

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA



Fred Lucas Pinto Oliveira

***“Alendronato de Sódio como terapia
coadjuvante no tratamento da periodontite
experimental em ratos submetidos a
quimioterapia com 5-fluorouracil”***

ARAÇATUBA – SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA



Fred Lucas Pinto Oliveira

***“Alendronato de Sódio como terapia
coadjuvante no tratamento da periodontite
experimental em ratos submetidos a
quimioterapia com 5-fluorouracil”***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, para a obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de Periodontia).

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Edilson Ervolino

ARAÇATUBA – SP

2018

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

O48a Oliveira, Fred Lucas Pinto.
Alendronato de Sódio como terapia coadjuvante no tratamento da periodontite experimental em ratos submetidos a quimioterapia com 5-fluorouracil / Fred Lucas Pinto Oliveira. – Araçatuba, 2018
79 f. : il.; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Juliano Milanezi de Almeida
Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Periodontite 2. Tratamento farmacológico 3. Ratos
4. Alendronato I. T.

Black D6
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dados curriculares

Fred Lucas Pinto Oliveira

Nascimento: 19.04.1988 Tupã/SP

Filiação: Eunice Moura Pinto
Fernando Alves Oliveira

2003-2005: Curso Técnico em Música – Piano
Conservatório Musical Villa-Lobos – Tupã/SP

2007-2008: Curso Técnico em Radiologia Médica
Diretriz Educacional – Marília/SP

2011-2015: Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Estadual Paulista - UNESP

A Deus

Neste momento agradeço esta conquista à Deus, que me deu força e persistência para ultrapassar todos os obstáculos encontrados, iluminando meu caminho em todos os momentos e colocando pessoas ao meu lado, não permitindo que eu desistisse desta longa caminhada.

Cada dia é um recomeço, é um renascimento. Cada dia de vida merece ser celebrado e vivido com alegria, com motivação. Pois todos os dias temos a chance de ser felizes, e ser feliz é uma escolha.

“As pessoas felizes lembram o passado com gratidão, alegram-se com o presente e encaram o futuro sem medo.”

Epicuro

Aos Meus Pais e Aos Meus Familiares

Este trabalho é dedicado as pessoas que estiveram ao meu lado ao longo de toda vida:

*À minha mãe **Eunice**, meus irmãos **Fernando Jr.** e **Gabriella**, por toda ajuda, suporte para a vida, contribuindo para minha a formação pessoal e profissional.*

*Aos meus avós, **Maria de Moura** e **Arnaldo Pinto** (in memoriam), meus exemplos de caráter e dignidade. O Sr. faz muita falta vô.*

*Aos meus tios, **Carlos** e **Edilene**, **Waldir** e **Maria**, **Walter** e **Madalena**, por terem me apoiado e financiado mais este sonho meu, agradeço por todas orações, conversas e conselhos encorajadores e suporte que me deram. Se não fosse vocês, não conseguiria realizar mais um sonho.*

Agradeço todo carinho e força que me deram em todo momento que estive fora, se não fossem vocês, seria tudo mais difícil.

Obrigado por caminharem ao meu lado!

Ao meu orientador *Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida*, serei sempre grato pela oportunidade que me proporcionou em ser seu orientado. Tudo começou com um simples convite para fazer Iniciação científica, e hoje estamos alcançando algo maior. Obrigado por sua dedicação, atenção, paciência e disposição no decorrer deste tempo, espero um dia ser bem calmo como Sr. (risos). Me sinto orgulhoso em ser seu orientado e muito privilegiado em acompanhar seus ensinamentos tanto em sala de aula quanto nas clínicas. Obrigado por seus conselhos nos momentos difíceis, por me ajudar a se tornar um profissional melhor e por participar comigo das minhas conquistas. O Sr. é uma pessoa ímpar.

Ao meu coorientador *Prof. Dr. Edilson Ervolino* agradeço por me auxiliar durante esta caminhada. O senhor foi meu primeiro exemplo de professor a ser “copiado” quando entrei na faculdade, sua excelente didática, e paixão pelo que faz é de se admirar. Obrigado por sua disposição, carinho e atenção em nossos trabalhos, mesmo quando que nos deixava esperando por algum tempo (risos), pelas poucas conversas que tivemos, mas que foram suficientes para me ajudar a tomar algumas decisões na vida. Agradeço pela oportunidade e por ter contribuído para minha formação e para este momento se tornar realidade!

À *Prof^{ta}. Dr^a. Maria José Hitomi Nagata*, lembro daquela primeira aula de Periodontia na graduação, onde a senhora falava que a Periodontia era a “base” de todas as demais áreas da Odontologia, foi o suficiente pra despertar em mim o interesse pela disciplina. Passaram-se os anos e a minha admiração pela excelente professora, conhecedora da ciência, mulher de fibra, dotada de um conhecimento científico impecável, só aumentou. Agradeço pela oportunidade de compartilhar das clínicas da graduação com a senhora, foram momentos de intenso aprendizado. Muito obrigado por toda paciência e dedicação comigo nestes anos, mesmo com minhas limitações. Serei sempre um grande admirador de seu trabalho e de sua competência.

À *Prof.^a Dr.^a Paula Lazilha Faleiros*, nossa querida “Paulinha”, agradeço por me ajudar sempre que precisei. Sempre lembrarei da minha primeira apresentação em um Congresso Científico, onde você ficou lá, pertinho, só me acompanhando e me apoiando durante a apresentação. São detalhes que fazem a diferença. Obrigado por todas as conversas sobre a vida, a pós-graduação, pelos puxões de orelhas, pelas risadas e orientações nos trabalhos, hoje tenho certeza que tudo colaborou para minha formação. Você me ensinou muitas coisas e me ajudou muito desde o início. Admiro sua autenticidade. Você é uma pessoa dedicada, talentosa, gentil, além de uma grande amiga.

À *Prof.^a Dr.^a Letícia Helena Theodoro*, agradeço pelos ensinamentos transmitidos em suas aulas e conversas. Exemplo de professora e pesquisadora, prática, objetiva e extremamente competente. Obrigado pelo convívio agradável. É sempre um prazer estar em sua companhia!

Ao *Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia*, que sempre chegava no departamento com um sorriso no rosto, perguntava como estávamos, e dizia que eu só sairia dali casado e com Doutorado (risos). Que privilégio ter o senhor conosco durante estes anos, obrigado por todo apoio, ensinamentos, conversas. Admiro demais sua dedicação para com a pesquisa e o crescimento daqueles que estão ao seu redor.

Ao *Prof. Dr. Álvaro Francisco Bosco*, foi um prazer conhecer este grande mestre, uma pessoa fantástica que nos ensina com maestria e de forma humilde. Cada vez que via o senhor operando minha vontade de aprender só amentava. Agradeço por compartilhar conosco seus ensinamentos nas clínicas de periodontia.

“O discípulo não está acima do seu mestre; todo aquele, porém, que for bem instruído será como o seu mestre.” **(Lucas 6:40)**

Ao amigo **Breno**, agradeço por sua amizade, pelas parcerias nos laboratórios e clínicas, pelas dicas nas cirurgias, nos trabalhos com os animais, pelas muitas risadas e companheirismo sempre. Foi um prazer ter compartilhado a Pós-graduação contigo.

Ao amigo **David**, que chegou de mansinho mas já conquistou seu espaço e sei que tem muito mais à conquistar, uma pessoa humilde e de coração enorme. Agradeço pela amizade, pelas muitas brincadeiras, pelo suporte em todos nossos trabalhos, por ser sempre prestativo em ajudar em tudo, portador de um carisma sem igual. Te admiro demais meu amigo.

Ao meu amigo **Henrique Rinaldi Matheus**, sempre prestativo, talentoso, detalhista no que faz, sempre me socorrendo em tudo e pronto para os “rolês (risos). Obrigado por sua amizade, você é uma pessoa muito especial, te admiro muito nosso menino de ouro. Você é um grande irmão.

Ao meu grande amigo **João Martins de Mello Neto**, meu amigo de graduação, de pós-graduação, que me aturou por dois anos dividindo o mesmo teto (risos), garoto fantástico, talentoso e brilhante. Admiro sua determinação e sua garra em ir atrás dos seus sonhos, mesmo quando as coisas parecem estar contrárias. Você vai longe meu amigo, o mundo é de quem se arrisca. Agradeço por sua amizade e torço por seu sucesso.

À amiga **Nathália Januário de Araujo**, nossa querida Miss (risos). Obrigado por sua amizade, pela cooperação nos trabalhos, disponibilidade e companheirismo sempre que precisei. Foi um prazer conviver contigo nestes anos de Pós-graduação, admiro sua determinação e persistência naquilo que quer. Você com este coração enorme que tem só tem a ganhar e aqueles que estão ao seu redor também. Muito obrigado Nathizita.

À Vivian Cristina Noronha Novaes, agradeço por todo suporte que me deu durante a graduação e na pós-graduação. Obrigado pelas conversas, dicas e parceria nos trabalhos. Sou muito grato por ter me ensinado muitas coisas.

Aos Alunos de iniciação científica Clara e Giovanni, deixo meu muito obrigado de coração, vocês deram conta do recado (risos). Agradeço pelos momentos que precisei e vocês sempre estiveram disponíveis para ajudar, mesmo que fosse num domingo de manhã. Sou muito grato por esse companheirismo e desejo tudo de melhor e muitas conquistas à vocês.

Aos queridos amigos da pós-graduação Natália Campos, Luiz Guilherme, Marta, Marina, Camila, Daniela, Luan, Daniela Sá, Denise, Cecília, Camila Ambrósio, Caio, Eliana e Eduarda, agradeço pelo carinho, conversas, ajudas e agradável convívio! Agradeço pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, pela amizade criada neste período e por participar da vida de vocês.

À todos os professores do mestrado,

Vocês foram importantes e contribuíram muito em todo meu aprendizado e caminhada durante estes anos.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas do Diretor **Prof. Wilson Roberto Poi**, e do senhor Vice-Diretor **Prof. João Eduardo Gomes Filho** por proporcionar a realização desta pesquisa e pelos anos de pós-graduação e crescimento profissional.

A coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do **Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso**.

Aos Funcionários e ex-funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada – **Renato, Marco e Paulo** obrigado pela ajuda e disposição.

A todos os funcionários e estimados amigos da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Cláudio Hideo Matsumoto, Ana Claudia Grieger Manzatti, Luzia Anderlini, Denise Haruyo Nakamura Maeda, Luís Cláudio Sedlacek, Ana Paula Rímoli de Oliveira e Maria Cláudia de Castro Benez**, pela atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Valéria de Queiroz M. Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos, Lilian Sayuri Mada** pelo excelente trabalho, atenção dispensada, grande disposição em atender e ótimo relacionamento.

Aos funcionários e professores do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por sempre me acolherem tão bem.

Aos funcionários do Biotério, **Camilo e Arnaldo** que contribuíram para realização da parte experimental.

Aos professores da Pós Graduação da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, pelos ensinamentos durante todo o decorrer do curso.

Aos pacientes, que nos depositando confiança, deram-nos a oportunidade de aprender.

Finalmente, agradeço à **Deus**, ser superior, por ter me concedido essa oportunidade e ter colocado todas essas pessoas maravilhosas em meu caminho.

OBRIGADO!

