



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
ARAÇATUBA**

DANIELA MARIA JANJACOMO MIESSI

**Efeito da administração local ou sistêmica do
Lactobacillus reuteri, no tratamento da doença
periodontal experimentalmente induzida em ratos,
submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil: estudo
histopatológico, histométrico e imunoistoquímico**

Araçatuba – São Paulo

2018



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
ARAÇATUBA**

DANIELA MARIA JANJACOMO MIESSI

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba – Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para
obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área
de concentração em Periodontia.

Orientadora: Prof.^a Associada Letícia Helena Theodoro

Coorientador: Professor Titular Valdir Gouveia Garcia

Araçatuba – São Paulo

2018

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M632e Miessi, Daniela Maria Janjacomio.
Efeito da administração local ou sistêmica do *Lactobacillus reuteri*, no tratamento da doença periodontal experimentalmente induzida em ratos, submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil: estudo histopatológico, histométrico e imunoistoquímico / Daniela Maria Janjacomio Miessi. - Araçatuba, 2018
108 f.: il.; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Letícia Helena Theodoro
Coorientador: Prof. Valdir Gouveia Garcia

1. Probióticos 2. Doenças periodontais 3. Fluoruracila
4. *Lactobacillus reuteri* I. T.

Black 6
CDD 617.63

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dados curriculares

Daniela Maria Janjacomio Miessi

- Nascimento: 30.01.1982 Penápolis- SP
- Filiação: Luiz Antônio Janjacomio
Maria Lucia de Mendonça Janjacomio
- 2002-2006: **Graduação em Odontologia**
FAI – Faculdades Adamantinenses Integradas
- 2007-2007: **Atualização em Endodontia**
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
- 2008- 2009: **Mestrado em Odontologia – Área de Clínica Integrada**
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
- 2017-2017: **Atualização em Periodontia**
NEC – Núcleo de Educação Continuada em Odontologia
- 2015-2018: **Doutorado em Odontologia - Área de Periodontia**
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP



DEDICATÓRIA

Daniela Janjacomó

Aos meus pais, Luiz Antônio e Maria Lucia,

Queridos pais, todo amor e atenção que recebi de vocês fizeram de mim a pessoa que hoje sou, e eu só tenho motivos para agradecer a família maravilhosa que Deus me permitiu ter. Vocês sempre me incentivaram e deram todo apoio para que eu pudesse trilhar meus caminhos, muitas vezes até renunciando de seus próprios sonhos para que eu realizasse os meus. Obrigada por cuidar tão bem da Isabela! Mãe, quantas vezes você abonou suas aulas para que eu pudesse ir para a Faculdade! Quantas vezes vocês deixaram de viajar para cuidar da Isa para mim, pois eu não podia deixar de ir! Pai agradeço o exemplo profissional que eu cresci tendo ao vê-lo trabalhar, não deixando dúvidas de que queria ter a mesma profissão. Obrigada por sempre me proporcionar os melhores caminhos da Odontologia, por me incentivar a entrar no Mestrado e mais ainda sua grande influência para que eu fizesse o Doutorado na Periodontia. Você é com certeza meu ídolo, adoro contar as suas cirurgias para os meus colegas de pós-graduação, tenho muito orgulho. Mais do que todo o estudo nas melhores escolas para que eu tivesse uma boa formação profissional, agradeço ainda mais a formação como ser humano, isso foi o que de melhor fizeram por mim. Grandes exemplos de pais, avós, filhos, irmãos tenho em minha casa. Minha casa sim, pois a casa de vocês sempre será a MINHA CASA. Mesmo nos momentos em que vocês precisaram ser duros, vocês fizeram isso com muito amor e respeito. Vocês nunca usaram de autoridade comigo para me ensinar nada pela dor, vocês sempre usaram as vias do amor. Cresci em uma família muito religiosa que sempre me mostrou o amor de Deus por nós, que Ele nunca nos abandona e sempre quer nos dar o melhor.

Pais são os heróis dos filhos, assim são vocês para mim! Sou e serei eternamente grata por tudo que vocês fazem por mim. Eu tenho muito orgulho de ser filha de vocês e muita admiração pelos pais que tenho. Obrigada por tudo! Amo muito vocês!

Ao meu esposo Jonathan,

Jô, te agradeço por sempre estar ao meu lado, me dando apoio e me incentivando a ir em busca dos meus sonhos, por mais difíceis que sejam, para você sempre vale a pena tentar. Você acompanhou as etapas mais estressantes da minha carreira profissional, o Mestrado e o Doutorado, quando eu precisei me dedicar mais a elas, do que a você. Sempre com muita paciência, era para você que sobravam minhas irritações, mas você se saiu muito bem. Você me deu o maior tesouro da minha vida, nossa filha Isabela, minha preciosidade! Só tenho motivos para agradecer você em minha vida. Eu escolhi você! E por mais que tenhamos nossos problemas, como diz o ditado: “Casal perfeito não é aquele que nunca tem problemas, mas sim aquele que apesar dos obstáculos sempre permanece juntos”, eu tenho certeza que fiz a escolha certa!

**“ASSIM, ELES JÁ NÃO SÃO DOIS, MAS SIM UMA
SÓ CARNE. PORTANTO O QUE DEUS UNIU
NINGUÉM SEPARE”.**

Mateus
19:6

À minha filha Isabela,

Filha você é meu grande amor! Só tenho a agradecer a Deus por ter me dado uma filha linda, carinhosa, alegre, inteligente, uma grande companheira da mamãe, minha melhor amiga! Quando comecei o Doutorado você só tinha 2 aninhos. Era muito bom passar tanto tempo com você, mas foi necessário “cortar um pouco o cordão umbilical”, como se diz, e acho que eu sofri muito mais. Você foi melhor do eu imaginava e já falava “Mamãe, tchau, bom estudo e bom trabalho, não precisa se preocupar comigo!” Sei que devo isso a seus avós, vovô Luiz e vovó Lucia que cuidam de você tão bem! Tem passagem que a gente nunca esquece, e uma que guardo com carinho é a tarefa da escolinha, onde era para se colocar a profissão do papai e da mamãe e a minha é a melhor de todas, sou doutora de ratinhos! Você me diverte demais pequena! Você é minha vida, te amo!

**“AO TORNA-SE MÃE VOCÊ APRENDE QUE É
MAIS FORTE DO PENSAVA, MAIS DEDICADA DO
QUE IMAGINAVA, E MAIS FELIZ DO QUE JAMAIS
SONHOU SER”.**

MARCELO CRIVELLA



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Daniela Janjacomó

A Deus,

Sou grata por ter permitido a alegria desta conquista tão importante para mim e de colocar em meu caminho pessoas que sempre me incentivam e me proporcionam um grande crescimento profissional e pessoal.

**“QUERIDO DEUS, TU ÉS MINHA PROTEÇÃO, A
MINHA FORTALEZA. TU ÉS O MEU DEUS, EU
CONFIO EM TI”.**

Salmo 91:2

Ao meu irmão Luiz Gustavo,

Por sempre estar ao meu lado, me auxiliando em tudo. Pelo grande amor, carinho e respeito que temos um ao outro. Por ser um grande companheiro, ouvinte, amigo, irmão, cunhado e principalmente um tio maravilhoso. Não foi à toa que escolhi você para ser o padrinho da Isabela, pois padrinhos são como pais. Sei o quanto torce por mim! Te amo muito!

**“O AMOR ENTRE IRMÃOS É ALGO QUE NÃO SE
INVENTA, NÃO SE ESCREVE, NÃO SE CRIA, ELE
EXISTE DESDE O PRIMEIRO MOMENTO QUE
NASCEMOS”.**

Autor desconhecido

À minha grande e sempre amiga Patrícia Alcântara,

Por ser minha irmã que Deus me permitiu escolher! Paty você é mais do que especial na minha vida, minha amiga, companheira dedicada, sempre minha confidente. Desde que nos tornamos amigas, somos tão ligadas que é como se nossa amizade fosse suficiente. Com certeza você foi minha parceira durante todo o Doutorado. Sempre uma ótima ouvinte quando precisava desabafar todo estresse e angústias que certos momentos me abalavam. E suas palavras me davam ânimo. Aliás, eu nunca conheci uma pessoa tão animada e alto astral em minha vida! Isso é uma grande dádiva! Com todos os seus problemas, você sempre está com um sorriso no rosto e uma boa gargalhada! É por isso que gosto tanto da sua companhia! Obrigada por sempre estar ao meu lado, por toda dedicação, por toda amizade! Você é muito especial para mim!

**“OS MELHORES AMIGOS NÃO PRECISAM
DEMONSTRAR SUA AMIZADE, PORQUE A
LIGAÇÃO ESTÁ À VISTA DE TODO MUNDO”.**

Frases do bem

À minha orientadora
Professora Leticia Helena Theodoro,

**“NINGUÉM CRUZA NOSSO CAMINHO POR ACASO E NÓS
NÃO ENTRAMOS NA VIDA DE ALGUÉM SEM NENHUMA
RAZÃO”**

CHICO XAVIER

Agradeço o privilégio de tê-la como orientadora. Uma pessoa iluminada por Deus, paciente, carinhosa, extremamente competente, uma grande profissional. Conviver com você no dia-dia foi um grande presente, com muita paciência e dedicação, foi uma professora exemplar nas pesquisas, nas clínicas, na sala de aula e mesmo no meu aprendizado pessoal. Tive a oportunidade de conviver com você também fora desse universo, em confraternizações em sua casa, onde pude desfrutar de momentos muito agradáveis, com boas conversas e risadas. Além de minha eterna professora e orientadora, sempre a terei como uma grande amiga!

Letícia, obrigada pelos ensinamentos, apoio, carinho, amizade e respeito. Tenho uma profunda admiração pelo modo com que tem se dedicado a mim, por ter confiado no meu potencial, por todas as oportunidades, pela grande amizade que cultivamos e com certeza vamos levar para sempre!

Agradeço a você por estar aqui hoje, eu fui muito bem recebida e orientada. Posso dizer que você me acolheu com muito carinho na Periodontia, e sou extremamente agradecida.

**“AQUELES QUE PASSAM POR NÓS, NÃO VÃO SÓS, NÃO
NOS DEIXAM SÓS. DEIXAM UM POUCO DE SI, LEVAM UM
POUCO DE NÓS”.**

ANTOINE DE SAINT- EXUPÉRY

Ao meu orientador Professor Valdir Gouveia Garcia,

Professor Valdir, quanto carinho tenho pela sua pessoa! O senhor é uma pessoa que todos deveriam conviver, muito agradável é a sua companhia! Agradeço a Deus por ter me permitido tê-lo por perto nessa jornada do Doutorado.

