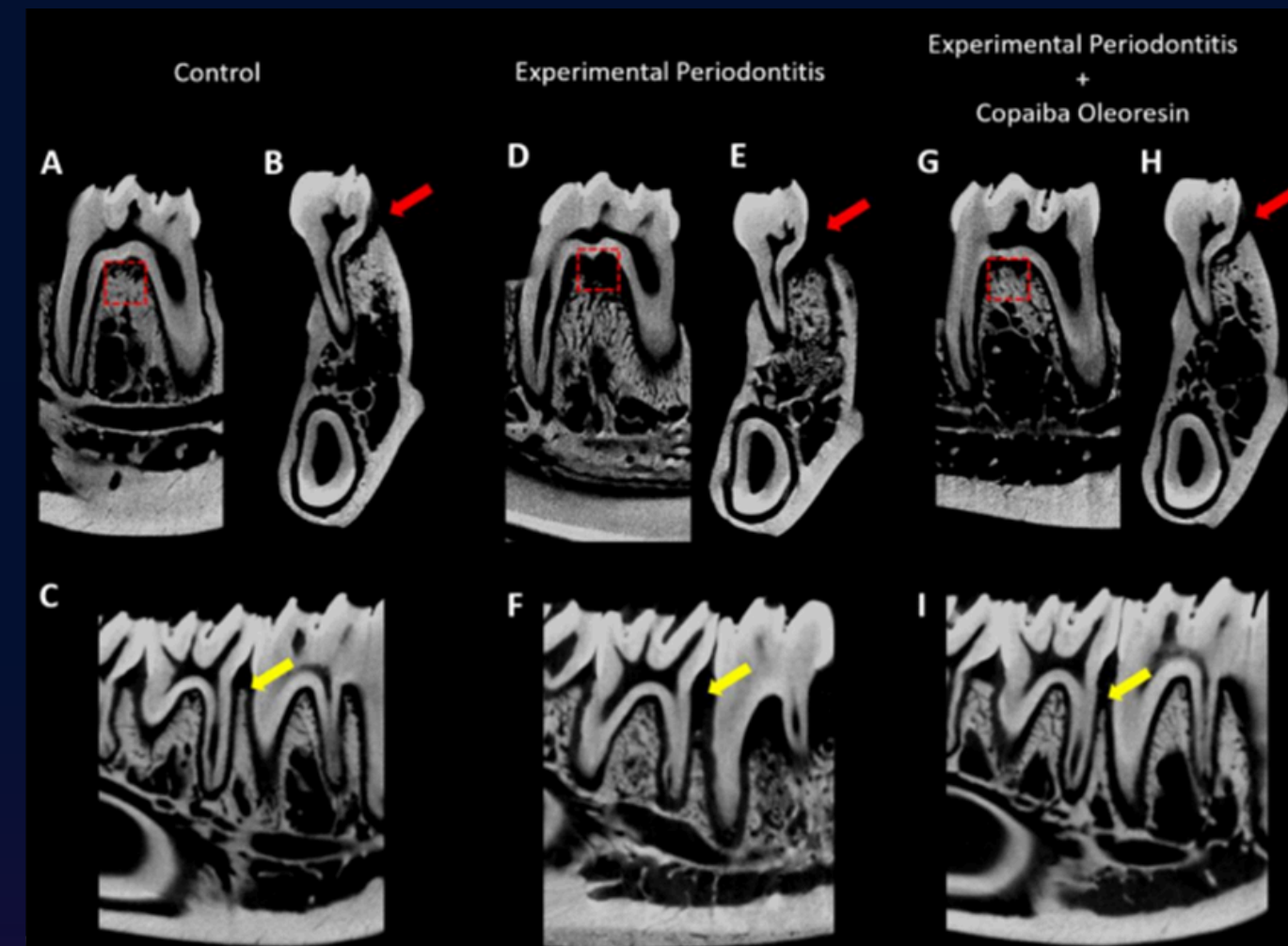
p. Se aplicável, o tamanho de efeito com um intervalo de confiança.