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

(Leonardo da Vinci)

Oliveira, FLP. **Alendronato de Sódio como terapia coadjuvante no tratamento da periodontite experimental em ratos submetidos a quimioterapia com 5-fluorouracil.** 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

Objetivo: O presente estudo tem por objetivo avaliar a influência da terapia coadjuvante com Alendronato de Sódio (AS) sobre o tratamento mecânico da periodontite experimental (PE) induzida em ratos submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil (5-FU). **Materiais e Métodos:** 180 ratos machos foram distribuídos em 6 grupos (n=30). Em todos os animais a PE foi induzida nos primeiros molares inferiores, direto (D) e esquerdo (E). SS/ST: animais receberam solução salina 0,9% (SS) intraperitoneal (IP), sem tratamento (ST); SS/RAR/SS: animais receberam SS IP, e após 7 dias da indução da PE, os animais foram submetidos à raspagem e alisamento radicular (RAR) seguido da irrigação subgingival com 1 ml de SS; SS/RAR/AS: animais receberam SS IP, e após 7 dias da indução da PE, os animais foram submetidos à RAR seguido da irrigação subgingival com 1 ml de AS (10^{-5} M); 5-FU/ST: animais receberam 5-FU IP, ST; 5-FU/RAR/SS: animais receberam 5-FU IP e, após 7 dias da indução da PE, os animais foram submetidos à RAR seguido da irrigação subgingival com 1 ml de SS; 5-FU/RAR/AS: animais receberam 5-FU IP, e após 7 dias da indução da PE, os animais foram submetidos à RAR seguido da irrigação subgingival com 1 ml de AS. O quimioterápico foi administrado com intervalo de 48 horas, aplicando-se 60 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente. As eutanásias ocorreram aos 14, 22 e 37 dias após indução da PE. As hemimandíbulas E foram utilizadas para análises histomorfométrica e imunoistoquímicas na região de furca e avaliou-se a porcentagem de osso na furca (POF), características histológicas e análise dos biomarcadores (TRAP e OCN). As

hemimandíbulas D foram destinadas para análise por Microtomografia Computadorizada (Micro-CT) para avaliar a perda óssea alveolar (POA). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($p \leq 0,05$). **Resultados:** Maior POF foi observada no grupo 5-FU/RAR/AS ($62,76\% \pm 12,3$; $67,74\% \pm 13,05$; $61,35\% \pm 15,77$) quando comparado com 5-FU/ST ($31,55\% \pm 13,06$; $34,32\% \pm 15,33$; $47,64\% \pm 11,12$) e 5-FU/RAR/SS ($15,74\% \pm 10,07$; $19,47\% \pm 9,81$; $25,37\% \pm 13,04$) em todos os períodos ($p \leq 0,05$). Maior POA foi observada no grupo 5-FU/ST ($1,4\text{mm} \pm 0,06$; $1,54\text{mm} \pm 0,05$; $1,58\text{mm} \pm 0,09$) em todos os períodos quando comparado aos demais grupos ($p \leq 0,05$). Menor POA foi observada no grupo 5-FU/RAR/AS ($1,32\text{mm} \pm 0,01$; $1,34\text{mm} \pm 0,03$) quando comparado com o grupo 5-FU/RAR/SS ($1,41\text{mm} \pm 0,07$; $1,44\text{mm} \pm 0,07$) aos 22 e 37 dias ($p \leq 0,05$). A análise histopatológica mostrou intenso infiltrado inflamatório nos animais tratados com 5-FU, bem como uma redução na extensão e intensidade do processo inflamatório nos animais tratados com AS. Maior número de células TRAP positivas foi observado no grupo 5-FU/ST ($10,8 \pm 3,9$ células) quando comparado com o grupo SS/ST ($4,8 \pm 2,5$ células) aos 14 dias, e com 5-FU/RAR/SS ($3,6 \pm 2,35$; $5,3 \pm 2,4$; $4,7 \pm 1,9$ células) e 5-FU/RAR/AS ($5,1 \pm 2,25$; $7,2 \pm 2,65$; $4,6 \pm 2,7$ células) em todos os períodos ($p \leq 0,05$). Para OCN, SS/RAR/AS apresentou maior padrão de imunomarcção aos 22 dias quando comparado com os grupos SS/ST e SS/RAR/SS e aos 37 dias quando comparado com o grupo SS/ST ($p \leq 0,05$). **Conclusão:** Assim, dentro dos limites do presente estudo, podemos concluir que o uso tópico de AS coadjuvante à RAR é efetivo no tratamento da PE em ratos submetidos a quimioterapia com 5-FU.

Palavras chaves: Periodontite; Tratamento farmacológico; Alendronato; ratos.

Oliveira, FLP. **Sodium alendronate as adjunctive therapy in the treatment of experimental periodontitis in rats submitted to 5-fluorouracil chemotherapy.** 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

Background: The purpose of the present research is to evaluate the influence of adjuvant therapy with topical sodium alendronate (SA) for the mechanical treatment of experimental periodontitis (EP), induced in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil (5-FU). **Methods:** 180 hundred male rats were divided into 6 groups (n=30). EP was induced in both left (L) and right (R) first mandibular molars of all animals. SS/NT: received saline solution 0.9% intraperitoneally (IP), and no treatment was performed (NT); SS/SRP/SS: received SS IP, and were submitted to scaling and root planning (SRP) and subgingival irrigation with 1ml SS 7 days after induction of EP; SS/SRP/SA: received SS IP, and were submitted to SRP and subgingival irrigation with 1ml SA ($10^{-5}M$) 7 days after induction of EP; 5-FU/ST: received 5-FU IP, NT was performed; 5-FU/SRP/SS: received 5-FU IP, and were submitted to SRP and subgingival irrigation with 1ml SS 7 days after induction of EP; 5-FU/SRP/AS: received 5-FU IP, and were submitted to SRP and subgingival irrigation with 1ml AS 7 days after induction of EP. The antineoplastic was delivered IP with 48 h time interval, 60 mg/kg and 40 mg/kg respectively. The euthanasia were performed at 14, 22 and 37 days after induction of EP. The left hemi mandibles were processed for histomorphometric and immunohistochemical analyzes to evaluate percentage of bone in the furcation (PBF), histopathological aspects and biomarkers evaluation (TRAP and OCN). The R hemi

mandibles were processed for micro-computed tomography to evaluate the alveolar bone loss (ABL). Data were statistically analyzed ($p \leq 0.05$). **Results:** Greater PBF was observed in 5-FU/SRP/SA ($62,76\% \pm 12,3$; $67,74\% \pm 13,05$; $61,35\% \pm 15,77$) when compared with 5-FU/NT ($31,55\% \pm 13,06$; $34,32\% \pm 15,33$; $47,64\% \pm 11,12$) and 5-FU/SRP/SS ($15,74\% \pm 10,07$; $19,47\% \pm 9,81$ $25,37\% \pm 13,04$) in all experimental periods ($p \leq 0.05$). Increased ABL was observed in 5-FU/NT ($1,4\text{mm} \pm 0,06$; $1,54\text{mm} \pm 0,05$; $1,58\text{mm} \pm 0,09$) in all experimental periods compared with the other groups ($p \leq 0.05$). Lower ABL was observed in 5-FU/SRP/SA ($1,32\text{mm} \pm 0,01$; $1,34\text{mm} \pm 0,03$) when compared with 5-FU/SRP/SS ($1,41\text{mm} \pm 0,07$; $1,44\text{mm} \pm 0,07$) at 22 and 37 days ($p \leq 0.05$). The histopathological analysis showed intense inflammatory infiltrate in the animals that received with 5-FU, as well as reduction on extension and intensity of the inflammatory process in the animals treated with AS. Increased number of TRAP-positive cells was observed in 5-FU/NT ($10,8 \pm 3,9$ cells/ mm^2) when compared with SS/NT ($4,8 \pm 2,5$ cells/ mm^2) at 14 days, and 5-FU/RAR/SS ($3,6 \pm 2,35$; $5,3 \pm 2,4$; $4,7 \pm 1,9$ cells/ mm^2) and 5-FU/SRP/SA ($5,1 \pm 2,25$; $7,2 \pm 2,65$; $4,6 \pm 2,7$ cells/ mm^2) in all experimental periods ($p \leq 0.05$). For OCN, SS/SRP/SA showed greater immunolabeling pattern at 22 days when compared with SS/NT and SS/SRP/SS and with SS/NT at 37 days ($p \leq 0.05$). **Conclusion:** within the limits of this study, it can be concluded that topic SA adjuvant to SRP is secure and effective for the treatment of EP in rats subjected to chemotherapy with 5-FU.

Key words: Periodontitis; Pharmacological treatment; Alendronate; rats.

Manuscrito para publicação

Tabela 1	Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos e períodos experimentais.	57
----------	---	----

Manuscripto para publicação

- Figura 1 Gráfico mostrando as médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da porcentagem de osso na furca (POF) dos primeiros molares inferiores esquerdos para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com SS/RAR/SS nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com SS/RAR/AS no mesmo período ($p \leq 0,05$); ‡, diferença estatisticamente significativa com 5-FU/RAR/SS nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$); §, diferença estatisticamente significativa com SS/ST nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$); **, diferença estatisticamente significativa com 5-FU/ST nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). 59
- Figura 2 Análise de micro-CT. (A) Gráfico mostrando as médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da perda óssea alveolar (POA) para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com 5-FU/ST nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com 5-FU/RAR/SS nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). B-M: imagens representativas de micro-CT para análise da POA aos 37 dias em SS/ST (B, C), SS/RAR/SS (D, E), SS/RAR/AS (F, G), 5-FU/ST (H, I), 5-FU/RAR/SS (J, K), 5-FU/RAR/AS (L; M). 60
- Figura 3 Características dos tecidos periodontais na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos aos 14 dias. Abreviações e símbolos: oa: osso alveolar; *, infiltrado inflamatório. A – L: fotomicrografias mostrando as características dos tecidos periodontais 61

aos 14 dias em SS/ST (A, B), SS/RAR/SS (C, D), SS/RAR/AS (E, F), 5-FU/ST (G, H), 5-FU-RAR/SS (I, J), 5-FU/RAR/AS (K, L). A, C, E, G, I e K permitem visão panorâmica dos tecidos periodontais, enquanto B, D, F, H, J e L fornecem visão mais detalhada dos aspectos histopatológicos na região de furca. Coloração: hematoxilina e eosina (HE). Barras de escala: A, C, E, G, I e K 500 μm ; B, D, F, H, J e L 75 μm .

- Figura 4 Características dos tecidos periodontais na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos aos 37 dias. Abreviações e símbolos: oa: osso alveolar; *, infiltrado inflamatório. A – L: fotomicrografias mostrando as características dos tecidos periodontais aos 37 dias em SS/ST (A, B), SS/RAR/SS (C, D), SS/RAR/AS (E, F), 5-FU/ST (G, H), 5-FU-RAR/SS (I, J), 5-FU/RAR/AS (K, L). A, C, E, G, I e K permitem visão panorâmica dos tecidos periodontais, enquanto B, D, F, H, J e L fornecem visão mais detalhada dos aspectos histopatológicos na região de furca. Coloração: hematoxilina e eosina (HE). Barras de escala: A, C, E, G, I e K 500 μm ; B, D, F, H, J e L 75 μm . 62
- Figura 5 Imunomarcção para TRAP na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos. (A) gráfico evidenciando as médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da quantidade de células TRAP-positivas na região de furca para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Abreviações e símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com SS/ST nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com 5-FU/ST nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). (B – G) fotomicrografias mostrando as células TRAP-positivas (cabeças de seta pretas) aos 22 dias nos grupos SS/ST (B), SS/RAR/SS (C), SS/RAR/AS (D), 5-FU/ST (E), 5-FU/RAR/SS (F) e 5-FU/RAR/AS (G). Contra coloração: hematoxilina de Harris. Barras de escala: 25 μm . 63
- Figura 6 Imunomarcção para OCN na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos. (A) gráfico evidenciando as medianas e os desvios interquartílicos dos escores atribuídos à 64

imunomarcção de OCN na região de furca para cada grupo e período. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls. Abreviações e símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com os demais grupos no mesmo período ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com SS/ST e 5-FU/ST no mesmo período ($p \leq 0,05$); (B – G) fotomicrografias mostrando a imunomarcção para OCN (cabeças de seta pretas) aos 37 dias nos grupos SS/ST (B), SS/RAR/SS (C), SS/RAR/AS (D), 5-FU/ST (E), 5-FU/RAR/SS (F) e 5-FU/RAR/AS (G). Contra coloração: hematoxilina de Harris. Barras de escala: 25 μm .

Lista de Abreviaturas e Siglas

5-FU – 5-Fluorouracil

ABL – alveolar bone loss

AF - Área total da furca

ANOVA – Análise de Variância.

AO - Área de tecido ósseo

ARRIVE - Animal Research: Reporting in Vivo Experiments

AS – Alendronato de Sódio

BPs - Bisfosfonatos

D – Direito

DP - Doença Periodontal

E – Esquerdo

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

EP – experimental periodontitis

H.E – Hematoxilina e Eosina

IP – Intraperitoneal

kV – Quilovolt

L- left

M – molar

mA – Miliampère

Micro-CT – Microtomografia Computadorizada

ms - Milissegundo

NT – no treatment

OCN - Osteocalcina

PBF – percentage of bone in the furcation

PE – Periodontite experimental

POF - Porcentagem de Osso na Furca

R- right

RAR – Raspagem e Alisamento Radicular

SA – Sodium Alendronate

SRP – scaling and root planning

SS – Solução Salina

ST – Sem tratamento

TRAP – Fosfatase ácida resistente ao tartarato

µm – Micrometros

Lista de Anexos

Anexo

A Normas de publicação segundo o Periódico “Journal of Periodontology” 65

Anexo

B Certificado da Comitê de Ética na Experimentação Animal (CCEA). 77

Anexo

C Delineamento do estudo. 78

Anexo

D Figura representativa da metodologia adotada para análises histológica histométrica e imunoistoquímica. 78

.