O senhor é iluminado, nos transfere grande tranquilidade e estímulo em suas conversas, tudo parece que fica mais fácil! Foi uma honra poder desfrutar da sua grande experiência nas pesquisas, nas clínicas, em aulas e com certeza experiência de vida. Vou lembrar sempre com muito carinho de todas as vezes que o senhor me animou com suas conversas acolhedoras dizendo que tudo iria dar certo, com exemplos de sua própria vida acadêmica, que o importante é não desistir, mesmo que tenha que começar tudo de novo. Agradeço por ter confiado em mim, juntamente com a professora Letícia, quando me deram a grande oportunidade de me orientarem, sempre com muita seriedade, mas com tamanha humildade e paciência. Obrigada pela amizade e carinho que sempre dedicou a mim, amizade que parece ser de muito tempo atrás, pois cresci ouvindo meu pai falar sempre com muito carinho dos amigos Letícia e Valdir. Aprendi muito com vocês, obrigada por todos os valiosos ensinamentos meus eternos professores e amigos Valdir e Letícia!

**“NÃO SÃO AS COISAS BONITAS QUE MARCAM
NOSSAS VIDAS, MAS SIM AS PESSOAS QUE TÊM
O DOM DE JAMAIS SEREM ESQUECIDAS”.**

Autor desconhecido



AGRADECIMIENTOS

Daniela Janjacomó

Ao professor Associado Edilson Ervolino, por todo carinho e atenção que dedicou a mim. Conhecer o senhor foi um grande prazer! Um professor muito competente e com uma incrível paciência para ensinar, um dom de poucos. Aprendi tudo que sei de imunoistoquímica com o senhor, nunca tinha antes trabalhado nesta área, mas com sua facilidade em transmitir o conhecimento, gostei bastante desse novo aprendizado. Professor, muito obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência e toda a ajuda em meus trabalhos, sempre com extrema competência e dedicação. Suas análises histológicas são tão perfeitas que dão um brilho único em nossos trabalhos e com fotos lindíssimas que deixam nossos artigos e aulas ainda melhores. O senhor foi de extrema importância em todo meu Doutorado, sua ajuda foi essencial. Tenho na sua pessoa uma grande admiração e consideração. Um ser humano com um coração enorme, admirável, sempre me auxiliou quando precisei, com muita paciência e dedicação. Sou grata pela sua amizade! O senhor é um exemplo de ser humano, professor e pesquisador! Obrigado por tudo!

Ao professor Associado Juliano Milanezi de Almeida, pela amizade e carinho que sempre teve por mim. Um exemplo de professor, sempre disposto a ajudar e ensinar. Obrigada pela acolhida carinhosa na Periodontia, pela convivência tranquila no departamento, por sempre estar disposto a ajudar. Obrigada por toda contribuição em meus ensinamentos, em clínicas, em meus trabalhos, sempre como um bom amigo e professor.

À professora Dra. Maria José Hitomi Nagata, pela acolhida carinhosa. Minha admiração pela excelente profissional, professora respeitada e ética, muito dedicada à pesquisa. Foi um prazer conhecê-la e poder disfrutar de seus conhecimentos em clínicas. Obrigada!

Ao meu amigo Márcio Luiz Ferro-Alves, por toda amizade e dedicação. Márcio você foi de enorme importância desde o início do meu Doutorado, me ensinou e auxiliou muito. Sempre me ajudou e mesmo depois que terminou seu Mestrado pude continuar contando com sua ajuda. Posso dizer que nos tornamos amigos além da pós-graduação. Lembrou-me da sua mensagem para contar que iria ser pai, que imensa felicidade. Batizado da Helena e aniversário de 1 aninho, tivemos a enorme felicidade de estarmos presente. Sempre tivemos conversas agradáveis, com boas risadas, descontração e também como

um bom confidente. Desejo toda sorte para você, para a Fernanda e para a princesa Helena. Família que tenho um grande carinho!

Aos amigos Daniela Sá, Marta Aparecida Alberton Nuernberg e Vitor Scalet, pela contribuição e participação em várias etapas desse trabalho, pelo apoio, respeito e amizade.

A todos os colegas de pós-graduação, pelos momentos agradáveis e troca de experiências.

“A melhor parte da vida de uma pessoa está nas suas amizades”

Abraham Lincoln

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do diretor **Prof. Titular Wilson Roberto Poi** e do Senhor Vice-Diretor **Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho** por proporcionarem a realização desta pesquisa e crescimento profissional.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” **Prof. Associado André Luiz Fraga Briso** e ao vice coordenador, o **Prof. Associado Wirley Gonçalves Assunção** pela competência e afincos na condução da nossa pós-graduação.

Aos Funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada – **Marco Aurélio de Oliveira Ianner, Ivete Castro, Gabriela Rezende, Paulo Roberto Gratão e Renato Gomes de Oliveira** obrigada pela ajuda e disposição.

Ao Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal - CEUA, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” **Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani** e ao funcionário do CEUA, **Washington** pela competência, auxílio e disposição em sempre ajudar.

A todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Ana Claudia Martins Grieger Manzatti, Cláudio Hideo Matsumoto, Luís**

Claúdio Sedlacek, Denise Haruyo Nakamura Maeda, Maria Cláudia de Castro Benez e Ana Paula Rimole, pela atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

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

Aos funcionários do Biotério, **Camilo, 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 e dedicação na condução de todas as atividades.

Aos pacientes, pela credibilidade e confiança depositadas a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades profissionais e aprendizados constantes. Minha eterna gratidão!

Aos animais, por contribuírem para o desenvolvimento da ciência.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/CNPq), pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Doutorado durante o curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro e com isso, permitir que fosse possível a realização do Doutorado.



PREFÁCIO

Daniela Janjacomó

Lembraí do tempo que levastes para chegar
aqui,
de todas as vitórias e lágrimas,
de todos os sorrisos e fracassos.

Lembraí dos sonhos realizados,
das frustrações,
das decepções colhidas.

Lembraí de tudo o que passou.
Ganhastes mais força, mais sabedoria
e finalmente podes olhar para o que há diante
de ti e perceber que apenas chegastes ao
começo.
– Seja bem-vindo ao começo!

Augusto Branco



SUMÁRIO

Daniela Janjacomó

SUMÁRIO

| | PÁGINA |
|-----------------------------|--------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 43 |
| 2. PROPOSIÇÃO | 45 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 45 |
| 4. RESULTADO..... | 52 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 56 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 62 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 63 |
| FIGURAS..... | 73 |
| TABELA..... | 84 |
| ANEXO..... | 86 |

MIESSI, DMJ. Efeito da administração local ou sistêmica do *Lactobacillus reuteri*, no tratamento da doença periodontal experimentalmente induzida em ratos, submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil: estudo histopatológico, histométrico e imunistoquímico. [Tese de Doutorado]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP; 2018.

Os probióticos (PROs) estão sendo intensamente avaliados na prevenção ou tratamento de doenças da cavidade oral, que estão associadas a uma mudança na composição e atividade microbiana do biofilme e resposta do hospedeiro. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do *Lactobacillus reuteri* aplicado localmente ou sistemicamente como coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico de raspagem e alisamento radicular (RAR), na periodontite experimentalmente induzida em animais submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil (5-FU). A indução da periodontite experimental (PE) foi realizada com a colocação de um fio de algodão ao redor dos molares inferiores esquerdos de 108 ratos, que permaneceu por 7 dias. Todos os animais receberam o quimioterápico no momento da indução da PE (60mg/kg) e 48 horas após (40mg/kg) e foram separados aleatoriamente em 6 grupos com 18 animais cada um, com os seguintes tratamentos: 5FU: animais tratados com 5-FU; 5FU/RAR: animais tratados com 5-FU, que receberam tratamento com RAR seguido de 1 aplicação de solução fisiológica salina (SS; 0,16mL); Grupo 5FU/SSL: animais tratados com 5-FU, que receberam tratamento com RAR e 4 aplicações locais de SS (0,16mL); 5FU/SSS: animais tratados com 5-FU, que receberam tratamento com RAR e 4 gavagens com SS (0,16mL); 5FU/PL: animais tratados com 5-FU, que receberam tratamento com RAR e 4 aplicações locais de PRO (0,16 mL); 5FU/PS: animais tratados com 5-FU, que receberam tratamento com RAR e 4 gavagens com PRO (0,16mL). 6 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia aos 7, 15 e 30 dias após os tratamentos. A área da furca dos molares foi submetida às análises histopatológica, histométrica e dos padrões de imunomarcção para TRAP, PCNA, RANKL, OPG, OCN e TGF- β 1. Os dados obtidos foram submetidos à análise

estatística ($\alpha=5\%$). O grupo 5FU/PS apresentou melhora no processo inflamatório em todos os períodos. Houve maior perda óssea alveolar (PO) nos espécimes do grupo 5FU/SSS comparado ao grupo 5FU/SSL ($p<0,01$) no período de 7 dias de avaliação. No período de 15 dias os espécimes dos grupos 5FU/SSL e 5FU/SSS demonstraram maior PO comparado aos grupos 5FU ($p<0,05$) e 5FU/PS ($p<0,05$). Aos 30 dias a PO mostrou-se maior nos espécimes do grupo 5FU/PL comparado aos grupos 5FU/RAR ($p<0,05$), 5FU/SSS ($p<0,05$) e 5FU/PS ($p<0,05$). Na análise intragrupo houve menor PO no grupo 5FU/RAR e 5FU/PS aos 30 dias em relação aos 7 dias ($p<0,05$). Na imunomarcagem de células TRAP-positivas não foi evidenciada diferença significativa entre os grupos e períodos; houve maior imunomarcagem de células PCNA-positivas aos 7 dias no grupo 5FU/RAR comparado ao 5FU/SSS. Prevaleceu baixo padrão de imunomarcagem de TGF- β 1 e OCN nos grupos 5FU, 5FU/RAR, 5FU/SSL e 5FU/SSS em todos os períodos. O grupo 5FU/PS apresentou aos 7 dias um moderado padrão de imunomarcagem e aos 15 e 30 dias um alto padrão de imunomarcagem de TGF- β 1 e OCN; o grupo 5FU/PL apresentou um moderado padrão de imunomarcagem de TGF- β 1 e OCN aos 7,15 e 30 dias. Na análise de RANKL prevaleceu um alto padrão de imunomarcagem nos grupos 5FU, 5FU/RAR, 5FU/SSL, 5FU/SSS em todos os períodos e o grupo 5FU/PS apresentou aos 7 e 15 dias um moderado padrão de imunomarcagem e aos 30 dias predominou um padrão de imunomarcagem que variou do moderado ao baixo. Prevaleceu um padrão baixo de imunomarcagem em todos os grupos experimentais e períodos, com exceção dos grupos 5FU/PL e 5FU/PS aos 30 dias (moderado padrão de imunomarcagem) na análise de OPG. Diante dos resultados obtidos e com a metodologia empregada pode ser concluído que o uso sistêmico do *Lactobacillus reuteri* promoveu redução da inflamação e beneficiou o processo de reparação dos tecidos periodontais, porém não foi capaz de reduzir a PO na

região de furca, demonstrando ser uma terapia periodontal coadjuvante promissora em animais submetidos à quimioterapia com 5-FU.