2. Resultados

2.1. A administração do óleo de copaíba reduziu a intensidade da resposta inflamatória e preservou o tecido ósseo

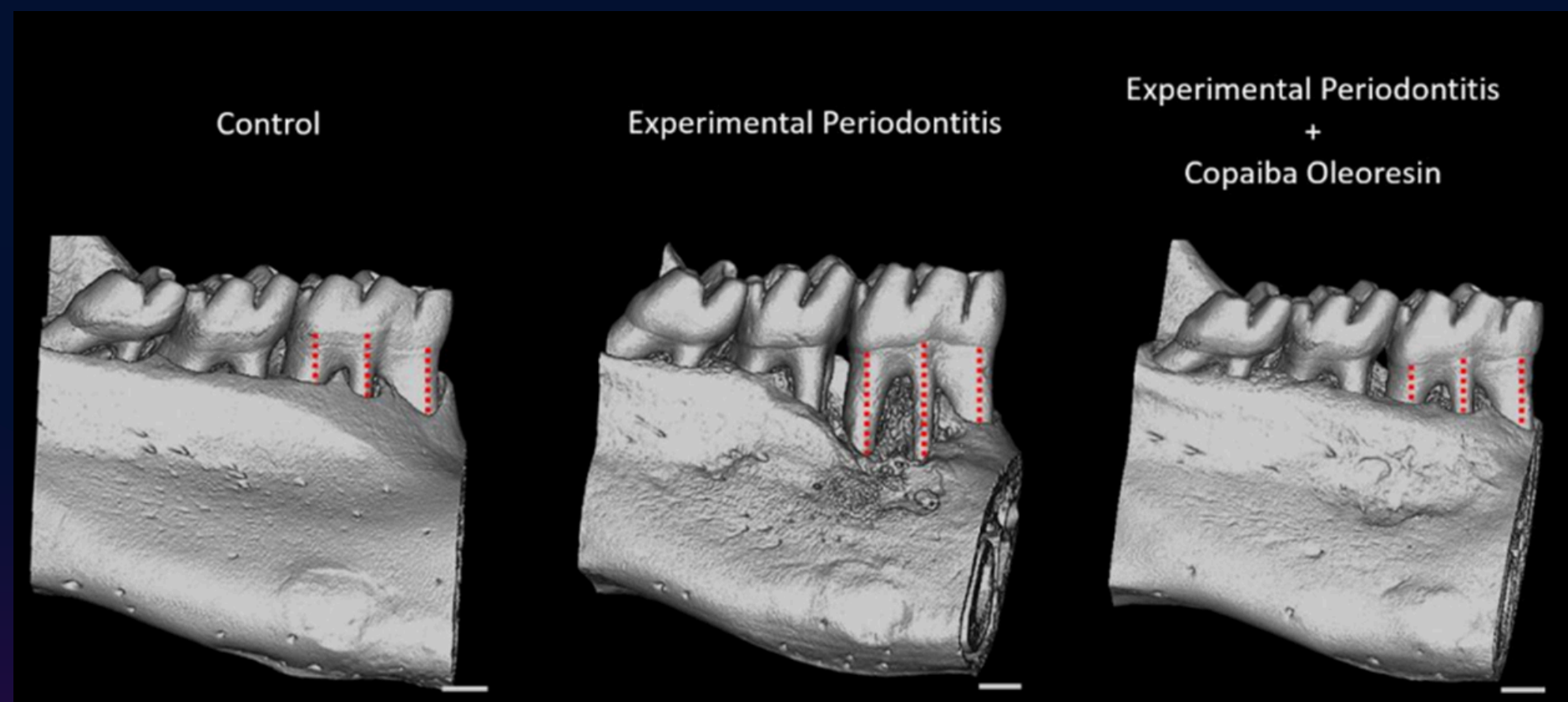
Ao comparar a resposta inflamatória entre o grupo controle (Figura 2A,B) e o grupo de animais com periodontite sem tratamento (Figura 2C,D), detectamos que a aplicação da ligadura por 14 dias poderia causar um intenso processo inflamatório que ainda era evidente no 14º dia pós-lesão, com intenso infiltrado linfocitário associado a um padrão de perda óssea significativa. Quando os animais que receberam tratamento com óleo de copaíba (Figura 2E,F) foram avaliados, observou-se a redução do infiltrado inflamatório e a preservação das trabéculas ósseas.