Sumário

Manuscrito para publicação	26
Página de Título	27
Resumo	28
Abstract	30
Introdução	31
Materiais e Métodos	34
Resultados	40
Discussão	43
Conclusão	47
Agradecimentos	48
Referências Bibliográficas	49
Tabela	57
Figuras	59
Anexos	65

Manuscrito para
*Publicação**

* Normatização Segundo a Revista *JOURNAL OF PERIODONTOLOGY* (ANEXO A)

Title

Alendronato de Sódio como terapia coadjuvante no tratamento da periodontite experimental em ratos submetidos a quimioterapia com 5-fluorouracil.

Authors

Fred Lucas Pinto Oliveira, DDS[†], Juliano Milanezi de Almeida, DDS[†], PhD; Edilson Ervolino, DDS, PhD[‡]

Corresponding author: Juliano Milanezi de Almeida

Address: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP:

Rua Jose Bonifácio 1193, Centro.

CEP: 16050-300 Araçatuba, SP, Brasil.

Tel/Fax 55- 1836363239

E-mail: jumilanezi@hotmail.com

Short Running Title: Quimioterápicos e a periodontite experimental.

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

Number of figures: 06

Number de tables: 01

[†] São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba; Department of Surgery and Integrated Clinic - Division of Periodontics.

[‡] São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba; Department of Basic Sciences.

RESUMO

Objetivo: O presente estudo tem por objetivo avaliar a influência da terapia coadjuvante com Alendronato de Sódio (AS) sobre o tratamento mecânico da periodontite experimental (PE) induzida em ratos submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil (5-FU). **Materiais e Métodos:** 180 ratos machos foram distribuídos em 6 grupos (n=30). Em todos os animais a PE foi induzida nos primeiros molares inferiores, direito (D) e esquerdo (E). SS/ST: animais receberam solução salina 0,9% (SS) intraperitoneal (IP), sem tratamento (ST); SS/RAR/SS: animais receberam SS IP, e após 7 dias da indução da PE, os animais foram submetidos à raspagem e alisamento radicular (RAR) seguido da irrigação subgingival com 1 ml de SS; SS/RAR/AS: animais receberam SS IP, e após 7 dias da indução da PE, os animais foram submetidos à RAR seguido da irrigação subgingival com 1 ml de AS (10^{-5} M); 5-FU/ST: animais receberam 5-FU IP, ST; 5-FU/RAR/SS: animais receberam 5-FU IP e, após 7 dias da indução da PE, os animais foram submetidos à RAR seguido da irrigação subgingival com 1 ml de SS; 5-FU/RAR/AS: animais receberam 5-FU IP, e após 7 dias da indução da PE, os animais foram submetidos à RAR seguido da irrigação subgingival com 1 ml de AS. O quimioterápico foi administrado com intervalo de 48 horas, aplicando-se 60 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente. As eutanásias ocorreram aos 14, 22 e 37 dias após indução da PE. As hemimandíbulas E foram utilizadas para análises histomorfométrica e imunoistoquímicas na região de furca e avaliou-se a porcentagem de osso na furca (POF), características histológicas e análise dos biomarcadores (TRAP e OCN). As hemimandíbulas D foram destinadas para análise por Microtomografia Computadorizada (Micro-CT) para avaliar a perda óssea alveolar (POA). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($p \leq 0,05$). **Resultados:** Maior POF foi observada no

grupo 5-FU/RAR/AS (62,76%±12,3; 67,74%±13,05; 61,35%±15,77) quando comparado com 5-FU/ST (31,55%±13,06; 34,32%±15,33; 47,64%±11,12) e 5-FU/RAR/SS (15,74%±10,07; 19,47%±9,81 25,37%±13,04) em todos os períodos ($p \leq 0,05$). Maior POA foi observada no grupo 5-FU/ST (1,4mm±0,06; 1,54mm±0,05; 1,58mm±0,09) em todos os períodos quando comparado aos demais grupos ($p \leq 0,05$). Menor POA foi observada no grupo 5-FU/RAR/AS (1,32mm±0,01; 1,34mm±0,03) quando comparado com o grupo 5-FU/RAR/SS (1,41mm±0,07; 1,44mm±0,07) aos 22 e 37 dias ($p \leq 0,05$). A análise histopatológica mostrou intenso infiltrado inflamatório nos animais tratados com 5-FU, bem como uma redução na extensão e intensidade do processo inflamatório nos animais tratados com AS. Maior número de células TRAP positivas foi observado no grupo 5-FU/ST (10,8±3,9 células) quando comparado com o grupo SS/ST (4,8±2,5 células) aos 14 dias, e com 5-FU/RAR/SS (3,6±2,35; 5,3±2,4; 4,7±1,9 células) e 5-FU/RAR/AS (5,1±2,25; 7,2±2,65; 4,6±2,7 células) em todos os períodos ($p \leq 0,05$). Para OCN, SS/RAR/AS apresentou maior padrão de imunomarcção aos 22 dias quando comparado com os grupos SS/ST e SS/RAR/SS e aos 37 dias quando comparado com o grupo SS/ST ($p \leq 0,05$). **Conclusão:** Assim, dentro dos limites do presente estudo, podemos concluir que o uso tópico de AS coadjuvante à RAR é efetivo no tratamento da PE em ratos submetidos a quimioterapia com 5-FU.

Palavras chaves: Periodontite; Tratamento farmacológico; Alendronato; ratos.

Abstract

Background: The purpose of the present research is to evaluate the influence of adjuvant therapy with topical sodium alendronate (SA) for the mechanical treatment of experimental periodontitis (EP), induced in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil (5-FU). **Methods:** 180 hundred male rats were divided into 6 groups (n=30). EP was induced in both left (L) and right (R) first mandibular molars of all animals. SS/NT: received saline solution 0.9% intraperitoneally (IP), and no treatment was performed (NT); SS/SRP/SS: received SS IP, and were submitted to scaling and root planning (SRP) and subgingival irrigation with 1ml SS 7 days after induction of EP; SS/SRP/SA: received SS IP, and were submitted to SRP and subgingival irrigation with 1ml SA ($10^{-5}M$) 7 days after induction of EP; 5-FU/ST: received 5-FU IP, NT was performed; 5-FU/SRP/SS: received 5-FU IP, and were submitted to SRP and subgingival irrigation with 1ml SS 7 days after induction of EP; 5-FU/SRP/AS: received 5-FU IP, and were submitted to SRP and subgingival irrigation with 1ml AS 7 days after induction of EP. The antineoplastic was delivered IP with 48 h time interval, 60 mg/kg and 40 mg/kg respectively. The euthanasia were performed at 14, 22 and 37 days after induction of EP. The left hemi mandibles were processed for histomorphometric and immunohistochemical analyzes to evaluate percentage of bone in the furcation (PBF), histopathological aspects and biomarkers evaluation (TRAP and OCN). The R hemi mandibles were processed for micro-computed tomography to evaluate the alveolar bone loss (ABL). Data were statistically analyzed ($p \leq 0.05$). **Results:** Greater PBF was observed in 5-FU/SRP/SA ($62,76\% \pm 12,3$; $67,74\% \pm 13,05$; $61,35\% \pm 15,77$) when compared with 5-FU/NT ($31,55\% \pm 13,06$; $34,32\% \pm 15,33$; $47,64\% \pm 11,12$) and 5-FU/SRP/SS ($15,74\% \pm 10,07$; $19,47\% \pm 9,81$ $25,37\% \pm 13,04$) in all experimental periods ($p \leq 0.05$). Increased ABL was observed in 5-FU/NT ($1,4mm \pm 0,06$; $1,54mm \pm 0,05$;

1,58mm±0,09) in all experimental periods compared with the other groups ($p \leq 0.05$). Lower ABL was observed in 5-FU/SRP/SA (1,32mm±0,01; 1,34mm±0,03) when compared with 5-FU/SRP/SS (1,41mm±0,07; 1,44mm±0,07) at 22 and 37 days ($p \leq 0.05$). The histopathological analysis showed intense inflammatory infiltrate in the animals that received with 5-FU, as well as reduction on extension and intensity of the inflammatory process in the animals treated with AS. Increased number of TRAP-positive cells was observed in 5-FU/NT (10,8±3,9 cells/mm²) when compared with SS/NT (4,8±2,5 cells/mm²) at 14 days, and 5-FU/RAR/SS (3,6±2,35; 5,3±2,4; 4,7±1,9 cells/mm²) and 5-FU/SRP/SA (5,1±2,25; 7,2±2,65; 4,6±2,7 cells/mm²) in all experimental periods ($p \leq 0.05$). For OCN, SS/SRP/SA showed greater immunolabeling pattern at 22 days when compared with SS/NT and SS/SRP/SS and with SS/NT at 37 days ($p \leq 0.05$). **Conclusion:** within the limits of this study, it can be concluded that topic SA adjuvant to SRP is secure and effective for the treatment of EP in rats subjected to chemotherapy with 5-FU.

Key words: Periodontitis; Pharmacological treatment; Alendronate; rats.

Introdução

Os tecidos periodontais podem ser afetados por drogas que interagem com a resposta imune e inflamatória do hospedeiro.¹ Por isso, modificações sistêmicas causadas por medicamentos antidepressivos,² benzodiazepínicos,³ imunossuppressores,⁴ contraceptivos orais,⁵ anti-hipertensivos⁶, anticonvulsivantes⁷ e antineoplásicos^{8,9} podem influenciar a progressão da doença periodontal (DP).

A quimioterapia para o tratamento do câncer se baseia na administração de uma dose máxima tolerável do fármaco. Essa modalidade de tratamento está comumente associada com uma variedade de efeitos colaterais, como severa imunossupressão e diminuição da viabilidade e número de células dendríticas.^{10,11} Dentre os diversos quimioterápicos empregados no tratamento de câncer, o 5-FU se destaca por ser uma droga amplamente utilizada.^{12,13} Trata-se de um antimetabólito do tipo análogo da pirimidina, com amplo espectro de ação contra tumores sólidos de cabeça e pescoço, trato gastrointestinal, ovário, fígado, cérebro e mama.¹⁴ O efeito esperado de toxicidade e morte celular é resultado da sua interferência no metabolismo dos nucleosídeos, impedindo a síntese de proteínas e DNA.¹⁴ Por não apresentar ação isolada sobre as células cancerosas, o 5-FU promove efeitos lesivos sobre tecidos normais, especialmente aqueles com alto índice proliferativo.^{15,16} Dessa forma, a cavidade bucal é alvo frequente dos efeitos tóxicos dos agentes antineoplásicos, por apresentar tecidos com rápida divisão celular.^{16,17} No periodonto, o epitélio juncional é responsável pela adesão dentogengival e tem papel fundamental na proteção dos tecidos periodontais.¹⁸ Um dos mecanismos de proteção desempenhado pelo epitélio juncional é decorrente da sua alta taxa de renovação

celular¹⁹, por isso, a ação dos quimioterápicos pode favorecer a penetração e contaminação dos tecidos periodontais de suporte.