Palavras chaves

Probióticos; doença periodontal; 5-fluorouracil; *Lactobacillus reuteri*

MIESSI, DMJ. Effect of local or systemic administration of *Lactobacillus reuteri* in the treatment of experimentally induced periodontal disease in rats submitted to 5-fluorouracil chemotherapy: histopathological, histometric and immunohistochemical study. [Tese de Doutorado]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP; 2018.

Probiotics (PROs) have been intensively evaluated to prevent or treat oral cavity diseases, associated with a change in the composition and microbial activity of the biofilm and response of the host. The aim of this study was to evaluate the effect of *Lactobacillus reuteri* applied locally or systemically as a coadjuvant to the non-surgical periodontal treatment of scaling and root planing (SRP) in experimentally induced periodontitis in animals treated with 5-fluorouracil (5-FU). Induction of experimental periodontitis (EP) was performed by placing a cotton thread around the left lower molars of 108 rats, which were kept there for 7 days. All animals underwent chemotherapy twice. They were 60mg/kg at the time they were subjected to ligature induction and again another 40 mg/kg, 48 hours later. They were randomly divided into 6 groups with 18 animals each and they received the following treatments: 5FU: treated animals with 5-FU; 5FU/SRP: 5-FU treated animals receiving SRP treatment followed by physiological saline (SS) solution; 5FU/SSL group: animals treated with 5-FU, who received SRP treatment and local SS applications; 5FU/SSS: animals treated with 5-FU, who received SRP treatment and systemic treatment with SS; 5FU/PL: animals treated with 5-FU, who received SRP treatment and local applications of PRO; 5FU/PS: animals treated with 5-FU, who received SRP treatment and systemic treatment with PRO (0.16ml x 4 days). Six animals from each group were submitted to euthanasia at 7, 15 and 30 days after treatments. The area of the molar furcation was submitted to histopathological, histometric and immunolabeling analysis for TRAP, PCNA, RANKL, OPG, OCN and TGF- β 1. The data were submitted to statistical analysis ($\alpha = 5\%$). There was greater bone loss (BL) in the 5FU/SSS group compared to the 5FU/SSL group ($p < 0.01$) in the 7-day evaluation period.

In the 15-day period, specimens from the 5FU/SSL and 5FU/SSS groups showed a higher BL compared to the 5FU ($p<0.05$) and 5FU/PS ($p<0.05$) groups. At 30 days the BL was higher in the 5FU/PL group compared to the 5FU/SRP ($p<0.05$), 5FU/SSS ($p<0.05$) and 5FU/PS groups ($p<0.05$). In the intragroup analysis there was a lower BL in the 5FU/SRP group and 5FU/PS at 30 days compared to 7 days ($p<0.05$). In the immunostaining of TRAP-positive cells no significant difference between groups and periods was evidenced; there was greater immunolabeling of PCNA-positive cells at 7 days in the 5FU/SRP group compared to 5FU/SSS. Low prevalence of TGF- β 1 and OCN immunostaining in the 5FU, 5FU/RAR, 5FU/SSL and 5FU/SSS groups prevailed at all periods. The 5FU/PS group presented at 7 days a moderate pattern of immunostaining and at 15 and 30 days a high standard of immunoblotting of TGF- β 1 and OCN; the 5FU/PL group presented a moderate pattern of TGF- β 1 and OCN immunoregulation at 7, 15 and 30 days; for RANKL a high standard of immunostaining in the 5FU, 5FU/SRP, 5FU/SSL, 5FU/SSS groups prevailed at all periods, 5FU/PL prevailed at 7 days a high standard of immunostaining and a moderate immunostaining pattern at 15 and 30 days and 5FU/PS showed a moderate immunostaining pattern at 7 and 15 days, and at 30 days a predominance of the immunoblot pattern varied from moderate to low; for OPG a low pattern of immunoblotting prevailed in all experimental groups and periods, except for 5FU/PL and 5FU/PS at 30 days that presented a moderate pattern of immunostaining. Based on the results obtained in this study and the methodology used to work on it, it was concluded that the use of *Lactobacillus reuteri* promoted reduction of inflammation and benefited the process of repairing periodontal tissues, but it was not able to reduce the BL in the furca region, proving to be a therapy promising adjuvant periodontal in animals submitted to 5-FU chemotherapy.

Keywords

Probiotics; periodontal disease; 5-fluorouracil; *Lactobacillus reuteri*



Lista de Figuras

Lista de Figuras

- Figura 1 73
- Esquema ilustrando o delineamento experimental do estudo e os procedimentos experimentais executados em seus respectivos intervalos de tempo nos diferentes grupos.
- Figura 2 74
- Fotomicrografias do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando a magnitude da resposta inflamatória local, o nível de perda óssea alveolar e o processo de reparo periodontal nos grupos 5FU (a), 5FU/RAR (b), 5FU/SSL (c), 5FU/SSS (d), 5FU/PL (e) e 5FU/PS (f) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: asteriscos, infiltrado inflamatório; oa, osso alveolar. Aumento original: 200x. Barras de escala: 200 µm. Coloração: hematoxilina e eosina (H&E).
- Figura 3 75
- Fotomicrografias do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando a magnitude da resposta inflamatória local, o nível de perda óssea alveolar e o processo de reparo periodontal nos grupos 5FU (a), 5FU/RAR (b), 5FU/SSL (c), 5FU/SSS (d), 5FU/PL (e) e 5FU/PS (f) aos 15 dias. Abreviações e símbolos: asteriscos, infiltrado inflamatório; oa, osso alveolar.

Aumento original: a-f: 200x. Barras de escala: 200 μ m. Coloração: hematoxilina e eosina (H&E).

Figura 4

76

Fotomicrografias do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando a magnitude da resposta inflamatória local, o nível de perda óssea alveolar e o processo de reparo periodontal nos grupos 5FU (a), 5FU/RAR (b), 5FU/SSL (c), 5FU/SSS (d), 5FU/PL (e) e 5FU/PS (f) aos 30 dias. Abreviações e símbolos: asteriscos, infiltrado inflamatório; oa, osso alveolar. Aumento original: 200x. Barras de escala: 200 μ m. Coloração: hematoxilina e eosina (H&E).

Figura 5

77

Gráfico mostrando a média e desvio padrão da área de perda óssea alveolar (mm^2) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo, nos diferentes grupos experimentais e períodos de avaliação. Abreviações e símbolos: A, diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos 5FU/SSL e 5FU/SSS, no mesmo período; B, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU/SSL, no mesmo período; C, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU/PL, no mesmo período; D, diferença estatisticamente significativa em relação aos 7 dias, no mesmo grupo; E, diferença estatisticamente significativa em relação

ao grupo 5FU/SSS, no mesmo período; F, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU/PL, no mesmo período; G, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU/PL, no mesmo período; H, diferença estatisticamente significativa em relação aos 7 dias, no mesmo grupo.

Figura 6

78

Imunomarcção para TGF- β 1 na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando a mediana e desvio interquartis dos escores atribuídos ao padrão de imunomarcção para TGF- β 1. (b-g) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TGF- β 1 nos grupos 5FU (b), 5FU/RAR (c), 5FU/SSL (d), 5FU/SSS (e), 5FU/PL (f) e 5FU/PS (g) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: setas, células imunomarcadas; oa, osso alveolar. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μ m. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

Figura 7

79

Imunomarcção para PCNA na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando média e desvio padrão da quantidade de células PCNA-positivas por mm² nos diferentes grupos experimentais e períodos. (b-g) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para PCNA nos grupos

5FU (b), 5FU/RAR (c), 5FU/SSL (d), 5FU/SSS (e), 5FU/PL (f) e 5FU/PS (g) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; A, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU/SSS, no mesmo período; B, diferença estatisticamente significativa em relação aos 30 dias, no mesmo grupo. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm. Contra-coloração: fast green.

Figura 8

80

Imunomarcção para TRAP na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando média e desvio padrão da quantidade de células TRAP-positivas por mm² nos diferentes grupos experimentais e períodos. (b-g) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP nos grupos 5FU (b), 5FU/RAR (c), 5FU/SSL (d), 5FU/SSS (e), 5FU/PL (f) e 5FU/PS (g) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 µm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris

Figura 9

81

Imunomarcção para RANKL na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando a mediana e desvio interquartis dos escores atribuídos ao padrão de imunomarcção para RANKL. (b-g) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para RANKL nos grupos 5FU (b), 5FU/RAR (c), 5FU/SSL (d), 5FU/SSS (e), 5FU/PL (f) e 5FU/PS (g) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: setas, células imunomarcadas; oa, osso

alveolar. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μ m.
Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

Figura 10

82

Imunomarcção para OPG na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando a mediana e desvio interquartis dos escores atribuídos ao padrão de imunomarcção para OPG. (b-g) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OPG nos grupos 5FU (b), 5FU/RAR (c), 5FU/SSL (d), 5FU/SSS (e), 5FU/PL (f) e 5FU/PS (g) aos 30 dias. Abreviações e símbolos: setas, células imunomarcadas; oa, osso alveolar. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μ m.
Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

Figura 11

83

Imunomarcção para OCN na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando a mediana e desvio interquartis dos escores atribuídos ao padrão de imunomarcção para OCN. (b-g) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OCN nos grupos 5FU (b), 5FU/RAR (c), 5FU/SSL (d), 5FU/SSS (e), 5FU/PL (f) e 5FU/PS (g) aos 30 dias. Abreviações e símbolos: setas, células imunomarcadas; oa, osso alveolar. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μ m.
Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.



Lista de Tabela

Lista de Tabela

Tabela 1

84

Análise histopatológica através de escores e porcentagem dos seguintes parâmetros avaliados: intensidade da resposta inflamatória local; extensão do processo inflamatório; reabsorção radicular externa (cimento e dentina); reabsorção óssea alveolar; padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca e padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar da região de furca.



Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Abreviaturas e Siglas

DNA – Ácido desoxiribonucleico.

RNA – Ácido ribonucleico.

5-FU – 5-Fluorouracil.

PO – Perda Óssea.

DP – Doença Periodontal.

RAR- Raspagem e Alisamento Radicular.

PROs – Probióticos.

PRO – Probiótico.

PE – Periodontite Experimental.

SS – Solução Salina.

SSL – Solução Salina Local.

SSS – Solução Salina Sistêmica.