2.2. Administração de oleorresina de copaíba alterou a qualidade do osso alveolar e reduziu a perda óssea causada pelo modelo de periodontite induzida em ratos

A perda óssea cortical foi mais pronunciada no grupo de periodontite experimental (Figura 3E) do que no grupo controle (Figura 3B), conforme mostrado pelas setas vermelhas na Figura 3. No entanto, no grupo de periodontite experimental tratado com oleorresina de copaíba, o osso cortical foi significativamente preservado (Figura 3H).

Danos à crista óssea alveolar com redução da altura foram observados no grupo periodontite experimental (Figura 3F) quando comparado ao grupo controle (Figura 3C). No grupo tratado, observou-se preservação da altura da crista óssea alveolar (Figura 3I).



Esses achados suportam os resultados da avaliação 3D da perda óssea alveolar (Figura 5). Em comparação com o grupo periodontite experimental, a administração de óleo de copaíba preservou as dimensões verticais do osso alveolar ($1,04 \pm 0,08$ mm vs. $0,80 \pm 0,02$ mm; $p = 0,01$; Figura 4D) ($n = 5$ para cada grupo), conforme ilustrado na Figura 5.

ITENS RECOMENDÁVEIS

Resumo

- 11 Inclua um resumo preciso dos objetivos da pesquisa, espécie animal utilizada, linhagem/raça e sexo, métodos e resultados principais e conclusões do estudo.

Resumo: Vários estudos têm investigado os efeitos de produtos naturais no tratamento de doenças. As populações tradicionais amazônicas costumam usar a copaíba devido às suas propriedades anti-inflamatória, antibacteriana e cicatrizante. Neste estudo, objetivamos investigar os efeitos da administração de oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) na periodontite induzida por ligadura em ratos. Para tanto, 21 ratos adultos foram divididos em três grupos ($n = 7$ cada): um grupo controle, um grupo com periodontite induzida por ligadura e um grupo com periodontite induzida por ligadura tratada com oleorresina copaíba (200 mg/kg/dia). A ligadura permaneceu do dia 0 ao 14, e a oleorresina de copaíba foi administrada por via oral (gavagem) durante os últimos sete dias. No dia 14, os animais foram eutanasiados, e as mandíbulas foram coletadas para avaliação histopatológica e análise por microtomografia computadorizada. Nossos dados mostraram que a administração de copaíba reduziu consideravelmente o perfil inflamatório. Além disso, a oleorresina de copaíba limitou a perda óssea alveolar, aumentou a espessura trabecular e a proporção de volume osso-tecido, e diminuiu o número de trabéculas em comparação com as do grupo de periodontite experimental não tratada. Nossas descobertas fornecem evidências pioneiras que apoiam o potencial da oleorresina de copaíba na redução do dano ósseo alveolar induzido pela periodontite em ratos.

Resumo

- 11 Inclua um resumo preciso dos objetivos da pesquisa, espécie animal utilizada, linhagem/raça e sexo, métodos e resultados principais e conclusões do estudo.

Resumo: Vários estudos têm investigado os efeitos de produtos naturais no tratamento de doenças. As populações tradicionais amazônicas costumam usar a copaíba devido às suas propriedades anti-inflamatória, antibacteriana e cicatrizante. Neste estudo, objetivamos investigar os efeitos da administração de oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) na periodontite induzida por ligadura em ratos. Para tanto, 21 ratos adultos foram divididos em três grupos (n = 7 cada): um grupo controle, um grupo com periodontite induzida por ligadura e um grupo com periodontite induzida por ligadura tratada com oleorresina copaíba (200 mg/kg/dia). A ligadura permaneceu do dia 0 ao 14, e a oleorresina de copaíba foi administrada por via oral (gavagem) durante os últimos sete dias. No dia 14, os animais foram eutanasiados, e as mandíbulas foram coletadas para avaliação histopatológica e análise por microtomografia computadorizada. Nossos dados mostraram que a administração de copaíba reduziu consideravelmente o perfil inflamatório. Além disso, a oleorresina de copaíba limitou a perda óssea alveolar, aumentou a espessura trabecular e a proporção de volume osso-tecido, e diminuiu o número de trabéculas em comparação com as do grupo de periodontite experimental não tratada. Nossas descobertas fornecem evidências pioneiras que apoiam o potencial da oleorresina de copaíba na redução do dano ósseo alveolar induzido pela periodontite em ratos.