Estudos clínicos tem mostrado aumento da inflamação gengival, placa e profundidade de sondagem²⁰⁻²² durante o tratamento quimioterápico, o que pode ser resultado da maior susceptibilidade a infecções decorrente da redução na imunidade desses pacientes.¹⁷

Ogawa et al., 2013²³ constataram que a periodontite ocorreu com maior frequência em pacientes que receberam tratamento quimioterápico. Outros estudos concluíram que o tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes submetidos a quimioterapia é capaz de promover melhoras na condição periodontal,^{24,25} porém com resultados menos favoráveis quando comparados aos pacientes com periodontite e sem câncer.²⁵ Estudos experimentais^{8,9} mostraram que o tratamento sistêmico com 5-FU em animais portadores de PE resultou em maior destruição do osso alveolar na região de furca, maior infiltrado inflamatório e maior padrão de imunomarcção para RANKL.^{8,9} Além disso, foi demonstrado que a RAR isolada não foi capaz de estabelecer adequado processo de reparo no periodonto dos animais que receberam aplicação sistêmica de 5-FU.⁸

O emprego de terapias coadjuvantes à RAR em pacientes comprometidos sistemicamente pode constituir uma alternativa eficaz na otimização do processo de reparo periodontal. A seleção da melhor modalidade terapêutica é baseada no conhecimento dos efeitos deletérios do quimioterápico sobre os tecidos constituintes do periodonto. Além dos seus efeitos sobre a resposta inflamatória, o 5-FU pode bloquear a proliferação de osteoblastos, induzir sua apoptose em placas de crescimento ósseo¹⁸ e afetar o sistema RANK-RANKL-OPG, o que resulta em aumento das células TRAP-positivas,⁸ e, possivelmente, num quadro de mais rápida progressão e maior severidade da DP. Dessa forma, prevenir a perda óssea pode ser um tratamento coadjuvante eficaz à

RAR no tratamento da DP.^{26,27} Nesse contexto, os Bisfosfonatos (BFs) são drogas classificadas como antireabsorbtivas, análogos dos pirofosfatos, que ligam-se fortemente à hidroxiapatita,²⁸ especialmente na superfície de remodelação, inibindo agregação e dissolução.²⁹ São normalmente utilizados na prevenção e tratamento de osteopenia, osteoporose, doença de Paget e hipercalcemia relacionada a malignidades.³⁰

Além dos efeitos positivos do AS na redução da reabsorção óssea em mulheres osteopênicas, aumento da densidade óssea e diminuição da incidência de fratura,³¹ estudos tem demonstrado que o uso sistêmico dos BFs é efetivo na prevenção da perda óssea alveolar na PE.^{26,32-36} Por outro lado, outros estudos reportam que a administração local dos BFs pode conferir a essas drogas maior sucesso terapêutico e melhor controle na sua concentração, regular ou inibir a reabsorção óssea alveolar, e evitar os efeitos indesejáveis associados ao uso sistêmico dos BFs.³⁷⁻³⁹

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar, via análises histométrica, microtomográfica, histológica e imunoistoquímica, os efeitos do uso tópico de AS coadjuvante à RAR no tratamento da PE em ratos submetidos a quimioterapia com 5-FU.

Materiais e Métodos

Animais

Um total de 180 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250 a 300 g foram usados. O protocolo experimental (n° 00319-2016) foi aprovado pela Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP) (Anexo B). Este estudo está em conformidade com o ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments).⁴⁰

PE

Os animais foram anestesiados para todos os procedimentos cirúrgicos por injeção intramuscular com cetamina[§] (70 mg/kg) e xilazina^{**} (6 mg/kg). A PE foi induzida pelo mesmo operador experiente (JMA) pela instalação de um fio de algodão número 24^{††} ao redor dos primeiros molares inferiores direitos e esquerdos de cada rato.⁴¹

Tratamento 5-FU

O tratamento sistêmico consistiu na injeção intraperitoneal de 60 e 40mg/Kg de 5-FU^{‡‡} no dia da colocação da ligadura e 48 h depois, respectivamente.^{9,42}

[§] Vetaset, Fort Dodge, Iowa, EUA

^{**} Coopazine, Coopers, São Paulo, SP, Brasil

^{††} Corrente Algodão n°24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil

^{‡‡} Fluorouracil, 250 mg, Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil

Grupos Experimentais

Sete dias após a indução da PE, a ligadura foi removida e os animais foram separados aleatoriamente nos seguintes grupos (n=30): SS/ST, tratado com SS, sem tratamento; SS/RAR/SS, tratado com SS, com RAR seguido de irrigação com 1ml de SS; SS/RAR/AS, tratado com SS, com RAR seguido de irrigação com 1ml de AS ($10^{-5}M$); 5FU/ST: tratados com 5-FU, sem tratamento; 5FU/RAR/SS: tratados com 5-FU, com RAR seguido de irrigação com 1ml de SS; 5FU/RAR/AS: tratados com 5-FU, com RAR seguido de irrigação com 1ml de AS ($10^{-5}M$).³⁹

RAR

A RAR foi realizada com curetas manuais^{§§} pelo mesmo operador treinado (HRM), utilizando dez movimentos de tração disto-mesial nas faces vestibular e lingual dos molares com PE. As áreas interproximais e de furca foram raspadas usando as mesmas curetas com movimentos de tração cérvico-oclusais.⁴³

Períodos experimentais

Dez animais de cada grupo foram eutanasiados com uma overdose de Tiopental^{***} (150 mg/kg) aos 14, 22 e 37 dias após a indução da PE.

Processamento histológico e imunoistoquímico

As hemimandíbulas foram dissecadas e fixadas em formaldeído a 4% por 48 h. Os espécimes do lado E foram desmineralizados em EDTA a 10%. Cortes semi-seriados (4 µm) foram obtidos em progressão de vestibular para lingual. Cinco cortes equidistantes

^{§§} 1-2 Mini Five curette, Hu-Friedy, Chicago, IL.

^{***} Cristália, Itapira, SP, Brasil.

de cada espécime foi obtido e corado com hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica e histométrica.⁴⁴ Outros seis cortes foram submetidos ao processamento imunohistoquímico. Foi utilizada a técnica de imunoperoxidase indireta, utilizando os anticorpos para TRAP e OCN, seguindo o protocolo descrito por Garcia et al.⁴⁴

Protocolo para aquisição das imagens para Micro-CT

Os espécimes do lado D foram digitalizados por um feixe cônico em um sistema de micro-CT^{†††}, seguindo o protocolo descrito por Messora et al..⁴⁵ O gerador de raio-x foi operado com um potencial acelerado de 50Kv com uma corrente de feixe de 165mA e um tempo de exposição de 650ms/projeção. As imagens foram construídas com um voxel de tamanho 6 x 6 x 6µm. Um software^{‡‡‡} apropriado foi usado para gerar modelos tridimensionais que foram girados em uma posição padrão de acordo com os seguintes critérios: no plano transaxial, o primeiro molar direito teve seu eixo posicionado verticalmente, no plano coronal, o osso mandibular foi orientado verticalmente, com a raiz mesial do primeiro molar na parte superior da imagem e o plano sagital, a superfície oclusal do primeiro molar foi posicionada horizontalmente.

Análise dos Resultados

Determinação das Regiões de Interesse (ROI)

A delimitação das regiões de interesse para cada uma das análises foi estabelecida por um histologista certificado (EE) com base na disposição e relevância dos eventos biológicos no interior da furca seguindo a metodologia descrita por Almeida.⁴⁶

^{†††} SkyScan 1176 Bruker, Aatselaar, Bélgica.

^{‡‡‡} Data Viewer v.1.5.0, Bruker.

ROI 1: região determinada para as análises histométrica e histológica. Corresponde toda a área que compreende o interior da furca, tendo como limite apical uma linha que passa pelo ápice das raízes mesial e distal, e limite coronal o teto da furca (Anexo D).

ROI 2: região determinada para a análise imunoistoquímica. Corresponde ao centro do septo interradicular do primeiro molar inferior esquerdo, compreendendo uma área de 2000µm x 2000µm.⁴⁷ O limite coronário desta área foi a crista óssea alveolar, a partir da qual se estendia apicalmente por uma distância de 2000µm (Anexo D).

Análise histométrica da POF

Um examinador calibrado e desconhecido (FLPO) realizou a análise histométrica. Um sistema de análise de imagem^{§§§}. Dentro da ROI 1 foi mensurada a área total da furca (AF), área de tecido ósseo (AO) e a POF (Calculado de acordo com Garcia et al.)⁸

Análise histológica

Um histologista certificado, calibrado e desconhecido (EE) avaliou através da microscopia óptica de luz, e dentro da ROI 1, os seguintes parâmetros^{41,48}: 1) intensidade da resposta inflamatória local; 2) extensão do processo inflamatório; 3) reabsorção radicular externa (cimento e dentina); 4) reabsorção alveolar; 5) padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca; 6) padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar da região de furca. Para cada parâmetro foi atribuído escore de 0 a 3, sendo “0” o melhor resultado e “3” o pior resultado.

^{§§§} Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany.

Análise Imunoistoquímica

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico^{****} obedecendo os limites determinados para ROI 2. A imunomarcção foi definida como aquela de coloração castanho escuro confinada ao citoplasma em TRAP e confinada ao citoplasma e fracamente à matriz extracelular em OCN. A imunomarcção para TRAP foi avaliada pela contagem de células TRAP-positivas, com um aumento de 200x.⁴⁷ A imunomarcção para OCN foi analisada com um aumento de 400x compreendendo a mesma área determinada para TRAP. Para isso foram atribuídos escores de 0 – 3 correspondentes ao padrão de imunomarcção para OCN, sendo, nesse caso, “0” o pior resultado e “3” o melhor resultado.

Análise em Micro-CT da POA

Medidas lineares da junção cimento esmalte à crista óssea alveolar foram realizadas em quatro locais diferentes: vestibular, lingual, mesial e distal⁴⁵ por um examinador calibrado e desconhecido (FLPO).

Análise Estatística

A análise estatística dos dados coletados foi realizada pelo programa Bioestat 5.0^{†††}. Para a calibração da mensuração da POF foram realizadas três mensurações, as quais foram submetidas ao Teste Kappa. Os dados de POF, POA, TRAP e OCN foram submetidos à análise da normalidade pelo teste de Shapiro Wilk. Para os dados paramétricos (POF, POA e TRAP) foi empregado o teste de Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios e o pós teste de Tukey. Para os dados não paramétricos (OCN)

**** Optiphot-2, Nikon, Japão

††† Bioestat 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil

foi empregado o teste de Kruskal-Wallis e pós teste Student-Newman-Keuls. O nível de significância dos testes foi de $p \leq 0,05$.

Resultados

Análise histométrica da porcentagem de osso na furca (POF)

O teste Kappa indicou alto nível de concordância nas medidas da POF intraexaminador (94%).

Os resultados estão representados pela Figura 1. O grupo 5-FU/RAR/SS apresentou menor POF aos 14 (15,74%±10,07), 22 (19,47%±9,81) e 37 dias (25,37%±13,4) quando comparado ao grupo SS/RAR/SS nos mesmo períodos experimentais (59,56%±11,02, 67,69%±11,44, 67,95%±13,25). O grupo 5-FU/RAR/AS apresentou menor POF aos 37 dias (61,35%±15,77) quando comparado ao grupo SS/RAR/AS no mesmo período experimental (80,86%±3,35). O grupo 5-FU/RAR/AS apresentou maior POF aos 14 (62,76%±12,3), 22(67,74%±13,05) e 37 dias (61,35%±15,77) quando comparado ao grupo 5FU/RAR/SS no mesmos períodos experimentais (15,74%±10,07, 19,47%±9,81, 25,37%±13,4). Os grupos SS/RAR/SS (59,56%±11,02, 67,69%±11,44, 67,95%±13,25), SS/RAR/AS (69,25%±9,77, 77,28%±3,76, 80,86%±3,35) e 5-FU/RAR/AS (62,76%±12,3, 67,74%±13,05, 61,35%±15,77) apresentaram maior POF quando comparado ao grupo SS/ST em todos os períodos experimentais (34,49%±13,79, 34,96%±16,33, 30,99%±15,58). O grupo 5-FU/RAR/AS apresentou maior POF aos 14 (62,76%±12,3), 22(67,74%±13,05) e 37 dias (61,35%±15,77) quando comparado ao grupo 5-FU/ST nos mesmo período experimental (31,55%±13,06, 34,32%±15,33, 47,64%±11,12).

Análise por micro-CT da POA

Os resultados da análise da POA estão apresentados na Figura 2. O grupo 5-FU/ST apresentou maior POA aos 14(1,40mm±0,05) 22(1,54mm±0,04) e 37dias (1,58mm±0,08)

quando comparado aos demais grupos. O grupo 5-FU/RAR/AS apresentou maior POA aos 14(1,32mm±0,06), 22(1,32mm±0,01) e 37dias (1,34mm±0,03) quando comparado ao grupo 5-FU/RAR/SS nos mesmos períodos experimentais.

Análise Histológica

A severidade da PE foi maior no grupo 5-FU/ST, o qual apresentou maior magnitude da resposta inflamatória local e comprometimento progressivo dos tecidos periodontais quando comparado com o grupo SS/ST. Tanto no grupo que recebeu veículo (SS/RAR/SS) quanto no grupo que recebeu 5-FU (5-FU/RAR/SS), o tratamento com RAR resultou em menor comprometimento tecidual ao longo dos períodos experimentais quando comparado com os grupos que não receberam tratamento (SS/ST e 5-FU/ST), embora a resposta reparativa tecidual do grupo que recebeu 5-FU tenha sido mais discreta. O emprego do AS e RAR melhorou os parâmetros inflamatórios e exerceu efeitos positivos sobre o processo de reparação tecidual ao longo dos períodos experimentais tanto no grupo SS/RAR/AS quanto no grupo 5-FU/RAR/AS, todavia, os efeitos neste último foram mais discretos (Figura 3) (Figura 4). Os parâmetros, escores, distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais em SS/ST, SS/RAR/SS, SS/RAR/AS, 5-FU/ST, 5-FU/RAR/SS e 5-FU/RAR/AS nos diferentes períodos experimentais estão apresentados na Tabela 1.