PL – Probiótico Local.

PS – Probiótico Sistêmico.

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético.

μM – Micrometro – uma unidade de medida (a milionésima parte do metro).

HE – Hematoxilina e Eosina.

PBS – Tampão Fosfato Salino.

PCNA – Antígeno Nuclear de Proliferação Celular.

TRAP – Fosfatase Ácida Tartarato Resistente.

OCN – Osteocalcina.

RANKL – Receptor Ativador de NF-Kappa B.

OPG – Osteoprotegerina.

TGF- β 1 – Fator de Crescimento Transformador Beta 1.

IP - Índice de placa

SS - Sangramento à sondagem

PS - Profundidade de sondagem

IG - Índice gengival



Lista de Anexos

Lista de Anexos

| | |
|---|----|
| Anexo A | 86 |
| Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) | |
| Anexo B | 87 |
| Lista de verificação de diretrizes para experimentação animal “ARRIVE Guidelines” | |
| Anexo C | 89 |
| Normas para publicação segundo o Periódico “Journal of Periodontal Research” | |

Efeito da administração local ou sistêmica do *Lactobacillus reuteri*, no tratamento da doença periodontal experimentalmente induzida em ratos, submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil: estudo histopatológico, histométrico e imunoistoquímico

Autores:

¹ Daniela Maria Janjacomio Miessi, CD, Me

¹ Letícia Helena Theodoro, CD, Me, Dr

^{1,2} Valdir Gouveia Garcia, CD, Me, Dr

¹ UNESP, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Área de Periodontia, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, SP, Brasil

² Instituto Latino Americano de Pesquisas e Ensino Odontológico (ILAPEO), Curitiba, PR, Brasil

Autor Correspondente:

Leticia Helena Theodoro

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Rua: José Bonifácio, 1193, Centro; CEP: 16015-050, Araçatuba, SP, Brasil

Telefone: (18) 36362860; e-mail: letheodoro@foa.unesp.br (autorizado para publicação)

Número de figuras: 11

Número de tabela: 1

Número de palavras: 5125

Número de referências: 74

Título: Uso do *Lactobacillus reuteri* no tratamento da periodontite em ratos tratados com 5-FU

Conflito de interesses e declaração de apoio financeiro: Os autores declaram não haver conflitos de interesse. Este estudo obteve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Artigo apresentado em língua portuguesa, nas normas do “Journal of Periodontal Research”.

RESUMO

Introdução e objetivo: Os probióticos (PROs) estão sendo intensamente avaliados na prevenção ou tratamento de doenças da cavidade oral, que estão associadas a uma mudança na composição e atividade microbiana do biofilme e resposta do hospedeiro. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do *Lactobacillus reuteri* aplicado localmente ou sistemicamente como coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico de raspagem e alisamento radicular (RAR), na periodontite experimentalmente induzida em animais submetidos ao tratamento com 5-fluorouracil (5-FU).

Material e Métodos: A indução da periodontite experimental (PE) foi realizada com a colocação de um fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos de 108 ratos, que permaneceu por 7 dias. Todos os animais receberam o quimioterápico no momento da indução da PE (60mg/kg) e 48 horas após (40mg/kg) e foram separados aleatoriamente em 6 grupos com 18 animais cada um, com os seguintes tratamentos: 5FU: sem tratamento local ou sistêmico; 5FU/RAR: receberam tratamento com RAR seguido de 1 aplicação local de solução fisiológica salina (SS; 0,16mL); Grupo 5FU/SSL: RAR e 4 aplicações locais de SS (0,16mL); 5FU/SSS: RAR e 4 gavagens com SS (0,16mL); 5FU/PL: RAR e 4 aplicações locais de PRO (0,16 mL); 5FU/PS: RAR e 4 gavagens com PRO (0,16mL). 6 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamentos. A área da furca dos molares foi submetida às análises histopatológica, histométrica e dos padrões de imunomarcação para TRAP, PCNA, RANKL, OPG, OCN e TGF- β 1. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ($\alpha=5\%$).

Resultados: O grupo 5FU/PS apresentou melhora no processo inflamatório em todos os períodos. Houve maior perda óssea alveolar (PO) nos espécimes do grupo 5FU/SSS comparado ao 5FU/SSL ($p<0,01$) no período de 7 dias de avaliação. No período de 15

dias os espécimes dos grupos 5FU/SSL e 5FU/SSS demonstraram maior PO comparado aos grupos 5FU ($p<0,05$) e 5FU/PS ($p<0,05$). Aos 30 dias a PO mostrou-se maior nos espécimes do grupo 5FU/PL comparado aos grupos 5FU/RAR ($p<0,05$), 5FU/SSS ($p<0,05$) e 5FU/PS ($p<0,05$). Na análise intragrupo houve menor PO no grupo 5FU/RAR e 5FU/PS aos 30 dias em relação aos 7 dias ($p<0,05$). Na imunomarcagem de células TRAP-positivas não foi evidenciada diferença significativa entre os grupos e períodos; houve maior imunomarcagem de células PCNA-positivas aos 7 dias no grupo 5FU/RAR comparado ao 5FU/SSS. Prevaleceu baixo padrão de imunomarcagem de TGF- β 1 e OCN nos grupos 5FU, 5FU/RAR, 5FU/SSL e 5FU/SSS e o grupo 5FU/PS apresentou aos 7 dias um moderado padrão de imunomarcagem e aos 15 e 30 dias um alto padrão de imunomarcagem. Na análise de RANKL prevaleceu um alto padrão de imunomarcagem nos grupos 5FU, 5FU/RAR, 5FU/SSL, 5FU/SSS em todos os períodos e o grupo 5FU/PS apresentou aos 7 e 15 dias um moderado padrão de imunomarcagem e aos 30 dias predominou um padrão de imunomarcagem que variou do moderado ao baixo. Prevaleceu um padrão baixo de imunomarcagem em todos os grupos experimentais e períodos, com exceção dos grupos 5FU/PL e 5FU/PS aos 30 dias (moderado padrão de imunomarcagem) na análise de OPG.

Conclusão: Diante dos resultados obtidos e com a metodologia empregada pode ser concluído que o uso sistêmico do *Lactobacillus reuteri* promoveu redução da inflamação e beneficiou o processo de reparação dos tecidos periodontais, porém não foi capaz de reduzir a PO na região de furca, demonstrando ser uma terapia periodontal coadjuvante promissora em animais submetidos à quimioterapia com 5-FU.

Palavras chaves

Probióticos; doença periodontal; 5-fluorouracil; *Lactobacillus reuteri*

INTRODUÇÃO

Câncer é definido como um grande grupo de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo.¹ Os tratamentos utilizados para o câncer são a quimioterapia, radioterapia, cirurgias ressectivas isoladas ou em combinação, transplante de medula óssea, terapia alvo, hormonioterapia²⁻⁶ e mais recentemente a medicina personalizada (terapia direcionada) e a imunoterapia.⁷⁻⁸ A ocorrência de alterações na cavidade bucal, como mucosite oral, ulcerações, sangramento gengival⁹⁻¹⁰ e disbiose oral,¹¹⁻¹² com aumento do risco de infecção durante a imunossupressão¹³⁻¹⁴ têm sido observadas após alguns destes tratamentos, principalmente durante a quimioterapia e radioterapia.⁹⁻¹² Os tecidos periodontais também podem ser afetados, com ocorrência de inflamação, hipovascularização e fibrose, com conseqüente diminuição da capacidade de reparo e remodelação do periodonto.¹⁵⁻¹⁶

As fluoropirimidinas têm sido amplamente utilizadas no tratamento de tumores malignos, especialmente colorretal, mama, pulmão, pâncreas, fígado, trato gastrointestinal, cabeça e pescoço.¹⁷⁻¹⁹ Sua função é atuar como antimetabólitos, inibindo a biossíntese do DNA e RNA. Entre estes se destaca o 5- fluorouracil (5-FU) cujo mecanismo de ação é atribuído principalmente à incorporação de fluoronucleotídeos em RNA e DNA ou inibição da enzima timidilato sintase.²⁰⁻²¹

Devido a sua atividade citotóxica não seletiva e a sua farmacocinética variada, ainda é possível verificar muitos relatos na literatura de reações adversas relacionadas ao 5-FU, como morte celular por apoptose,²²⁻²³ efeito direto sobre o tecido epitelial, tecido conjuntivo e microbiota bucal,²⁴ além de agravar a progressão da periodontite, promovendo maior perda óssea alveolar (PO) e necroses ósseas extensas.²⁵⁻²⁷

O estabelecimento e a progressão da doença periodontal (DP) é determinada por uma interação complexa entre periodontopatógenos e a resposta inflamatória do hospedeiro.²⁸ A periodontite ocorre após o surgimento de uma disbiose em indivíduos suscetíveis associado à desregulação da resposta do sistema imunológico-inflamatório causando danos ao tecido conjuntivo e PO.²⁹⁻³⁰ Ocorre então, alterações no microbioma em resposta aos produtos inflamatórios gengivais e degradação de tecidos periodontais.³¹ O tratamento não cirúrgico da periodontite consiste na raspagem e alisamento radicular (RAR).³² Porém estudo recente em animais demonstrou que a RAR não é efetiva para o controle da PO em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU,²⁵ sendo necessário métodos coadjuvantes ao tratamento de RAR.

Por outro lado, estudos recentes tem sugerido que os probióticos (PROs) têm o potencial de modificar a microbiota bucal e estão sendo intensamente avaliados na prevenção ou tratamento de doenças da cavidade oral, como cárie dentária e DP, que estão associadas a uma mudança na composição e atividade microbiana do biofilme e resposta do hospedeiro.³³⁻³⁴ Além disso, modulam a atividade imunoinflamatória podendo reduzir a inflamação destrutiva da periodontite e levar à homeostase imune que poderia ser mantida pelo hospedeiro por um longo período.³⁵ Pesquisas recentes têm mostrado resultados satisfatórios no uso de PROs em pacientes com câncer, tendo melhoras em alguns efeitos colaterias causados principalmente por quimioterapia e radioterapia.³⁶⁻³⁷

Contudo, há poucos estudos experimentais que avaliam o efeito do probiótico (PRO) local e sistêmico na DP induzida em animais.³⁸⁻⁴⁷ Esses estudos apresentaram resultados favoráveis com o uso do PRO na redução da PO,³⁹⁻⁴⁷ na recolonização de áreas com periodontite induzida por periodontopatógenos,^{38-40,42,46-47} na melhora da inflamação tecidual^{39-40,42-47} e aumento da efetividade da RAR.^{38-39,43,46-47} Porém, não há estudos na

literatura que avaliaram os efeitos do uso de PROs em animais portadores de DP submetidos a tratamento antineoplásico.