Resumo

- 11 Inclua um resumo preciso dos objetivos da pesquisa, espécie animal utilizada, linhagem/raça e sexo, métodos e resultados principais e conclusões do estudo.

Resumo: Vários estudos têm investigado os efeitos de produtos naturais no tratamento de doenças. As populações tradicionais amazônicas costumam usar a copaíba devido às suas propriedades anti-inflamatória, antibacteriana e cicatrizante. Neste estudo, objetivamos investigar os efeitos da administração de oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) na periodontite induzida por ligadura em ratos. Para tanto, 21 ratos adultos foram divididos em três grupos ($n = 7$ cada): um grupo controle, um grupo com periodontite induzida por ligadura e um grupo com periodontite induzida por ligadura tratada com oleorresina copaíba (200 mg/kg/dia). A ligadura permaneceu do dia 0 ao 14, e a oleorresina de copaíba foi administrada por via oral (gavagem) durante os últimos sete dias. No dia 14, os animais foram eutanasiados, e as mandíbulas foram coletadas para avaliação histopatológica e análise por microtomografia computadorizada. Nossos dados mostraram que a administração de copaíba reduziu consideravelmente o perfil inflamatório. Além disso, a oleorresina de copaíba limitou a perda óssea alveolar, aumentou a espessura trabecular e a proporção de volume osso-tecido, e diminuiu o número de trabéculas em comparação com as do grupo de periodontite experimental não tratada. Nossas descobertas fornecem evidências pioneiras que apoiam o potencial da oleorresina de copaíba na redução do dano ósseo alveolar induzido pela periodontite em ratos.

Embasamento científico

- 12
- a. Inclua embasamento científico suficiente para compreender a justificativa e o contexto do estudo, e explique a abordagem experimental.
 - b. Explique como a espécie e modelo animal utilizados atendem aos objetivos científicos e, quando aplicável, sua relevância para a biologia humana.

A oleorresina de copaíba exibe uma variedade de ações biológicas, incluindo atividades anti-inflamatória [2,12,14], antibacteriana [15], antifúngica [16] e larvicida [17]. A aplicação da copaíba na odontologia é uma área de estudo relativamente nova e em constante expansão, e a maioria dos estudos investigaram os efeitos da copaíba em patógenos orais in vitro [11,18–20]. Uma revisão da literatura indicou o potencial da oleorresina de copaíba para o tratamento de patógenos orais [21]. Houve alguma experimentação animal envolvendo os efeitos da oleorresina de copaíba, que demonstrou uma capacidade de reduzir a inflamação e melhorar a cicatrização na mucosa oral de ratos [2,12]. No entanto, ainda não existem estudos sobre seu efeito anti-inflamatório em periodontia.

Embasamento científico

- 12
- a. Inclua embasamento científico suficiente para compreender a justificativa e o contexto do estudo, e explique a abordagem experimental.
 - b. Explique como a espécie e modelo animal utilizados atendem aos objetivos científicos e, quando aplicável, sua relevância para a biologia humana.

O modelo de lesão no osso alveolar de ratos mimetiza os processos que ocorrem durante a periodontite em humanos [25]. A inserção de um fio de seda ou algodão ao redor do primeiro molar forma uma área retentiva de biofilme na qual bactérias envolvidas na patogênese da doença periodontal, como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, podem estar presentes [27]. Devido aos paralelos com a fisiopatologia da periodontite humana adulta, o modelo de periodontite induzida por ligadura em roedores é viável e o método mais utilizado em investigações devido à sua capacidade de gerar perda óssea através de uma condição inflamatória [25,34]. Além disso, os estudos em animais são de extrema importância para aumentar nossa compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença periodontal.