Análise imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica usada para detecção de TRAP e OCN mostrou alta especificidade para essas proteínas, confirmada pela completa ausência de marcação no controle negativo. O grupo 5-FU/ST apresentou maior número de células TRAP-positivas aos 14 dias (21,6±7,8 células/mm²) quando comparado ao grupo SS/ST, e aos 14

($21,6 \pm 7,8$ células/mm²), 22 ($29,9 \pm 7,9$ células/mm²) e 37 dias ($25,0 \pm 7,9$ células/mm²) quando comparado com os grupos 5-FU/RAR/SS, e 5-FU/RAR/AS nos mesmos períodos. O grupo SS/ST apresentou maior número de células TRAP-positivas aos 37 dias ($20,0 \pm 4,7$ células/mm²) quando comparado aos grupos SS/RAR/SS, 5-FU/RAR/SS e 5-FU/RAR/AS nos mesmos períodos ($p \geq 0,05$) (Figura 5).

Para OCN, na análise intragrupo, não houve diferença estatisticamente significativa. Na análise intergrupo, o grupo SS/RAR/AS apresentou maior padrão de imunomarcção aos 22 dias quando comparado com os grupos SS/ST e SS/RAR/SS ($p \leq 0,05$) e aos 37 dias quando comparado com o grupo SS/ST ($p \leq 0,05$). (Figura 6).

Discussão

Apesar da terapia periodontal convencional de debridamento mecânico apresentar excelentes resultados em pacientes sistemicamente saudáveis, condições sistêmicas debilitantes constituem um grande desafio para o sucesso da terapia. Sabendo que o tratamento quimioterápico acelera a progressão e aumenta a severidade da DP,⁸ e devido ao conhecimento de que a incidência de novos casos de câncer irá dobrar nas próximas duas décadas,⁴⁹ é previsível que muitos destes pacientes irão necessitar de tratamento periodontal. Tendo isso em mente, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do uso tópico de AS coadjuvante à RAR no tratamento da PE em ratos submetidos a quimioterapia com 5-FU.

A periodontite é uma condição patológica multifatorial dependente de espécies bacterianas específicas e resposta imune inflamatória do hospedeiro.⁵⁰ A validação deste modelo experimental de indução da PE por ligadura é decorrente da inflamação dos tecidos periodontais e da perda óssea alveolar, características condizentes com a DP que acomete seres humanos^{51,52}. Estudos^{39,41} desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa mostram que este modelo se apresenta adequado para avaliação, tanto da progressão quanto de modalidades de tratamento da DP, o que torna possível a validação das hipóteses levantadas por trabalhos envolvendo PE.

O tratamento da DP envolve a remoção mecânica do biofilme bucal. O uso de terapias coadjuvantes para o tratamento periodontal tem por objetivo diminuir/eliminar microorganismos contribuindo para o desaparecimento ou progressão da periodontite, bem como para otimizar os resultados da terapia convencional de RAR em ocasiões nas quais esta, isoladamente, não é efetiva (p.ex. pacientes comprometidos

sistemicamente).^{9,39} A antibioticoterapia pode ser listada entre elas, contudo, os antibióticos utilizados como coadjuvantes podem levar a seleção de cepas bacterianas resistentes, além de não atingir a concentração terapêutica no fluido do sulco gengival, aumentar os riscos a efeitos adversos e sua eficácia ser completamente dependente da cooperação do paciente.⁵³ Visando solucionar os efeitos negativos associados à antibioticoterapia, as terapias com laser e drogas antirreabsortivas tem sido avaliadas.³⁹ Os BFs são conhecidos por reduzir reabsorção e aumentar a massa óssea e, assim, ter alguma eficácia na prevenção /redução na perda óssea.¹⁸

A qualificação do sucesso de terapias para o tratamento da DP está fortemente relacionada com sua capacidade de regressão do quadro de doença e manutenção do tecido ósseo de suporte periodontal. Além de maior POF ter sido observada no grupo SS/RAR/AS quando comparado com SS/RAR/SS, o AS foi capaz de manter maior quantidade de osso na furca dos animais submetidos ao tratamento quimioterápico com 5-FU, uma vez que, o grupo 5-FU/RAR/AS apresentou maior POF em todos os períodos quando comparado com 5-FU/RAR/SS. A perda óssea na furca é decorrente da não interrupção do curso da doença enquanto apenas confinada a regiões interproximais. Os menores valores de POA no grupo 5-FU/RAR/AS aos 22 e 37 dias quando comparado com 5-FU/RAR/SS nos mesmos períodos confirmam a efetividade do AS em cessar o processo de reabsorção óssea periodontal.

A inflamação é um quadro necessário para o desencadeamento do processo de reparação tecidual. A quimioterapia com 5-FU está entre algumas das situações capazes de fazer com que a inflamação persista e ultrapasse os limites fisiológicos do reparo. A persistência do processo inflamatório e a liberação de alguns mediadores pró-inflamatórios é responsável pelo desequilíbrio no sistema RANK-RANKL-OPG,⁵⁴ causando prejuízos no reparo e formação óssea. No presente estudo, o grupo 5-FU/ST

apresentou a totalidade dos animais com intensa e persistente inflamação ao longo dos períodos experimentais, o que não foi observado no grupo SS/ST.

Apesar dos BFs serem predominantemente indicados como drogas antirreabsortivas, algumas propriedades anti-inflamatórias tem sido atribuídas a estes medicamentos.⁵⁵ A redução na intensidade e extensão do processo inflamatório, principalmente nos animais sob quimioterapia e tratados com AS, torna evidente a capacidade anti-inflamatória desse medicamento sobre o tecido periodontal após RAR. Mais do que isso, a análise histopatológica dos tecidos periodontais neste estudo mostrou que a terapia coadjuvante com AS foi responsável por prover aos tecidos ósseo e conjuntivo na região de furca, tanto nos animais tratados com 5-FU quanto nos que receberam SS, uma melhor estruturação celular, fibrilar e trabecular quando comparado com SS/RAR/SS e 5-FU/RAR/SS.

Na análise imunoistoquímica, o grupo 5-FU/ST apresentou maior número de células TRAP positivas quando comparado com os grupos SS/ST, SS/RAR/SS, SS/RAR/AS, 5-FU/RAR/SS e 5-FU/RAR/AS nos mesmos períodos. Quando comparados os grupos 5-FU/RAR/SS e 5-FU/RAR/AS, apesar de não haver diferença estatisticamente significante no número de células TRAP positivas, a maior POF no grupo 5-FU/RAR/AS sugere que, mesmo presentes nos tecidos periodontais, estas células não estavam desempenhando seu papel de reabsorção óssea. A OCN é um produto da secreção dos osteoblastos maduros, ou seja, um importante marcador da biomineralização e *turnover* ósseo. A similaridade entre os padrões de imunomarcacão para OCN entre os grupos tratados com AS ou apenas RAR indica que o BF não induziu neoformação óssea.

Diante dos resultados descritos por este estudo fica evidente que a manutenção do osso alveolar pelo AS, principalmente nos animais tratados com quimioterapia, é

decorrente da diminuição no quadro de inflamação e redução da atividade das células reabsortivas, uma vez que, o AS não estimulou a formação óssea.

Estudos clínicos^{20,21} que avaliaram índices periodontais em pacientes sob tratamento quimioterápico mostraram um aumento na inflamação gengival, placa e profundidade de sondagem nesses indivíduos, quando comparados aos grupos sem tratamento com quimioterapia. Esses resultados podem ser justificados pelo prejuízo dessas drogas sobre a defesa do hospedeiro, desde leucopenia até o comprometimento de barreiras específicas de proteção do periodonto (p.ex. epitélio juncional e sulcular). Essa grande quantidade de agravantes torna indiscutível a necessidade de terapia coadjuvante ao debridamento mecânico isolado.

Apesar de que resultados de uma pesquisa experimental devam ser interpretados com cautela, os eventos teciduais e celulares evidenciados neste estudo confirmam que a irrigação subgengival com AS coadjuvante à RAR é uma alternativa segura, eficaz e promissora para o tratamento periodontal de pacientes sob quimioterapia, uma vez que os efeitos benéficos do AS interferem diretamente nos índices periodontais.

Conclusão

Assim, dentro dos limites do presente estudo, podemos concluir que o uso tópico de AS coadjuvante à RAR é efetivo no tratamento da PE em ratos submetidos a quimioterapia com 5-FU.

Agradecimentos

À Disciplina de Periodontia e ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade de São Paulo – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, São Paulo, Brasil

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo nº405933/2016-9)

Referências Bibliográficas

1. Alani A, Seymour R. Systemic medication and the inflammatory cascade. *Periodontol 2000*. 2014 Feb;64(1):198-210.
2. Aguiar JC, Gomes EP, Fonseca-Silva T et al. Fluoxetine reduces periodontal disease progression in a conditioned fear stress model in rats. *J Periodontal Res*. 2013 Oct;48(5):632-7.
3. Gomes EP, Aguiar JC, Fonseca-Silva T et al. Diazepam reverses the alveolar bone loss and hippocampal interleukin-1beta and interleukin-6enhanced by conditioned fear stress in ligature-induced periodontal disease in rats. *J Periodontal Res*. 2013 Apr;48(2):151-8.
4. Seymour RA. Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006;40:120-9.
5. Preshaw PM. Oral contraceptives and the periodontium. *Periodontol 2000*. 2013 Feb;61(1):125-59.
6. Nassar CA, Battistetti GD, Nahsan FP et al. Evaluation of the effect of simvastatin on the progression of alveolar bone loss in experimentalperiodontitis--an animal study. *J Int Acad Periodontol*. 2014 Jan;16(1):2-7.
7. Nakib N, Ashrafi SS. Drug-induced gingival overgrowth. *Dis Mon*. 2011 Apr;57(4):225-30.
8. Garcia VG, Novaes VC, de Almeida JM, Longo M, Ervolino E, Bomfim SR et al. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Support Care Cancer*. 2015 Jul;23(7):2007-17.

9. Theodoro LH, Longo M, Ervolino E et al. Effect of low-level laser therapy as an adjuvant in the treatment of periodontitis induced in rats subjected to 5-fluorouracil chemotherapy. *J Periodontal Res.* 2016 Oct;51(5):669-80.
10. Saltz LB, Kemeny NE. Adjuvant Chemotherapy of Colorectal Cancer. *Oncologist.* 1996;1(1 & 2):22-29.
11. Half E, Arber N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opin Pharmacother.* 2009 Feb;10(2):211-9.
12. Lorch JH, Goloubeva O, Haddad RI, Cullen K, Sarlis N, Tishler R et al. Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2011 Feb;12(2):153-9.
13. Vermorken JB, Peyrade F, Krauss J et al. Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). *Ann Oncol.* 2014 Mar;25(3):682-8.
14. Arias JL. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules.* 2008 Oct 1;13(10):2340-69.
15. Guchelaar HJ, Vermes I, Koopmans RP, Reutelingsperger CP, Haanen C. Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998;42(1):77-83.

16. McGuire DB. Mucosal tissue injury in cancer therapy. More than mucositis and mouthwash. *Cancer Pract.* 2002 Jul-Aug;10(4):179-91.
17. Naidu MU, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Suman A, Roy P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis--complicating the treatment of cancer. *Neoplasia.* 2004 Sep-Oct;6(5):423-31.
18. Xian CJ, Cool JC, Pyragius T, Foster BK. Damage and recovery of the bone growth mechanism in young rats following 5-fluorouracil acutechemotherapy. *J Cell Biochem.* 2006 Dec 15;99(6):1688-704.
19. Tsukamoto Y, Usui M, Yamamoto G et al. Role of the junctional epithelium in periodontal innate defense and homeostasis. *J Periodontal Res.* 2012 Dec;47(6):750-7.
20. Djuric M, Cakic S, Hadzi-Mihailovic M, Petrovic D, Jankovic L. Oral status in patients receiving 5-fluorouracil for colorectal cancer. *J BUON.* 2010 Jul-Sep;15(3):475-9.
21. Jensen SB, Mouridsen HT, Bergmann OJ, Reibel J, Brüner N, Nauntofte B. Oral mucosal lesions, microbial changes, and taste disturbances induced by adjuvantchemotherapy in breast cancer patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Aug;106(2):217-26.
22. Mazzeo MA, Linares JA, Campos ML. Oral signs of intravenous chemotherapy with 5-Fluorouracil and Leucovorin calcium in colon cancer treatment. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Mar 1;14(3):E108-13.
23. Ogawa K, Ueno T, Kato K et al. A retrospective analysis of periodontitis during bevacizumab treatment in metastatic colorectalcancer patients. *Int J Clin Oncol.* 2013 Dec;18(6):1020-4.