Atualmente, o *Lactobacillus reuteri* é o PRO mais utilizado em estudos clínicos no tratamento da periodontite, com resultados que permitiram concluir que essa espécie de PRO inibe a formação da placa⁴⁸⁻⁵⁴, possui ação anti-inflamatória e antimicrobiana⁴⁸⁻⁵⁵, além de promover a redução significativa da resposta de citocinas pró-inflamatórias, permitindo assim a melhoria dos parâmetros clínicos periodontais⁵⁰⁻⁵⁴. Diante disto, o propósito do presente estudo foi avaliar o efeito do *Lactobacillus reuteri* aplicado localmente ou sistemicamente como coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico de RAR, na periodontite experimentalmente induzida em animais submetidos à quimioterapia com 5-FU.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Este estudo foi realizado em 108 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), machos, adultos (4 meses) com média de peso de 439,55±5,63g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com acesso a ração e água ad libitum. Antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos num ambiente com temperatura estável (22 ± 2°C), com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA; Anexo A) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (Processo FOA nº 2014-00541) e seguiu os princípios do “ARRIVE Guidelines”⁵⁶ (Anexo B).

TRATAMENTO COM 5-FU

Todos os animais do estudo receberam o quimioterápico 5-FU (Fluorouracil, 50 mg/ml – Eurofarma Laboratórios, São Paulo, Brasil) administrado por injeção intraperitoneal realizada em dois momentos: no dia da indução de periodontite experimental (PE) e 48 horas após. Foi utilizado a dose de 60 mg/kg de peso corporal do animal (primeira aplicação) e 40 mg/kg de peso corporal do animal (segunda aplicação; Figura 1).²⁶

Indução da Periodontite Experimental

Para todos os procedimentos os animais foram anestesiados por injeção intramuscular da associação de 80 mg/kg de cloridrato de ketamina (Cetamim, Syntec, Santana do Parnaíba, São Paulo, Brasil) e 6 mg/kg de cloridrato de xilazina (Zilazin, Syntec, Santana do Parnaíba, São Paulo, Brasil), aplicada via intramuscular no bíceps femoris da pata direita. A PE foi induzida por meio da instalação de um fio de algodão (Corrente Algodão nº. 24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos⁴⁹ e a seguir, os animais foram aleatoriamente distribuídos em 6 (seis) grupos, seguindo uma tabela gerada em computador, de acordo com os seguintes tratamentos realizados nos primeiros molares inferiores esquerdos: 5FU (n=18): em tratamento local ou sistêmico; 5FU/RAR (n=18): receberam tratamento com RAR seguido de 1 irrigação local com solução fisiológica salina (SS; 0,16mL); 5FU/SSL (n=18): RAR e 4 irrigações locais com SS (0,16mL); 5FU/SSS(n=18): RAR e 4 sessões de gavagens com SS (0,16mL); 5FU/PL (n=18): RAR e 4 irrigações locais de PRO *Lactobacillus reuteri* (0,16mL); 5FU/PS (n=18): RAR e 4 sessões de gavagens com PRO *Lactobacillus reuteri* (0,16mL).

TRATAMENTO COM RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULAR

Após 7 dias da indução da PE, a ligadura foi removida e os primeiros molares esquerdos dos animais dos grupos 5FU/RAR, 5FU/SSL, 5FU/SSS, 5FU/PL e 5FU/PS receberam tratamento de RAR com curetas manuais (mini-five 1-2; Hu-Friede Co. Inc., Chicago, IL, EUA) através de 10 movimentos de tração disto-mesial nas faces vestibular e lingual. As áreas interproximais e de furca foram raspadas com as mesmas curetas através de movimentos de tração cérvico-oclusais.⁵⁷ Os procedimentos de RAR foram realizados por um mesmo operador experiente, treinado e cego aos grupos experimentais (DMJM).

Tratamento com SS ou PRO

Os animais do grupo 5FU/PL e 5FU/PS receberam além do tratamento mecânico (RAR), o tratamento com *Lactobacillus reuteri* (*Lactobacillus reuteri* DSM17938 Colikids, BioGaia, Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., Guarulhos, São Paulo, Brasil) iniciada logo após a remoção da ligadura e RAR. Os animais do grupo 5FU/PL receberam o PRO por irrigação local, sendo que esta aplicação foi mantida a cada dois dias até o 6º dia após remoção da ligadura e tratamento, totalizando 4 tratamentos para cada animal (0, 48, 96, 144 horas). Cada aplicação local teve a dose diária recomendada pelo fabricante para o uso clínico em humanos (0,16mL), o equivalente a 100 milhões de bactérias, que foi depositado na interface gengiva marginal – parede radicular (bolsa periodontal), por intermédio de seringa (1 mL) e agulha de insulina (13 mm x 4,5 mm) sem bisel. Foi confeccionada uma barreira com gaze na face lingual dos animais, para que não houvesse a ingestão do PRO. Os animais do grupo 5FU/PS receberam o PRO por gavagem, sendo que esta aplicação foi realizada nos mesmos períodos e dosagem do grupo anterior, que foi depositado diretamente no tubo gástrico do animal por meio de uma cânula de irrigação.

Os animais dos grupos 5FU/RAR, 5FU/SSL e 5FU/SSS receberam além do tratamento mecânico (RAR), o tratamento com SS, sendo que nos animais do grupo 5FU/RAR, foi realizada uma única irrigação local logo após a RAR. Os animais dos grupos 5FU/SSL e 5FU/SSS receberam a SS seguindo os mesmos protocolos utilizados para os grupos 5FU/PL e 5FU/PS, respectivamente.

Períodos Experimentais

Seis animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia pela injeção intramuscular de dose letal de tiopental 150 mg/kg (Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) associada a cloridrato de lidocaína 2% 10mg/kg (Novafarma Indústria Farmacêutica Ltda, Anápolis, GO, Brasil) aos 7, 15 e 30 dias após a realização dos tratamentos. As hemimandíbulas esquerdas foram dissecadas e fixadas em formaldeído 4% em solução tamponada de 0,1 M, durante 48 horas, para realização das análises histopatológica, histométrica e imunoistoquímica.

Processamento laboratorial

Os espécimes foram submetidos à desmineralização em 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) durante 60 dias. Na sequência foram desidratados, diafanizados, impregnados e incluídos em parafina e seccionadas em micrótomo (4 µm de espessura), no sentido méso-distal, com o cuidado de sempre estarem no longo eixo do dente.⁴⁹ Foram coletados os cortes seriados da região de furca do primeiro molar inferior esquerdo, os quais foram montados em lâminas de vidro.

Para as análises histopatológica e histométrica as secções histológicas foram submetidas à coloração pela técnica da hematoxilina-eosina (HE). Para a análise imunoistoquímica os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato 0,1 M, pH 7,4 (Diva decloaker[®], Biocare Medical,

Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber[®], Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em seis lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) do rato gerado em camundongo (VP-P980, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA), anti-OCN (Osteocalcina) do rato gerado em cabra (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) anti-TRAP (Fosfatase Ácida Tartarato Resistente) do rato gerado em cabra (SC-30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-RANKL (Receptor Ativador de NF-Kappa B) do rato gerado em cabra (SC-7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-OPG (Osteoprotegerina) do rato gerado em cabra (SC-8468, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e anti-TGF- β 1 (Fator de Crescimento Transformador Beta 1) do rato gerado em coelho (SC-146 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 2 horas (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit[®], Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit[®], Dako Laboratories, CA, EUA). Foi realizada a contracoloração com Fast Green para PCNA e *Hematoxilina de Harris* para TRAP, OCN, RANKL, OPG e TGF- β 1, desidratação, diafanização e proteção com meio de montagem e lamínulas de vidro.⁵⁷

Análise histopatológica

Um histologista certificado (EE) e cego aos tratamentos, realizou a análise histopatológica. Os seguintes parâmetros foram avaliados: intensidade da resposta inflamatória local; extensão do processo inflamatório; reabsorção radicular externa (cimento e dentina); reabsorção óssea alveolar; padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca e padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar da região de furca.⁵⁸ As análises foram realizadas utilizando um sistema de escores e os dados apresentados em porcentagem (Tabela 1).

Análise histométrica

Foi utilizado um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Alemanha) para mensurar a área de PO em mm² na região de furca.⁵⁷ Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca era evidente, três cortes equidistantes de cada espécime foram selecionados para análise histométrica. Esta seleção foi realizada por um examinador treinado e cego ao tratamento efetuado (EE). Outro examinador calibrado e cego ao tratamento efetuado realizou a análise histométrica (DMJM). A PO de cada espécime foi medida três vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados e obter uma média por espécime.⁵⁷ As médias e desvio-padrão dos valores foram obtidas e os dados foram comparados por meio de análise estatística.

Análise Imunoistoquímica

Um examinador treinado e cego aos tratamentos (DMJM) selecionou uma secção histológica de cada um dos biomarcadores de cada espécime. Um histologista certificado (EE) e cego aos tratamentos realizou as análises imunoistoquímicas. Os valores de escores de cada espécime foram medidos 3 vezes pelo mesmo avaliador em diferentes dias para reduzir a variação dos dados. A imunomarcação foi definida como aquela de coloração

acastanhada presente no compartimento citosólico das células positivas para TRAP e núcleo para PCNA. As células imunomarcadas por TRAP e PCNA localizadas no centro do septo interradicular do primeiro molar inferior esquerdo de uma área de 1000 μ m x 1000 μ m, com um aumento de 200x⁵⁷ foram quantificadas. O limite coronário desta área foi a crista óssea alveolar, a partir da qual se estendia apicalmente por uma distância de 1000 μ m.⁵⁷

Para RANKL, OCN, OPG e TGF- β 1 foi realizada uma análise semiquantitativa da imunomarcção em toda a área de furca: escore 0 – ausência de imunomarcção (ausência total de células-imunorreativas –IR); escore 1 – baixo padrão de imunomarcção (1/4 das células –IR); escore 2 – moderado padrão de imunomarcção (1/2 das células –IR); escore 3 – alto padrão de imunomarcção (3/4 das células –IR).⁵⁷

Calibração do Examinador

Antes da análise histométrica e imunoistoquímica ser iniciada, um examinador foi treinado e calibrado (DMJM). Para isso realizou duas medições da PO e contagem de TRAP de 30 espécies, com intervalo de uma semana entre elas. As medidas foram analisadas para verificar o grau de concordância com nível de 5% de significância, utilizando coeficiente de correlação de Pearson que apresentou um alto grau de correlação (0,95).⁵⁸

Análise estatística

As análises foram realizadas com o software Bioestat (Bioestat, Instituto Mamirauá, Manaus, Brasil), versão 5.3 com nível de significância de 5%. O resultado do cálculo para o tamanho da amostra de 6, demonstrou um poder de estudo de 80% ($p < 0,05$).²⁶ Todos os dados quantitativos foram submetidos previamente ao teste de normalidade Shapiro Wilk ($p < 0,05$). As análises intra e inter grupo de PO foram feitas com análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$). Quando o teste ANOVA detectou uma diferença

estatisticamente significativa, foram feitas comparações múltiplas usando o teste de Tukey ($p < 0,05$). Para os dados não-paramétricos de imunomarcação da quantidade de células TRAP-positivas e PCNA-positivas foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. Este teste foi seguido pelo teste Dunn, quando o teste Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$). Para os escores de RANKL, OPG, OCN e TGF- β 1 foi realizada análise descritiva dos resultados.