Objetivos

- 13 Descreva claramente a pergunta e objetivos da pesquisa e, quando apropriado, a(s) hipótese(s) específica(s) sendo testada(s).

Our group has shown in previous studies the effects of copaiba oleoresin on traumatic lesions of the oral mucosa of rats and bioactive effects on human dental pulp stem cells [2,12,32,33], which drove us to investigate the effects on other types of aggravation to the oral cavity, such as periodontitis. Therefore, we aimed to investigate the effects of the systemic administration of copaiba oleoresin on the modulation of the inflammatory response and the architecture of the alveolar bone using a ligature-induced periodontitis model in rats. Our hypothesis was that copaiba oleoresin could modulate the immune response, leading to a protective effect and preventing bone destruction.

Dessa forma, nós desejamos investigar os efeitos da administração sistêmica de oleorresina de copaíba na modulação da resposta inflamatório e na arquitetura do osso alveolar usando um modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos. Nossa hipótese era que a oleorresina de copaíba poderia modular a resposta imune, levando a um efeito protetor e impedindo a destruição óssea.

Declaração ética	14	Inclua o nome do Comitê de Ética para Uso de Animais ou equivalente que aprovou o uso de animais neste estudo, e quaisquer números de licença ou protocolo (caso aplicável). Caso a aprovação ética não tenha sido solicitada ou concedida, justifique.
-------------------------	----	---

4. Materials and Methods

4.1. *Animals and Experimental Groups*

This study was approved by the Ethical Committee for the Use of Animals of the Federal University of Pará (UFPA) (No. 2478020320). Twenty-one male *Rattus norvegicus* (Wistar) rats, 60 days old, weighing 150–200 g, were provided by the Federal University of Pará central animal room and randomly divided into three experimental groups ($n = 7$ per group): a control group, an experimental periodontitis group, and an experimental periodontitis group treated with copaiba oleoresin. Animals were maintained under a 12 h light/dark cycle at a controlled temperature (25 ± 1 °C), and received water and food ad libitum.

Alojamento e manejo	15	Descreva detalhes das condições de alojamento e criação, incluindo qualquer enriquecimento ambiental.
----------------------------	----	---

4. Materials and Methods

4.1. *Animals and Experimental Groups*

This study was approved by the Ethical Committee for the Use of Animals of the Federal University of Pará (UFPA) (No. 2478020320). Twenty-one male *Rattus norvegicus* (Wistar) rats, 60 days old, weighing 150–200 g, were provided by the Federal University of Pará central animal room and randomly divided into three experimental groups ($n = 7$ per group): a control group, an experimental periodontitis group, and an experimental periodontitis group treated with copaiba oleoresin. Animals were maintained under a 12 h light/dark cycle at a controlled temperature (25 ± 1 °C), and received water and food ad libitum.

**Cuidados
com animais e
monitoramento**

- 16
- a. Descreva quaisquer intervenções ou cuidados tomados nos protocolos experimentais para minimizar dor, sofrimento e angústia.
 - b. Relate qualquer evento adverso esperado ou inesperado.
 - c. Descreva os critérios de ponto final humanitário estabelecidos para o estudo, os sinais monitorados e a frequência de monitoramento. Caso não tenha havido critérios de ponto final humanitário, declare explicitamente.

4.3. Induction of Experimental Periodontitis and Administration of Copaiba Oleoresin

On the first day of the experiment, all animals were anesthetized with xylazine hydrochloride (8 mg/kg) (Syntec do Brasil LTDA, São Paulo, Brazil) and ketamine hydrochloride (75 mg/kg) (Ceva do Brasil LTDA, São Paulo, Brazil). A cotton thread dressing (Coats, Corrente, São Paulo, Brazil) was placed around the cervical region of the mandibular first molars to induce periodontitis and maintained until euthanasia (14 days) [25]. Animals in the copaiba oleoresin group received 200 mg/kg/day of copaiba oleoresin by gavage from day 7 until 14 of the experimental period. Control animals were only gavaged with distilled water without ligature-induced experimental periodontitis. For bodyweight measurement, all animals were weighed weekly.