24. Vozza I, Caldarazzo V, Polimeni A, Ottolenghi L. Periodontal disease and cancer patients undergoing chemotherapy. *Int Dent J.* 2015 Feb;65(1):45-8.
25. Vargas-Villafuerte KR, Dantas FT, Messori MR et al. Preliminary Results of Non-Surgical Periodontal Treatment in Patients With Breast Cancer Undergoing Chemotherapy. *J Periodontol.* 2016 Nov;87(11):1268-1277.
26. Tani-Ishii N, Tsunoda A, Teranaka T, Umemoto T. Autocrine regulation of osteoclast formation and bone resorption by IL-1 alpha and TNF alpha. *J Dent Res.* 1999 Oct;78(10):1617-23.
27. Taubman MA, Kawai T, Han X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. *J Clin Periodontol.* 2007 May;34(5):367-9.
28. Bradaschia-Correa V, Massa LF, Arana-Chavez VE. Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in young growing rats. *Cell Tissue Res.* 2007 Dec;330(3):475-85.
29. Russell RG, Watts NB, Eberlin FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008 Jun;19(6):733-59.
30. Russell RG. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics.* 2007 Mar;119 Suppl 2:S150-62.
31. Bone HG, Downs RW Jr, Tucci JR et al. Dose-response relationships for alendronate treatment in osteoporotic elderly women.

- Alendronate Elderly Osteoporosis Study Centers. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jan;82(1):265-74.
32. 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.
33. Wang Y, Huang P, Tang PF, Chan KM, Li G. Alendronate (ALN) combined with osteoprotegerin (OPG) significantly improves mechanical properties of long bone than the single use of ALN or OPG in the ovariectomized rats. *J Orthop Surg Res.* 2011 Jul 13;6:34.
34. Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG et al. 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.
35. Menezes AM, Rocha FA, Chaves HV, Carvalho CB, Ribeiro RA, Brito GA. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2005 Nov;76(11):1901-9.
36. Alencar VB, Bezerra MM, Lima V. et al. Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2002 Mar;73(3):251-6.
37. 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.
38. 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).
39. De Almeida J, Ervolino E, Bonfietti LH et al. Adjuvant Therapy With Sodium Alendronate for the Treatment of Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol*. 2015 Oct;86(10):1166-75.
 40. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Alman DG, NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*. 2010 Aug;160(7):1577-9.
 41. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol*. 2008 Jun;79(6):1081-8.
 42. Theodoro LH, Longo M, Novaes VCN et al. Low-level laser and antimicrobial photodynamic therapy on experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy by 5-fluorouracil. *Support Care Cancer*. 2017 Oct;25(10):3261-3271.
 43. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol*. 2009 Mar;36(3):219-28.
 44. Garcia VG, Novaes VC, de Almeida JM et al. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Support Care Cancer*. 2015 Jul;23(7):2007-17.
 45. Messoria MR, Pereira LJ, Foureaux R et al. Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol*. 2016 Jun;66:108-19.

46. Almeida, JM. Influência do pH da droga fotossensibilizadora no reparo periodontal em ratos tratados pela terapia fotodinâmica. Tese (Livre-Docência) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2017 112f.
47. Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4):556-65.
48. Zuza EP, Garcia VG, Theodoro LH, Ervolino E, Favero LFV, Longo M. et al. Influence of obesity on experimental periodontitis in rats: histopathological, histometric and immunohistochemical study. *Clin Oral Investig*. 2017 Sep 19.
49. World Health Organization/Cancer. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> Acesso em 23 de março 2017.
50. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol 2000* 2013; 62(1): 203–217.
51. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol* 2014; 85(3):465-477.
52. Donos N, Park JC, Vajgel A, de Carvalho Farias B, Dereka X. Description of the periodontal pocket in preclinical models: limitations and considerations. *Periodontol 2000*. 2018 Feb;76(1):16-34.
53. Keestra JA, Grosjean I, Coucke W, Quirynen M, Teughels W. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated chronic

periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Res* 2015; 50(3):294-314.

54. Horowitz M, Kacena M, Lorenzo, J. Genetics and mutations affecting osteoclast development and function. In: Bone resorption. Bronner F, Farach-Carson M, Rubin J, editors. editors. London: Springer-Verlag, 2006; 91-107.
55. Matsuo A, Shuto T, Hirata G et al. Antiinflammatory and chondroprotective effects of the aminobisphosphonate incadronate (YM175) in adjuvant induced arthritis. *J Rheumatol*. 2003 Jun;30(6):1280-90.

Tabela 1: Parâmetros, escores e distribuição dos espécie de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos e períodos experimentais.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA																		
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES																	
	GRUPOS EXPERIMENTAIS																	
	SS/ST			SS/RAR/SS			SS/RAR/AS			5-FU/ST			5-FU/RAR/SS			5-FU/RAR/AS		
	14d	22d	37d	14d	22d	37d	14d	22d	37d	14d	22d	37d	14d	22d	37d	14d	22d	37d
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL																		
1) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2) inflamação discreta (até 1/3 das células são inflamatórias)	-	-	-	-	40%	80%	-	80%	100%	-	-	-	-	-	-	-	-	40%
3) inflamação moderada (de 1/3 até 2/3 das células são inflamatórias)	60%	100%	100%	100%	60%	20%	100%	20%	-	-	-	-	-	40%	80%	60%	100%	60%
4) inflamação intensa (mais de 2/3 das células são inflamatórias)	40%	-	-	-	-	-	-	-	-	100%	100%	100%	100%	60%	20%	40%	-	-
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO																		
1) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca	-	-	-	-	40%	60%	-	80%	80%	-	-	-	-	-	-	-	-	40%
3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca	80%	100%	100%	100%	60%	40%	100%	20%	20%	-	-	-	-	20%	80%	80%	100%	60%
4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca	20%	-	-	-	-	-	-	-	-	100%	100%	100%	100%	80%	20%	20%	-	-
REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA (CEMENTO E DENTINA)																		
1) ausência	-	-	-	-	-	-	20%	-	20%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2) apenas áreas de reabsorção inativas	-	-	-	-	-	60%	-	40%	80%	-	40%	40%	-	-	40%	-	60%	80%
3) poucas áreas de reabsorção ativas	60%	20%	40%	60%	60%	40%	80%	60%	-	20%	60%	40%	100%	80%	60%	100%	40%	20%
4) muitas áreas de reabsorção ativas	40%	80%	60%	40%	40%	-	-	-	-	80%	-	20%	-	20%	-	-	-	-

continuação na página seguinte

REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR

1) dentro dos padrões de normalidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2) pequena quantidade de áreas de reabsorção	-	-	-	-	-	40%	20%	80%	80%	-	-	-	-	-	-	-	-	40%
3) moderada quantidade de áreas de reabsorção	80%	80%	100%	100%	100%	60%	80%	20%	20%	-	-	-	-	20%	20%	100%	100%	60%
4) grande quantidade de áreas de reabsorção	20%	20%	-	-	-	-	-	-	-	100%	100%	100%	100%	80%	80%	-	-	-

PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA

1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	-	20%	20%	60%	20%	100%	100%	-	-	-	-	-	-	40%	40%	60%
3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	80%	100%	100%	80%	80%	40%	80%	-	-	-	-	20%	80%	100%	100%	60%	60%	40%
4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose	20%	-	-	-	-	-	-	-	-	100%	100%	80%	20%	-	-	-	-	-

PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO DA REGIÃO DE FURCA

1) trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea	-	-	-	-	-	-	-	20%	20%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2) trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos	-	-	-	100%	100%	100%	100%	80%	80%	-	-	-	-	-	-	-	-	40%
3) trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos	100%	100%	80%	-	-	-	-	-	-	20%	20%	20%	40%	40%	60%	80%	80%	60%
4) áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos	-	-	20%	-	-	-	-	-	-	80%	80%	80%	60%	60%	40%	20%	20%	-

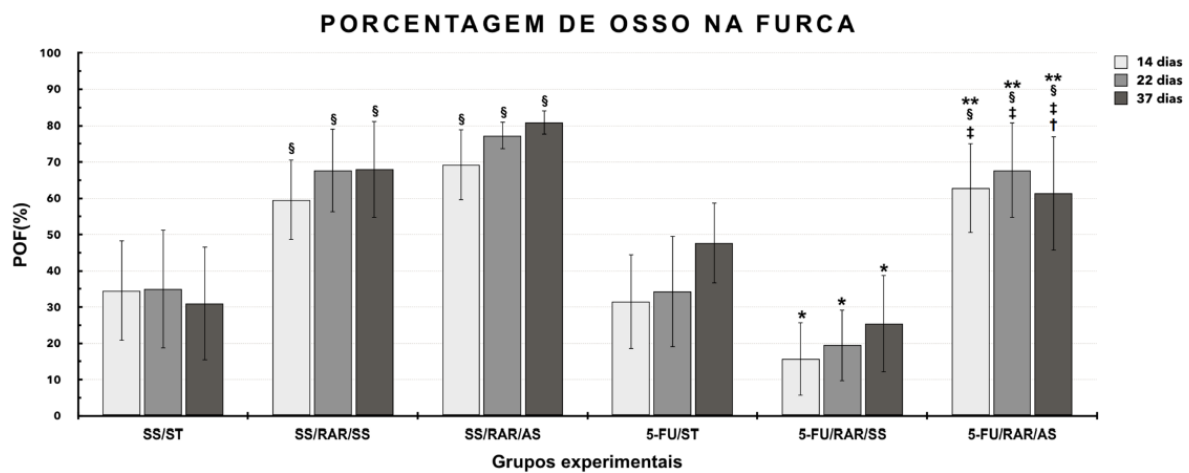


Figura 1: Gráfico mostrando as médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da porcentagem de osso na furca (POF) dos primeiros molares inferiores esquerdos para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com SS/RAR/SS nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com SS/RAR/AS no mesmo período ($p \leq 0,05$); ‡, diferença estatisticamente significativa com 5-FU/RAR/SS nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$); §, diferença estatisticamente significativa com SS/ST nos mesmo períodos ($p \leq 0,05$); **, diferença estatisticamente significativa com 5-FU/ST nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$).