Resultados

Análise clínica

Foram utilizados no estudo animais adultos (4 meses), obtidos os pesos dos animais no início ($439,55 \pm 5,63$ g) e no final do experimento ($437,22 \pm 1,08$ g) e observou-se que não houve mudança significativa de peso entre os períodos inicial e de eutanásias. Alguns animais apresentaram diarreia, hemorragia orbital e abscessos decorrentes do uso do quimioterápico no período dos tratamentos. Não houve intercorrências durante os tratamentos com PRO.

Análise histopatológica

Os resultados da análise histopatológica estão demonstrados na tabela 1. Na análise histopatológica observou-se que o grupo 5FU apresentava aos 7, 15 e 30 dias um intenso infiltrado inflamatório que ocupava todo o tecido conjuntivo e ósseo da região de furca, com a presença de grande quantidade de células inflamatórias e severa destruição da matriz extracelular. Muitas espículas de osso necrosado estavam presentes, com muitas áreas de reabsorção ativas. Todos os espécimes apresentavam destruição e desestruturação tecidual severa do tecido conjuntivo e tecido ósseo com trabéculas ósseas de contorno bastante irregular e osso necrótico na região de furca (Figuras 2, 3 e 4).

Os espécimes dos grupos 5FU/RAR, 5FU/SSL, 5FU/SSS e 5FU/PL apresentaram aos 7 e 15 dias um intenso infiltrado inflamatório que ocupava todo o tecido conjuntivo e ósseo da região de furca, com a presença de grande quantidade de células inflamatórias (Figuras 2 e 3). Aos 30 dias, houve uma melhora na inflamação em alguns espécimes, mas a maioria manteve um infiltrado inflamatório bastante intenso (Figura 4). Todos os espécimes dos grupos 5FU/RAR e 5FU/SSS apresentaram aos 7, 15 e 30 dias, muitas áreas de reabsorção ativas e aos 7 dias grande quantidade de áreas de reabsorção óssea, com uma discreta melhora aos 15 e 30 dias (Figuras 2, 3 e 4). A maioria dos espécimes apresentaram desestruturação tecidual severa aos 7 e 15 dias e aos 30 dias foi observado uma pequena quantidade de fibroblastos e fibras colágenas (Figuras 2, 3 e 4). Aos 7 dias, a maioria dos espécimes apresentaram tecido ósseo com áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular (Figura 2). Aos 15 e 30 dias manteve-se o mesmo padrão, porém ausência de osso necrótico (Figuras 3 e 4). Nos espécimes dos grupos 5FU/SSL e 5FU/PL, a maioria apresentavam aos 7 e 15 dias muitas áreas de reabsorção ativas, o que se manteve no grupo 5FU/SSL aos 30 dias, enquanto no grupo 5FU/PL os espécimes apresentavam poucas áreas de reabsorção ativas (Figuras 2, 3 e 4). O grupo 5FU/SSL, apresentou a maioria dos espécimes com desestruturação tecidual severa aos 7 e 15 dias e aos 30 dias, a maioria com uma pequena quantidade de fibroblastos e fibras colágenas, enquanto no grupo 5FU/PL foi observado, desestruturação tecidual severa aos 7 dias, com melhora progressiva aos 15 e 30 dias, com ausência de áreas de osso necrótico (Figuras 2, 3 e 4).

Nos espécimes do grupo 5FU/PS foi observado aos 7 dias um intenso infiltrado inflamatório que ocupava o tecido conjuntivo e ósseo da região de furca, com grande quantidade de células inflamatórias. Todos os espécimes apresentaram poucas áreas de reabsorção externa e de reabsorção óssea alveolar e pequena quantidade de fibroblastos e

fibras colágenas. O septo interradicular se mostrou constituído por trabéculas ósseas de contorno irregular, porém alguns espécimes apresentavam muitos osteoblastos ativos e fibras colágenas (Figura 2). Aos 15 e 30 dias houve uma redução no volume ocupado pelo infiltrado inflamatório e os tecidos se mostraram mais organizados, com poucas áreas de reabsorção. O tecido conjuntivo se mostrava composto por pequena quantidade de fibras colágenas e fibroblastos. O tecido ósseo do septo interradicular se apresentou composto por trabéculas ósseas mais espessas e muitos osteoblastos em atividade (Figura 3 e 4).

Análise histométrica

Os resultados da análise histométrica estão apresentados na Figura 5. Houve maior PO na área de furca nos animais do grupo 5FU/SSS quando comparado com os espécimes do grupo 5FU/SSL ($p < 0,01$) no período de 7 dias de avaliação. No período de 15 dias os espécimes dos grupos 5FU/SSL e 5FU/SSS demonstraram maior PO que os espécimes dos grupos 5FU ($p < 0,05$) e 5FU/PS ($p < 0,05$). Aos 30 dias a PO mostrou-se maior nos espécimes do grupo 5FU/PL quando comparado aos grupos 5FU/RAR ($p < 0,05$), 5FU/SSS ($p < 0,05$) e 5FU/PS ($p < 0,05$). Na análise intragrupo houve menor PO no grupo 5FU/RAR e 5FU/PS aos 30 dias em relação aos 7 dias ($p < 0,05$).

Análise imunoistoquímica

Na análise dos resultados imunoistoquímicos, observou-se que prevaleceu baixo padrão de imunomarcção de TGF- β 1 nos grupos 5FU, 5FU/RAR, 5FU/SSL e 5FU/SSS em todos os períodos (escore 1). O grupo 5FU/PS apresentou aos 7 dias um moderado padrão de imunomarcção (escore 2) e aos 15 e 30 dias um alto padrão de imunomarcção (escore 3), enquanto o grupo 5FU/PL apresentou um moderado padrão (escore 2) de imunomarcção aos 7, 15 e 30 dias (Figura 6).

A imunomarcção de células PCNA-positivas e TRAP-positivas foram expressas predominantemente em células conjuntivas e da superfície óssea. Houve maior número de células PCNA-positivas aos 7 dias nos espécimes do grupo 5FU/RAR comparado ao grupo 5FU/SSS ($p < 0,05$) e no grupo 5FU/RAR aos 30 dias comparado aos 7 dias ($p < 0,01$) e 15 dias ($p < 0,05$) no mesmo grupo (Figura 7). Com relação as células TRAP-positivas prevaleceram um padrão similar de imunomarcção em todos os grupos e períodos não havendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$; Figura 8).

Na análise de RANKL prevaleceu um alto padrão de imunomarcção nos grupos 5FU, 5FU/RAR, 5FU/SSL, 5FU/SSS em todos os períodos (score 3), enquanto no grupo 5FU/PL prevaleceu aos 7 dias um alto padrão de imunomarcção (score 3) e moderado padrão de imunomarcção aos 15 e 30 dias (score 2). O grupo 5FU/PS apresentou aos 7 e 15 dias um moderado padrão de imunomarcção (score 2) e aos 30 dias predominou um padrão de imunomarcção que variou do moderado ao baixo (scores 1 e 2; Figura 9).

Na análise de OPG prevaleceu um padrão baixo de imunomarcção em todos os grupos experimentais e períodos (score 1), com exceção dos grupos 5FU/PL e 5FU/PS aos 30 dias que apresentaram um moderado padrão de imunomarcção (score 2; Figura 10).

Com relação a OCN nos grupos 5FU, 5FU/RAR, 5FU/SSL e 5FU/SSS prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção em todos os períodos (score 1). O grupo 5FU/PS apresentou aos 7 dias um moderado padrão de imunomarcção (score 2) e aos 15 e 30 dias um alto padrão de imunomarcção (score 3), enquanto o grupo 5FU/PL apresentou um moderado padrão de imunomarcção em todos os períodos (score 2; Figura 11).

Discussão

O presente estudo avaliou o uso do *Lactobacillus reuteri* aplicado localmente ou sistemicamente como coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico de RAR, na periodontite experimentalmente induzida em animais submetidos ao tratamento com 5-FU. Estudos em animais têm demonstrado que o 5-FU causa mucosite oral,⁵⁹⁻⁶⁰ hipofunção da glândula salivar⁶⁰ e agrava a progressão da periodontite com grande destruição óssea.²⁵⁻²⁷ No presente estudo, nos animais do grupo 5FU, que receberam apenas o quimioterápico, houve uma grande destruição e desorganização de todos os tecidos periodontais, com presença de espículas ósseas necróticas e intenso infiltrado inflamatório. Esses resultados corroboram resultados de estudos anteriores de nosso grupo que mostraram destruição severa do osso alveolar em ratos com periodontite induzida por ligadura com o uso do antineoplásico.²⁵⁻²⁷ Outros estudos⁹⁻¹⁰ mostraram que o 5-FU apresenta uma alta toxicidade para a mucosa bucal com danos ao tecido epitelial e apoptose celular, o que facilitaria a penetração de bactérias e seus subprodutos para o interior dos tecidos periodontais, contribuindo para agravar a progressão da DP conforme observado na presente pesquisa.

Segundo estudo recente,¹⁷ a toxicidade do 5-FU é diretamente proporcional à dose administrada ao paciente, podendo ocorrer toxicidade grave ou desenvolvimento de resistência ao medicamento, com redução da sua eficácia como monoterapia. Em estudo recente de nosso grupo, a dose do 5-FU utilizada no presente estudo (60mg/kg e 40mg/kg) mostrou ser suficiente para promover efeitos sistêmicos em ratos.²⁶

Também ficou evidente no estudo que além do uso do quimioterápico, o efeito do estresse promoveu danos significantes aos tecidos periodontais. Os resultados do presente estudo demonstraram que nos grupos com maior manipulação dos animais (5FU/SSL, 5FU/SSS, 5FU/PL) com exceção do grupo dos animais tratados sistemicamente com

PRO, houve maior PO comparado aos grupos 5FU e 5FU/RAR. Além disso, foi observado que esses grupos apresentaram intenso infiltrado inflamatório, com desestruturação tecidual severa, áreas de reabsorção ativas e pequena quantidade de fibroblastos e fibras colágenas. Tais achados podem ser justificados pela participação do fator estresse na progressão de algumas doenças que alteram a resposta imune causando danos ao sistema endócrino, com aumento de corticosteróides e catecolaminas e alteração na resistência do hospedeiro, com redução da microcirculação gengival e do fluxo salivar, interferindo na função dos neutrófilos e linfócitos facilitando a invasão e danos teciduais.