TODOS OS ANIMAIS FORAM ANESTESIADOS COM CLORIDRATO DE XILAZINA (8 MG/KG) (SYNTEC DO BRASIL LTDA, SÃO PAULO, BRASIL) E CLORIDRATO DE CETAMINA (75 MG/KG) (CEVA DO BRASIL LTDA, SÃO PAULO, BRASIL).

Cuidados com animais e monitoramento	16	a. Descreva quaisquer intervenções ou cuidados tomados nos protocolos experimentais para minimizar dor, sofrimento e angústia.
		b. Relate qualquer evento adverso esperado ou inesperado.
		c. Descreva os critérios de ponto final humanitário estabelecidos para o estudo, os sinais monitorados e a frequência de monitoramento. Caso não tenha havido critérios de ponto final humanitário, declare explicitamente.

4.4. Sample Collection

After the experimental period, the animals were intraperitoneally anesthetized with xylazine hydrochloride (30 mg/kg) and ketamine hydrochloride (180 mg/kg) to be perfused with 0.9% saline, heparinized, and followed by 4% formaldehyde administered through the heart left ventricle. Then, one hemimandible was post-fixed in 4% formaldehyde in a liquid volume at least 30 times larger than the piece for microcomputed tomography analysis. The other hemimandibles were post-fixed in 10% formaldehyde solution for 24 h and kept for 90 days in 10% ethylenediaminetetraacetic acid solution until processing for histological analysis. The sample description and methodological steps are summarized in Figure 7.

OS ANIMAIS FORAM ANESTESIADOS POR VIA INTRAPERITONEAL COM CLORIDRATO DE XILAZINA (30 MG/KG) E CLORIDRATO DE CETAMINA (180 MG/KG) PARA SEREM PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO SALINA A 0,9%, HEPARINIZADA, SEGUIDA DE FORMALDEÍDO A 4%, ADMINISTRADO ATRAVÉS DO VENTRÍCULO ESQUERDO DO CORAÇÃO.

**Interpretação /
Implicações
científicas**

- 17 a. Interprete os resultados, levando em conta os objetivos e hipóteses do estudo, teorias atuais e outros estudos relevantes na literatura.
-  b. Comente as limitações do estudo, incluindo fontes potenciais de viés, limitações do modelo animal e imprecisões associadas aos resultados.

3. Discussion

In this study, we investigated the use of copaiba oleoresin on the modulation of inflammation and preservation of alveolar bone structure after injury by ligature-induced experimental periodontitis. The results indicated a beneficial effect of exposure to copaiba oleoresin on the occurrence of alveolar bone loss in rats. Mechanisms linked to such results need to be understood. The histopathology evaluation showed an attenuation of the local inflammatory process in experimental periodontitis with copaiba oleoresin administration. In addition, the copaiba oleoresin prevented a reduction in trabecular thickness and reduced the loss of vertical dimensions of the alveolar bone caused by the injury. These findings suggest a potential protective action of copaiba oleoresin against damage caused by periodontitis to the alveolar bone structure. As periodontitis represents an inflammatory condition triggered by dysbiotic biofilms, the inflammatory axis is important for pathogenesis [27]. In this sense, the modulation of the inflammatory process, as demonstrated in the present study, is of interest.

**Aplicabilidade /
tradução**

18

Comente sobre a probabilidade dos achados deste estudo serem generalizáveis para outras espécies ou condições experimentais, incluindo qualquer relevância para a biologia humana (quando apropriado).

Esses achados sugerem uma potencial ação protetora da oleorresina de copaíba contra danos causados pela periodontite à estrutura óssea alveolar. Como a periodontite representa uma condição inflamatória desencadeada por biofilmes disbióticos, o eixo inflamatório é importante para a patogênese [27]. Nesse sentido, a modulação do processo inflamatório, como demonstrado no presente estudo, é de interesse.

Acesso aos dados 20 Apresente uma declaração descrevendo se e onde os dados do estudo estão disponíveis.