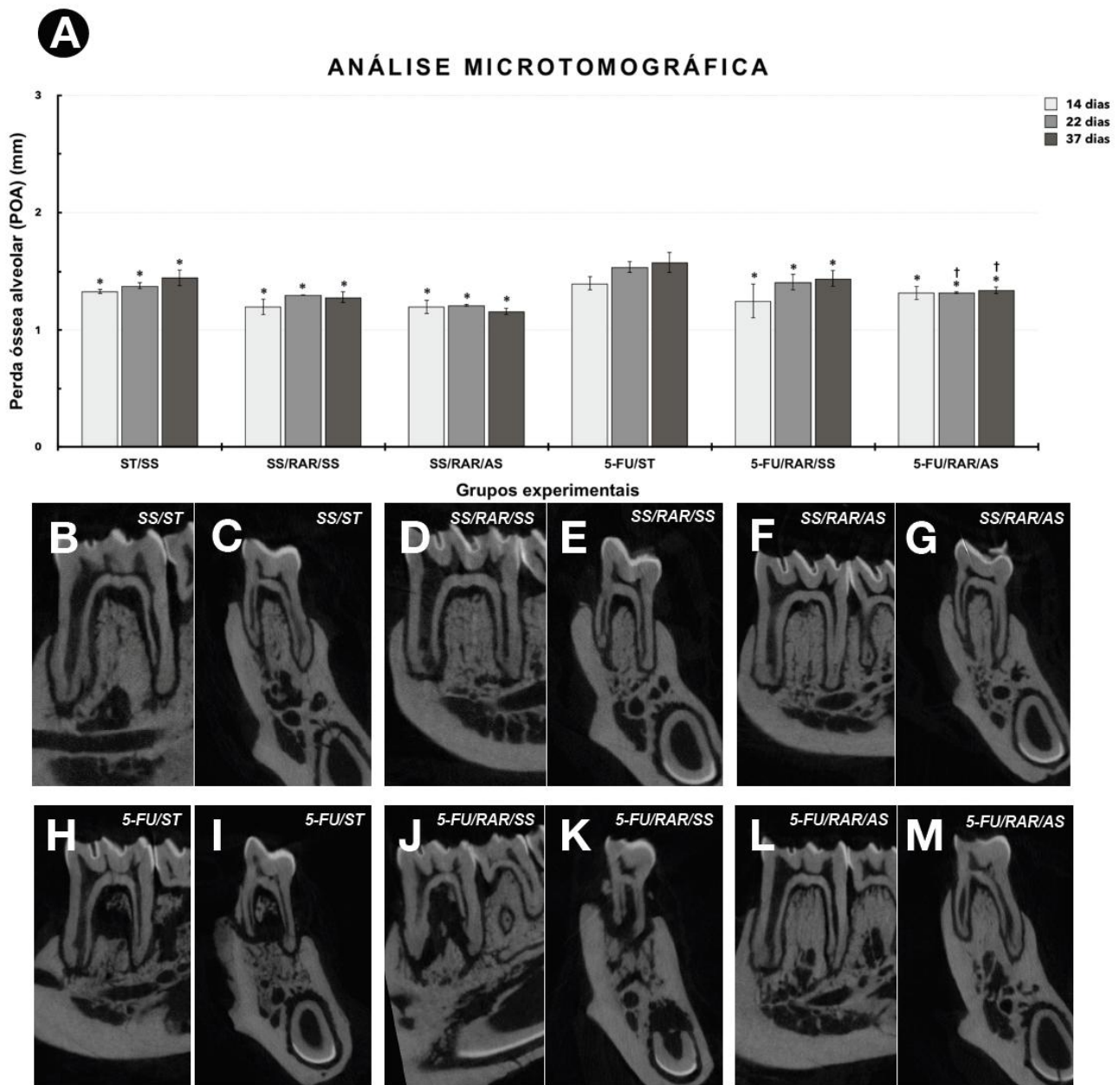


Figura 2: Análises de micro-CT. (A) Gráfico mostrando as médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da perda óssea alveolar (POA) para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com 5-FU/ST nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com 5-FU/RAR/SS nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). B - M: imagens representativas de micro-CT para análise da POA aos 37 dias em SS/ST (B, C), SS/RAR/SS (D, E), SS/RAR/AS (F, G), 5-FU/ST (H, I), 5-FU/RAR/SS (J, K) e 5-FU/RAR/AS (L, M).

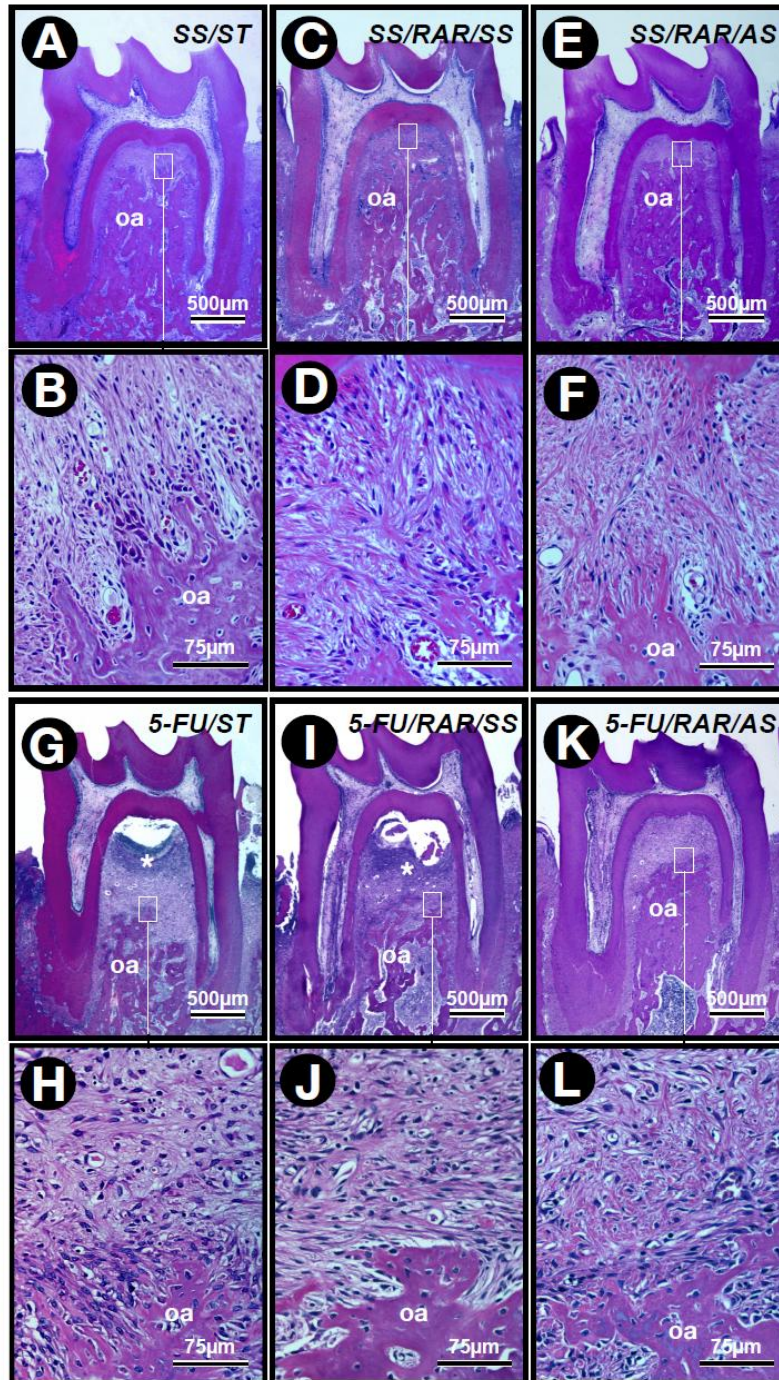


Figura 3: Características dos tecidos periodontais na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos aos 14 dias. Abreviações e símbolos: oa: osso alveolar; *, infiltrado inflamatório. A – L: fotomicrografias mostrando as características dos tecidos periodontais aos 14 dias em SS/ST (A,B), SS/RAR/SS (C,D), SS/RAR/AS (E,F), 5-FU/ST (G,H), 5-FU-RAR/SS (I,J), 5-FU/RAR/AS (K,L). A, C, E, G, I e K permitem visão panorâmica dos tecidos periodontais, enquanto B, D, F, H, J e L fornecem visão mais detalhada dos aspectos histopatológicos na região de furca. Coloração: hematoxilina e eosina (HE). Barras de escala: A, C, E, G, I e K 500 μ m; B, D, F, H, J e L 75 μ m.

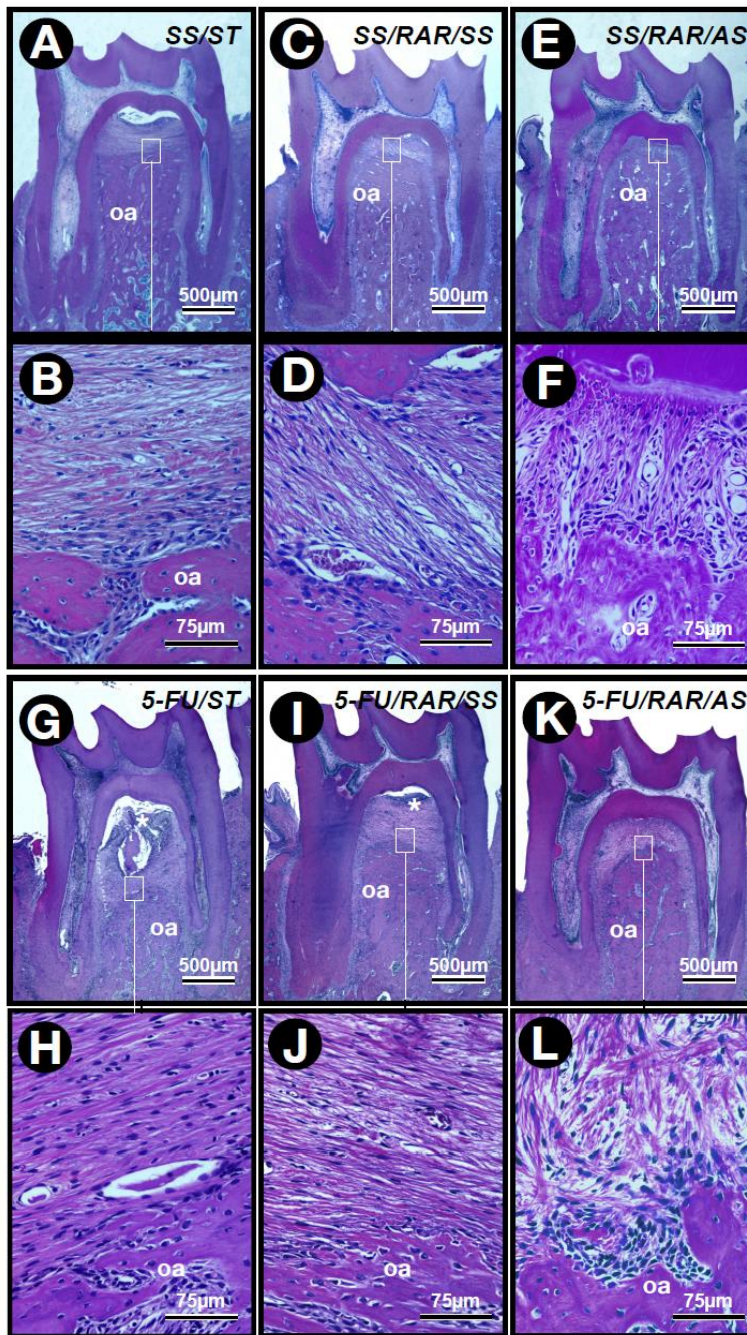


Figura 4: Características dos tecidos periodontais na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos aos 37 dias. Abreviações e símbolos: oa: osso alveolar; *, infiltrado inflamatório. A – L: fotomicrografias mostrando as características dos tecidos periodontais aos 14 dias em SS/ST (A,B), SS/RAR/SS (C,D), SS/RAR/AS (E,F), 5-FU/ST (G,H), 5-FU-RAR/SS (I,J), 5-FU/RAR/AS (K,L). A, C, E, G, I e K permitem visão panorâmica dos tecidos periodontais, enquanto B, D, F, H, J e L fornecem visão mais detalhada dos aspectos histopatológicos na região de furca. Coloração: hematoxilina e eosina (HE). Barras de escala: A, C, E, G, I e K 500 µm; B, D, F, H, J e L 75 µm.