61

No presente estudo os resultados demonstraram que houve redução do processo inflamatório, de áreas com reabsorção ativa, da osteoclastogênese e da PO alveolar na região da furca nos animais tratados sistemicamente no grupo 5FU/PS aos 30 dias comparado aos 7 dias. Outros estudos recentes avaliaram uso de PROs na atenuação, em nível celular, do desenvolvimento de neurotoxicidade induzida por quimioterapia,⁶² no controle da disbiose oral⁶³⁻⁶⁴ e na redução dos sintomas gastrointestinais³⁶ de pacientes submetidos ao tratamento de câncer. Porém alguns fatores devem ser considerados antes da suplementação probiótica, como dose de irradiação, estágio da doença e sintomatologia de cada paciente. Estudos com PROs em modelos animais tratados com antineoplásicos, têm demonstrado que essas bactérias benéficas podem fornecer proteção contra o estresse oxidativo e desregulação protéica relacionada à apoptose,⁶⁵ controlar a mucosite intestinal,⁶⁶ além de serem usados com sucesso como vetores para a liberação de antígenos, moléculas imunoestimuladoras ou enzimas que limitam a toxicidade da quimioterapia convencional.⁶⁷ Outro estudo recente avaliou o efeito do PRO sistêmico no controle da disbiose durante tratamento antineoplásico e observaram que o uso de PROs pode limitar os efeitos colaterais indesejados de vários agentes antineoplásicos.⁶⁸

Por outro lado, estudos com PROs em animais sistemicamente saudáveis, demonstraram redução significativa da PO, quando comparado ao tratamento convencional ou ao grupo sem tratamento em ratos, quando utilizaram o *Bacillus subtilis*,^{41-42,45} *Lactobacillus brevis*,⁴³ *Sacharomyces cerevisiae*,⁴⁴ *Bifidobacterium lactis*⁴⁶⁻⁴⁷ com irrigação local. No presente estudo, o grupo tratado com o PRO localmente não mostrou efetividade no controle da PO nos períodos avaliados. Estas discrepâncias de resultados podem estar relacionadas à grande heterogeneidade entre os estudos em relação às doses utilizadas, o tempo de duração dos tratamentos, diferentes espécies de PROs e de formas distintas de administração, além de serem estudos realizados em animais saudáveis, o que difere do presente estudo realizado em animais submetidos à quimioterapia com 5-FU, reforçando que o uso do quimioterápico agrava a resposta biológica na área de furca. Além disso, estudo recente em ratos⁴² demonstrou que o stress provoca efeitos importantes no trato gastrointestinal, incluindo secreção de íons alterada, aumento da permeabilidade epitelial e maior translocação bacteriana, efeitos controlados pelo PRO administrado sistemicamente.

Do ponto de vista da avaliação imunoistoquímica enquanto que nos grupos não tratados com PRO houve baixo padrão de imunomarcção de TGF- β 1 e OCN, observou-se que houve no grupo 5FU/PS aos 7 dias um moderado padrão de imunomarcção (escore 2) e aos 15 e 30 dias um alto padrão de imunomarcção (escore 3), enquanto no grupo 5FU/PL houve moderado padrão em todos os períodos. Tais achados demonstraram que houve um aumento da diferenciação celular em osteoblastos nos grupos tratados com PRO, com mais intensidade nos animais que receberam o tratamento sistêmico. Estes benefícios no processo de reparação tecidual podem ser justificados pelo maior controle do processo inflamatório nos animais tratados com o PRO, devido à capacidade de interferir na resposta inata e adquirida através de imunomodulação pelo controle da

atividade de metaloproteinases, responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, além da possibilidade de promover inibição competitiva com agentes periodontopatógenos.⁶⁹

Esses resultados corroboram achados de outros estudos⁷⁰⁻⁷¹ que demonstraram aumento da atividade de fatores de crescimento na regeneração tecidual em fibroblastos gengivais. TGF- β 1 são potentes fatores de crescimento osteoindutivo e estão presentes durante as fases iniciais da cicatrização da ferida e apresenta uma atividade biológica altamente diversificada, incluindo a atividade quimiotática e mitogênica de lesões gengivais e periodontais em fibroblastos ligamentares e a regulação positiva de componentes da membrana extra-celular como colágeno, fibronectina, tenascina e proteoglicanos, desempenhando um importante papel na reconstrução de um ligamento periodontal saudável e regeneração periodontal por sua capacidade de promover tanto osso novo como nova formação de cimento.⁷⁰⁻⁷¹

Na análise quantitativa de células PCNA-positivas, observamos que houve maior número aos 7 dias nos espécimes do grupo 5FU/RAR comparado ao grupo 5FU/SSS e aos 30 dias nos animais do grupo 5FU/RAR comparado aos 7 e 15 dias do mesmo grupo, fato que demonstra que o tratamento mecânico de RAR atrasou a proliferação celular, corroborando resultados de estudo recente de nosso grupo⁴⁴ que demonstrou haver um atraso na reparação tecidual causado pelo trauma da raspagem.

Na análise de RANKL houve alto padrão de imunomarcção (score 3) em todos os grupos e períodos, com exceção dos grupos tratados com PRO que apresentaram prevalência de moderado padrão de imunomarcção (score 2). Para OPG, prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção (score 1) em todos os grupos e períodos, com exceção dos grupos 5FU/PL e 5FU/PS aos 30 dias, com moderado padrão de imunomarcção (score 2). Na imunomarcção de células TRAP-positivas, prevaleceu um padrão similar

em todos os grupos e períodos não havendo diferença estatisticamente significativa entre grupos e períodos. Esses resultados corroboram os resultados de outros estudos de nosso grupo em animais tratados com 5-FU,²⁵⁻²⁷ que demonstraram resultados semelhantes, fato que pode ser explicado pela estimulação da osteoclastogênese, aumento da capacidade reabsortiva de osteoclastos maduros e aumento do número de osteoclastos em tecido ósseo, induzindo à condição de inflamação. Além disso, resultados de outro estudo⁷² mostrou que o 5-FU é citotóxico aos osteoblastos e seus precursores, induzindo uma condição inflamatória no tecido ósseo que regula os níveis de citocinas pró-inflamatórias capazes de recrutamento de osteoclastos, sugerindo que o 5-FU aumenta a presença de osteoclastos no tecido ósseo. Por outro lado, os grupos tratados com PRO apresentaram melhores resultados no controle da inflamação provavelmente pela atuação dessas bactérias benéficas na inibição da atividade da elastase polimorfonuclear e da matrix metaloproteinase durante o processo inflamatório, o que corrobora resultados de estudos PRO em animais sistemicamente normais.^{42,46}

O *Lactobacillus reuteri* utilizado no presente estudo, têm sido o PRO mais utilizado em estudos clínicos⁵⁰⁻⁵⁴, para o tratamento da periodontite. Esse PRO além da ação antiinflamatória pela regulação da liberação de citocinas pró-inflamatórias através do processo de imunomodulação, liberação de bacteriocinas e atividade antimicrobiana, possui características exclusivas como produção de reuterina e reuterociclina, além de regular positivamente os níveis do hormônio oxitocina que beneficia reparações de tecidos, cicatrização de feridas⁷³ e modula o sistema imunitário em patologias associadas à inflamação, câncer e saúde reprodutiva⁷⁴. Esses autores⁷⁴ sugerem que o *Lactobacillus reuteri* ingeridos alteram o sistema imune em todo o organismo e servem para neutralizar uma predisposição genética ao câncer, mesmo dentro do microambiente tumoral.

Apesar do estudo ter sido realizado em animais e não haver uma dose recomendada que possa ainda ser transportada para estes animais, pode-se observar claramente que a dose sistêmica utilizada, proposta para uso em crianças (0,16 mL) com dias de tratamentos alternados, totalizando 4 aplicações, até o sexto dia de tratamento, promoveu melhora no processo inflamatório nos grupos tratados com *Lactobacillus reuteri*.

Ainda com relação à posologia, estudo clínico⁴⁹ utilizando o *Lactobacillus reuteri* em pastilhas uma vez ao dia por 14 dias demonstrou apenas efetividade deste PRO no controle do índice de placa (IP) em pacientes com gengivite moderada e severa. Outros estudos^{50,54} com o mesmo PRO, administrado duas vezes ao dia durante 21 dias, obtiveram resultados significantes na redução de parâmetros clínicos periodontais como sangramento à sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS), IP e índice gengival (IG) e não obtiveram efeitos adversos ao tecido, o que pode ser possível pelo efeito anti-inflamatório dos PROs.

Outros autores⁵⁵ investigaram o efeito clínico de gomas de mascar contendo a mesma bactéria probiótica, duas vezes ao dia, no controle da inflamação e no nível de mediadores inflamatórios no fluido crevicular gengival de pacientes com gengivite, tendo como resultado uma redução nos parâmetros clínicos de IG e sangramento gengival. Tais achados clínicos fortalecem as propriedades anti-placa e antimicrobiana na inibição da colonização de patógenos no tecido do hospedeiro pelo mecanismo de competição e efeito anti-inflamatório dos PROs. Por outro lado, o medicamento utilizado no presente estudo, possui em sua composição uma única cepa do *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938), enquanto outros estudos⁵⁰⁻⁵² com resultados promissores na redução da PS, utilizaram a combinação de duas cepas (DSM 17938 e ATCC PTA 5289) por um período mais longo.

Na análise comparativa do uso do *Lactobacillus reuteri* no tratamento periodontal ainda deve-se considerar que além da metodologia do presente estudo ter sido empregada

em modelo animal, houve a interferência de uma droga quimioterápica nestes animais para simular o efeito deste tipo de PRO em condições de imunossupressão pelo efeito de quimioterapia. Tais fatos justificam a necessidade de realização de outros estudos experimentais que avaliem outros protocolos e posologias de uso do *Lactobacillus reuteri* em condições sistêmicas adversas.

Conclusão

Diante dos resultados obtidos e com a metodologia empregada pode ser concluído que o uso sistêmico do *Lactobacillus reuteri* promoveu redução da inflamação e beneficiou o processo de reparação dos tecidos periodontais, porém não foi capaz de reduzir a PO na região de furca, demonstrando ser uma terapia periodontal coadjuvante promissora em animais submetidos à quimioterapia com 5-FU.