Data Availability Statement: All data are available in the article.

Acesso aos dados	20	Apresente uma declaração descrevendo se e onde os dados do estudo estão disponíveis.
------------------	----	--

Data Availability Statement: All data are available in the article.

Declaração de interesses	21	a. Declare quaisquer potenciais conflitos de interesse, sejam eles financeiros ou não. Caso não exista nenhum, isso deve ser declarado. b. Liste todas as fontes de financiamento (incluindo o identificador da verba) e o papel do(s) financiador(es) no desenho, análise e relato do estudo.
--------------------------	----	--

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the study’s design; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Os 10 itens essenciais

Estes itens são o mínimo a ser incluído em um manuscrito. Sem estas informações, leitores e revisores não serão capazes de avaliar a confiabilidade dos resultados.



Desenho do Estudo	1	Para cada experimento, descreva detalhes resumidos do desenho do estudo: a. Os grupos comparados, incluindo o(s) grupo(s) controle. Se um grupo controle não foi usado, isto deve ser justificado. b. A unidade experimental (ex: um único animal, uma ninhada, ou uma gaiola de animais).
--------------------------	---	--



Tamanho da amostra	2	a. Especifique o número exato de unidades experimentais alocadas em cada grupo, e o número total em cada experimento. Indique também o número total de animais utilizados. b. Explique como o tamanho da amostra foi definido. Descreva os detalhes do cálculo amostral, caso ele tenha sido realizado.
---------------------------	---	--



Critérios de inclusão e exclusão	3	a. Descreva quaisquer critérios utilizados para inclusão e exclusão de animais (ou unidades experimentais) durante o experimento, e de dados durante a análise. Especifique se estes critérios foram definidos a priori. Se nenhum critério foi definido, declare explicitamente. b. Para cada grupo experimental, relate quaisquer animais, unidades experimentais ou dados não incluídos na análise e explique por que foram excluídos. Caso não haja exclusões, declare explicitamente. c. Para cada análise, relate o valor exato do n em cada grupo experimental.
---	---	--



Randomização	4	a. Declare se foi utilizada randomização para alocar as unidades experimentais nos grupos controle e tratado. Caso tenha sido, descreva o método utilizado para gerar a sequência de randomização. b. Descreva a estratégia utilizada para minimizar potenciais variáveis de confusão, como a ordem dos tratamentos e medidas ou a localização dos animais/gaiolas no biotério. Se variáveis de confusão não foram controladas, declare explicitamente.
---------------------	---	--



Cegamento	5	Descreva quem estava ciente da alocação das unidades experimentais nos grupos nos diferentes momentos do experimento (durante a alocação, condução do experimento, avaliação dos desfechos e análise de dados).
------------------	---	---



Desfechos	6	a. Defina claramente todos os desfechos avaliados (ex: morte celular, marcadores moleculares ou mudanças comportamentais). b. Para estudos que testam hipóteses, especifique o desfecho primário, ou seja, o desfecho utilizado para determinar o tamanho da amostra.
------------------	---	--



Métodos estatísticos	7	a. Descreva em detalhes os métodos estatísticos usados em cada análise, incluindo o software utilizado. b. Descreva quaisquer métodos usados para avaliar se os dados atendem às premissas da abordagem estatística, e o que foi feito caso elas não tenham sido atendidas.
-----------------------------	---	--



Animais experimentais	8	a. Descreva detalhes apropriados à espécie sobre os animais utilizados, incluindo espécie, linhagem e sublinhagem, sexo, idade ou estágio de desenvolvimento e, caso seja relevante, peso. b. Descreva informações adicionais relevantes sobre a procedência dos animais, estado de saúde/ imunidade, modificações genéticas, genotipagem, e quaisquer procedimentos prévios.
------------------------------	---	--



Procedimentos experimentais	9	Para cada grupo experimental, incluindo controles, descreva os procedimentos com detalhes suficientes para permitir que outros os repitam, incluindo: a. O que foi feito, como foi feito e o que foi utilizado. b. Quando e com que frequência. c. Onde (incluindo detalhes de quaisquer períodos de aclimação). d. Por quê (justifique os procedimentos).
------------------------------------	---	--