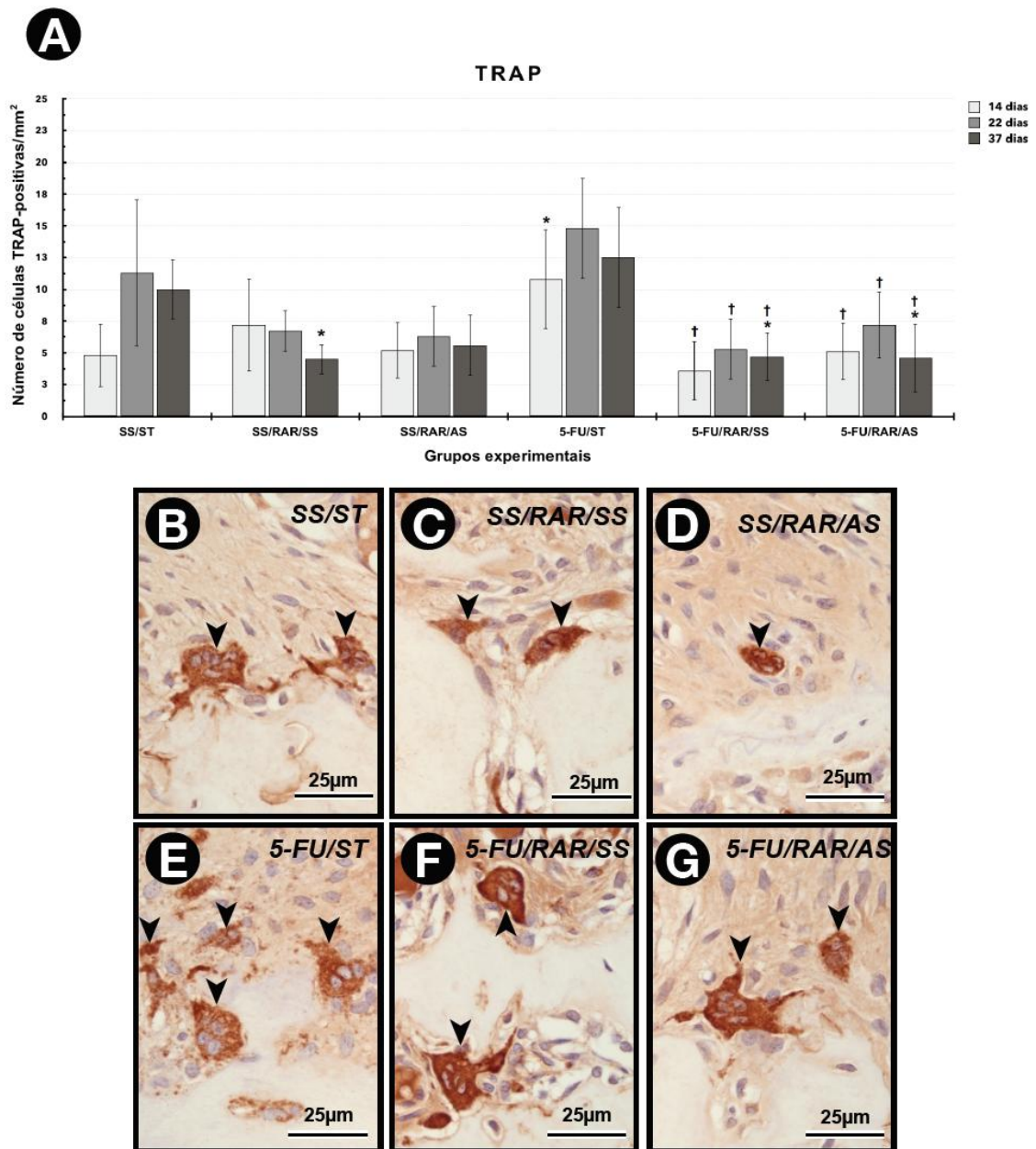


Figura 5: Imunomarcção para TRAP na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos. (A) gráfico evidenciando as médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da quantidade de células TRAP-positivas na região de furca para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Abreviações e símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com SS/ST nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com 5-FU/ST nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). (B - G) fotomicrografias mostrando as células TRAP-positivas (cabeças de seta pretas) aos 22 dias nos grupos SS/ST (B), SS/RAR/SS (C), SS/RAR/AS (D), 5-FU/ST (E), 5-FU/RAR/SS (F) e 5-FU/RAR/AS (G). Contra coloração: hematoxilina de Harris. Barras de escala: 25 µm.

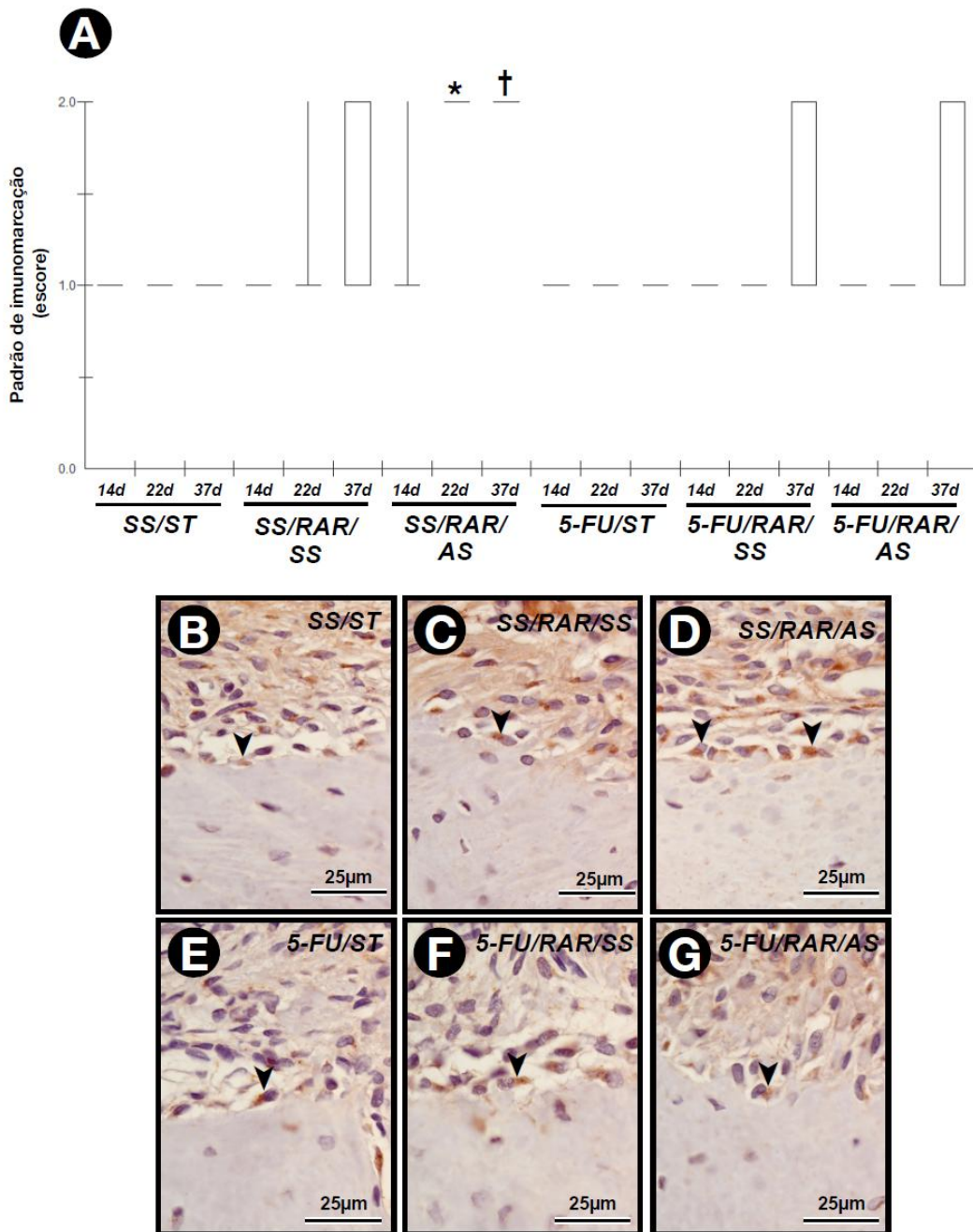


Figura 6: Imunomarcacão para OCN na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos. (A) gráfico evidenciando as medianas e os desvios interquartílicos dos escores atribuídos à imunomarcacão de OCN na região de furca para cada grupo e período. Testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls. Abreviações e símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com os demais grupos no mesmo período ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com SS/ST e 5-FU/ST no mesmo período ($p \leq 0,05$). (B - G) fotomicrografias mostrando a imunomarcacão para OCN (cabeças de seta pretas) aos 37 dias nos grupos SS/ST (B), SS/RAR/SS (C), SS/RAR/AS (D), 5-FU/ST (E), 5-FU/RAR/SS (F) e 5-FU/RAR/AS (G). Contra coloração: hematoxilina de Harris. Barras de escala: 25 μm.

Anexo A – Normas para publicação no Periódico “Journal of Periodontology”

Author Instructions *Updated May 2017*

This update includes changes to the [Review Articles](#) section.

The *Journal of Periodontology* publishes articles relevant to the science and practice of periodontics and related areas. Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that text, figures, photographs, and tables have not appeared in any other publication, except as an abstract prepared and published in conjunction with a presentation by the author(s) at a scientific meeting, and that material has been submitted only to this journal. The *Journal of Periodontology* accepts manuscript submissions online at [ScholarOne Manuscripts](#). To start a new submission, enter the Author Center and click "Click here to submit a new manuscript." Details regarding each submission step are located at the top of the page in ScholarOne Manuscripts. Authors should prepare manuscripts in accordance with the instructions below. Failure to do so may result in delays or manuscript unsubmission.

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

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

ORIGINAL ARTICLES

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

Format

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

Abstract

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

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

Introduction

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

Materials and Methods

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

Results

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

Discussion

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

Publication of Accepted Original Articles

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

REVIEW ARTICLES

The JOP is no longer accepting submissions of reviews. Authors may be invited to submit reviews for potential publication, but unsolicited reviews will no longer be accepted.

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.

QUESTIONS

Inquiries regarding current submissions should be sent to: Editorial Specialist,

Journal of Periodontology, 737 North Michigan Avenue, Suite 800, Chicago, IL

60611-6660. Telephone: 312/573-3255; e-mail: jerry@perio.org.

Anexo B – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Alendronato de sódio como terapia coadjuvante no tratamento da periodontite experimental em ratos submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil"**, Processo FOA nº 00319-2016, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 01 de junho de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 03 de Dezembro de 2019.

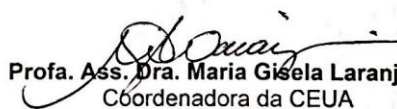
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 03 de Dezembro de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Alendronato Sodiums adjunctve in the treatment of experimental periodontitis in rats undergoing chemotherapy with 5-fluorouracil"**, Protocol FOA nº 00319-2016, under the supervision of Juliano Milanezi de Almeida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 01, 2016.

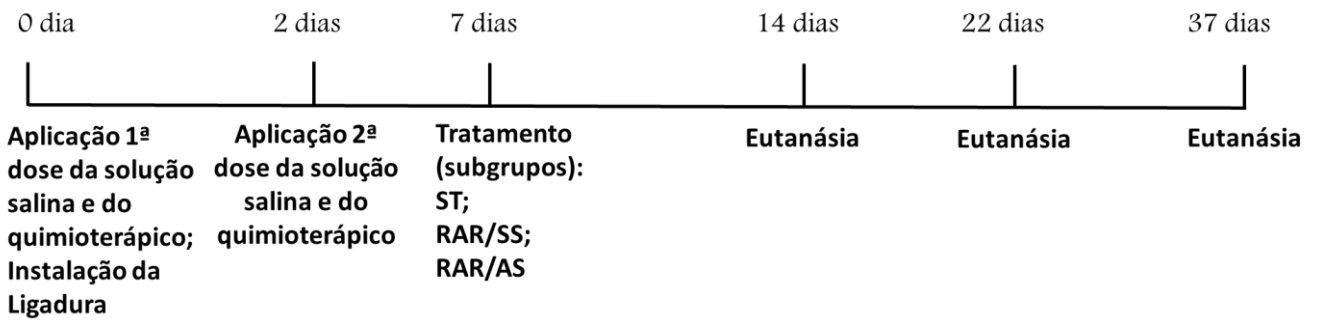
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 03, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 03, 2019.

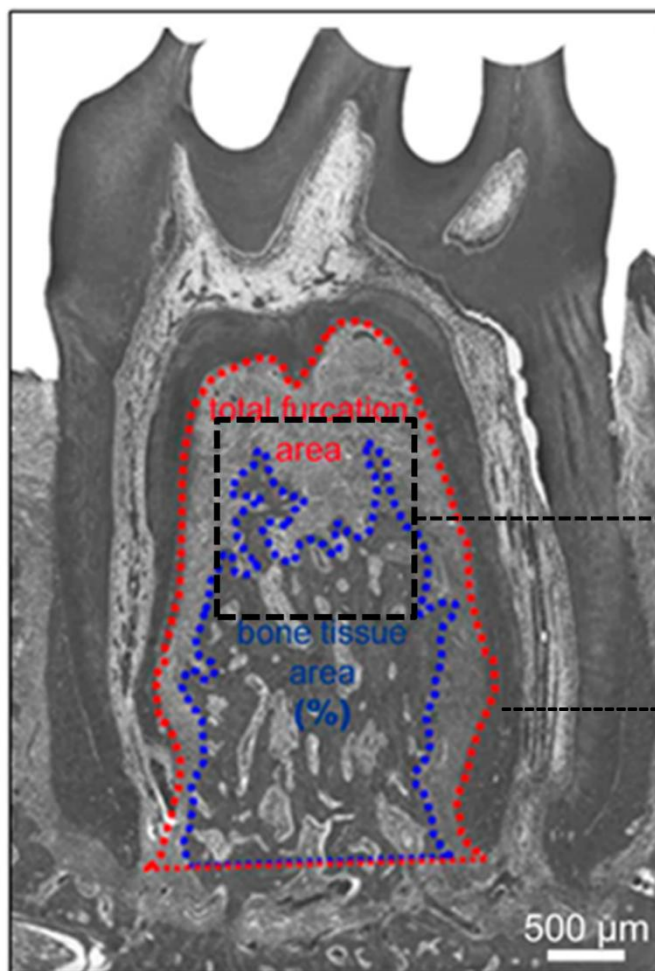

Prof. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Cóordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

Anexo C - Delineamento do estudo



Anexo D – Figura representativa da metodologia adotada para análises histológica, histométrica e imunoistoquímica



ROI 2

ROI 1