Resultados	10	Para cada experimento conduzido, incluindo replicações independentes, relate: a. Estatísticas resumidas/descritivas para cada grupo experimental, com uma medida de variabilidade quando aplicável (ex: média e desvio-padrão, ou mediana e amplitude). b. Se aplicável, o tamanho de efeito com um intervalo de confiança.
-------------------	----	---

Os itens recomendáveis

Estes itens complementam os 10 essenciais e adicionam contexto relevante ao estudo. Relatar os itens nos dois conjuntos representa a prática ideal.

Resumo	11	Inclua um resumo preciso dos objetivos da pesquisa, espécie animal utilizada, linhagem/raça e sexo, métodos e resultados principais e conclusões do estudo.
---------------	----	---

Embasamento científico	12	a. Inclua embasamento científico suficiente para compreender a justificativa e o contexto do estudo, e explique a abordagem experimental. b. Explique como a espécie e modelo animal utilizados atendem aos objetivos científicos e, quando aplicável, sua relevância para a biologia humana.
-------------------------------	----	--

Objetivos	13	Descreva claramente a pergunta e objetivos da pesquisa e, quando apropriado, a(s) hipótese(s) específica(s) sendo testada(s).
------------------	----	---

Declaração ética	14	Inclua o nome do Comitê de Ética para Uso de Animais ou equivalente que aprovou o uso de animais neste estudo, e quaisquer números de licença ou protocolo (caso aplicável). Caso a aprovação ética não tenha sido solicitada ou concedida, justifique.
-------------------------	----	---

Alojamento e manejo	15	Descreva detalhes das condições de alojamento e criação, incluindo qualquer enriquecimento ambiental.
----------------------------	----	---

Cuidados com animais e monitoramento	16	a. Descreva quaisquer intervenções ou cuidados tomados nos protocolos experimentais para minimizar dor, sofrimento e angústia. b. Relate qualquer evento adverso esperado ou inesperado. c. Descreva os critérios de ponto final humanitário estabelecidos para o estudo, os sinais monitorados e a frequência de monitoramento. Caso não tenha havido critérios de ponto final humanitário, declare explicitamente.
---	----	--

Interpretação / Implicações científicas	17	a. Interprete os resultados, levando em conta os objetivos e hipóteses do estudo, teorias atuais e outros estudos relevantes na literatura. b. Comente as limitações do estudo, incluindo fontes potenciais de viés, limitações do modelo animal e imprecisões associadas aos resultados.
--	----	--

Aplicabilidade / tradução	18	Comente sobre a probabilidade dos achados deste estudo serem generalizáveis para outras espécies ou condições experimentais, incluindo qualquer relevância para a biologia humana (quando apropriado).
----------------------------------	----	--

Registro do Protocolo	19	Faça uma declaração indicando se um protocolo (incluindo a pergunta do estudo, principais pontos do desenho experimental e plano de análise) foi preparado antes do estudo e, caso tenha sido, onde foi registrado.
------------------------------	----	---

Acesso aos dados	20	Apresente uma declaração descrevendo se e onde os dados do estudo estão disponíveis.
-------------------------	----	--

Declaração de interesses	21	a. Declare quaisquer potenciais conflitos de interesse, sejam eles financeiros ou não. Caso não exista nenhum, isso deve ser declarado. b. Liste todas as fontes de financiamento (incluindo o identificador da verba) e o papel do(s) financiador(es) no desenho, análise e relato do estudo.
---------------------------------	----	---



Diretrizes ARRIVE 2.0: diretrizes atualizadas para relato de pesquisas com animais. Originalmente publicado na *PLOS Biology*, Julho de 2020.



REFERÊNCIAS



Diretrizes ARRIVE 2.0

Pesquisa com animais: relato de
experimentos in vivo

REFERÊNCIAS



ARTIGO

Atividade Biológica da Copaíba no
Dano ao Osso Alveolar em um
Modelo de Periodontite Induzida em
Ratos

Obrigada!