Agradecimentos

Este estudo obteve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Ministério da Educação (CAPES - MEC) por meio de bolsa de Doutorado. O estudo foi contemplado com bolsa de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq). Os autores desse estudo não relataram conflito de interesse e agradecem aos Departamentos de Cirurgia e Clínica Integrada e Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pela estrutura disponibilizada para realização do estudo.

Referências

- 1- Herceg Z, Ghantous A, Wild CP *et al.* Roadmap for investigating epigenome deregulation and environmental origins of câncer. *Int J Cancer* 2018 Mar 1; 142(5): 874-882. IARC – International Agency for Research on Cancer. <https://www.iarc.fr>.
- 2- Chiorean EG, Colever AL. Pancreatic cancer: optimizing treatment options, new, and emerging targeted therapies. *Drug Des Devel Ther* 2015 Jul 7; 9: 3529-45.
- 3- Xu JL, Jin B, Ren ZH *et al.* Chemotherapy plus Erlotinib versus Chemotherapy Alone for Treating Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2015 Jul 6; 10(7):e0131278 doi: 10.1371/journal.pone.0131278.
- 4- Diaby V, Tawk R, Sanogo V, Xiao H, Montero AJ. A review of systematic reviews of the cost-effectiveness of hormone therapy, chemotherapy, and targeted therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015 May; 151(1): 27–40.
- 5- Koizumi M, Yamada T, Shinji S *et al.* Feasibility of Neoadjuvant FOLFOX Therapy Without Radiotherapy for Baseline Resectable Rectal Cancer. *In Vivo* 2018 Jul-Aug; 32(4):937-943.
- 6- de Lima M, Oran B, Champlin RE *et al.* CC-486 Maintenance After Stem Cell Transplantation in Patients with Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018 Jun 19; pii: S1083-8791(18)30328-8. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.06.016.
- 7- Ernst B, Anderson KS. Immunotherapy for the treatment of breast cancer. *Curr Oncol Rep* 2015 Feb; 17(2):5. doi: 10.1007/s11912-014-0426-9.
- 8- Segatori VI, Cuello HA, Gulino CA *et al.* Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by active immunotherapy based on racotumomab in non-

- small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2018 Jun 23. doi: 10.1007/s00262-018-2188-y.
- 9- Lalla RV, Saunders DP, Peterson DE. Chemotherapy or radiation-induced oral mucositis. *Dent Clin North Am* 2014 Apr; 58(2): 341-9.
- 10- Miranzadeh S, Adib-Hajbaghery M, Soleymanpoor L, Ehsani M. A New mouthwash for Chemotherapy Induced Stomatitis. *Nurs Midwifery Stud* 2014 Sep; 3(3):e20249.
- 11- Singh GK, Capoor MR, Nair D, Bhowmik KT. Spectrum of fungal infection in head and neck cancer patients on chemoradiotherapy. *J Egypt Natl Canc Inst* 2017 Mar; 29(1): 33-37.
- 12- Hou J, Zheng H, Li P, Liu H, Zhou H, Yang X. Distinct shifts in the oral microbiota are associated with the progression and aggravation of mucositis during radiotherapy. *Radiother Oncol* 2018 May 4. pii: S0167-8140(18)30214-7. doi: 10.1016/j.radonc.2018.04.023.
- 13- Silva IH, Faria AB, Fonseca DD *et al.* Noma in an immunocompromised patient. *Gen Dent* 2013 Nov-Dec;61(7):e34-6.
- 14- Triplett J, Hee G, McLean-Tooke A, Lucas M. Long-term control of laryngeal plasma cell mucositis with systemic immunosuppression. *BMJ Case Rep* 2018 Jun 20; pii: bcr-2017-221333. doi: 10.1136/bcr-2017-221333.
- 15- Bueno AC, Ferreira RC, Barbosa FI, Jham BC, Magalhães CS, Moreira AN. Periodontal care in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer. *Support Care Cancer* 2013 Apr; 21(4): 969-75.
- 16- Schuurhuis JM, Stokman MA, Witjes MJH *et al.* Patients with advanced periodontal disease before intensity-modulated radiation therapy are prone to

- develop bone healing problems: a 2-year prospective follow-up study. *Support Care Cancer* 2018 Apr; 26(4):1133-1142.
- 17- Nies AT, Magdy T, Schwab M, Zanger UM. Role of ABC transporters in fluoropyrimidine-based chemotherapy response. *Adv Cancer Res* 2015; 125:217-43.
- 18- Sasada S, Miyata Y, Mimae T, Tsutani Y, Mimura T, Okada M. Application of Lepidic Component Predominance to Adjuvant Chemotherapy with Oral Fluoropyrimidines for Stage I Lung Adenocarcinoma. *Clin Lung Cancer* 2016 Sep; 17(5):433-440.
- 19- Traylor M, Walker JL, Corrigan AA *et al.* Exome array analysis of adverse reactions to fluoropyrimidine-based therapy for gastrointestinal cancer. *PLoS One* 2018 May 1; 13(5):e0188911. doi: 10.1371/journal.pone.0188911.
- 20- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003 May; 3(5):330-8.
- 21- Singh V, Brecik M, Mukherjee R *et al.* The complex mechanism of antimycobacterial action of 5-fluorouracil. *Chem Biol* 2015 Jan 22; 22(1):63-75.
- 22- Yoshida K, Yoshioka M, Okamura H. Preventive Effect of Daiokanzoto (TJ-84) on 5-Fluorouracil-Induced Human Gingival Cell Death through the Inhibition of Reactive Oxygen Species Production. *PLoS One* 2014 Nov 12; 9(11):e112689. doi: 10.1371/journal.pone.0112689.
- 23- Güçlü H, Doganlar ZB, Gürlü VP *et al.* Effects of cisplatin-5-fluorouracil combination therapy on oxidative stress, DNA damage, mitochondrial apoptosis, and death receptor signalling in retinal pigment epithelium cells. *Cutan Ocul Toxicol* 2018 Apr 19; 1-14. doi: 10.1080/15569527.2018.1456548.

- 24- Vanlancker E, Vanhoecke B, Smet R, Props R, de Wiele TV. 5-Fluorouracil sensitivity varies among oral micro-organisms. *J Med Microbiol* 2016 Aug; 65(8):775-83.
- 25- Garcia GV, 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.
- 26- 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.
- 27- 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.
- 28- Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG, Working group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions-consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2011 Mar; 38 Suppl 11: 44-8.
- 29- Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* 2015 Oct; 69(1): 7-17.
- 30- Chapple IL, Bouchard P, Cagetti MG *et al.* Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2017 Mar; 44 Suppl 18: S39-S51.

- 31- Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol* 2018 Jun; 89 Suppl 1: S159-S172.
- 32- Belinello-Souza EL, Alvarenga LH, Lima-Leal C. Antimicrobial photodynamic therapy combined to periodontal treatment: Experimental model. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2017 Jun; 18: 275-278.
- 33- Hoare A, Marsh PD, Diaz PI. Ecological Therapeutic Opportunities for Oral Diseases. *Microbiol Spectr* 2017 Aug; 5(4): doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0006-2016.
- 34- Allaker RP, Stephen AS. Use of Probiotics and Oral Health. *Curr Oral Health Rep* 2017; 4(4): 309-318.
- 35- Meurman JH, Stamatova IV. Probiotics: Evidence of Oral Health Implications. *Folia Med (Plovdiv)* 2018 Mar 1; 60(1): 21-29.
- 36- Serna-Thomé G, Castro-Eguiluz D, Fuchs-Tarlovsky V *et al.* Use of Functional Foods and Oral Supplements as Adjuvants in Cancer Treatment. *Ver Invest Clin* 2018; 70(3):136-146.
- 37- Hassan H, Rompola M, Glaser AW, Kinsey SE, Phillips RS. Systematic review and meta-analysis investigating the efficacy and safety of probiotics in people with cancer. *Support Care Cancer* 2018 Aug; 26(8): 2503-2509.
- 38- Hillman JD, Shilvers M. Interaction between wild-type, mutant and revertant forms of the bacterium *Streptococcus sanguis* and the bacterium *Actinobacillus actinomycetencomitans* in vitro and in the gnotobiotic rat. *Arch Oral Biol* 1988; 33: 395-401.

- 39- Teughels W, Newman MG, Coucke W, Hafajje AD, Van Der Mei HC, Haake SK. Guiding periodontal pockets recolonization: a proof of concept. *J Dent Res* 2007; 86 (11): 1078-82.
- 40- Nackaertz O, Jacobs R, Quirynen M, Rober M, Sun Y, Teugheus W. Replacement therapy for periodontitis: pilot radiographic evaluation in a dog model. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 1048-52.
- 41- Messori MR, Oliveira LF, Foureaux RC *et al.* Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol* 2013; 84: 1818-1826.
- 42- Foureaux RDE C, Messori MR, De Oliveira LF *et al.* Effects of probiotic therapy on metabolic and inflammatory parameters of rats with ligature-induced periodontitis associated with restraint stress. *J Periodontol* 2014; 85:975-983.
- 43- Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontal Res* 2014; 49: 785–791.
- 44- Garcia VG, Knoll LR, Longo M *et al.* Effect of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2016 Feb; 51(1): 26-37.
- 45- Messori 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- Oliveira LF, Salvador SL, Silva PH *et al.* Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *J Periodontol* 2017 Feb; 88(2): 197-208.

- 47- Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF *et al.* Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PloS One* 2017 Jun 29; 12(6): e0179946. doi: 10.1371/journal.pone.0179946.
- 48- Iniesta M, Herrera D, Montero E *et al.* Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2012; 39:736-44.
- 49- Krasse P, Carlssona B, Dahl C *et al.* Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J* 2006; 30: 55-60.
- 50- Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacillus reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol* 2010; 2:1-9.
- 51- Teugheus W, Durakan A, Ozcelik O *et al.* Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2013 Nov; 40(11): 1025-35.
- 52- Vicario M, Santos A, Violant D, Nart J & Giner L. Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: A preliminary randomized clinical trial. *Acta Odontologica Scandinavica* 2013; 71: 3-4, 813-819.
- 53- Tekce M, Ince G, Gursoy H *et al.* Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *J Clin Periodontol* 2015 Apr; 423(4): 363-72.

- 54- Ince G, Gursoy H, Ipçi SD *et al.* Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. *J Periodontol* 2015 Jun; 86(6): 746-54.
- 55- Twetman S, Derawi B, Keller M *et al.* Short-term effect of chewing gums containing probiotics *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Act Odontol Scand* 2009; 67: 19-24.
- 56- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC *et al.* Animal research: reporting in vivo experiments- the ARRIVE guidelines. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011 Apr; 31(4): 991-3.
- 57- Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC *et al.* Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2014; 49(5): 584-94.
- 58- Zuza EP, Garcia VG, Theodoro LH *et al.* Influence of obesity on experimental periodontitis in rats: histopathological, histometric and immunohistochemical study. *Clin Oral Investig* 2018 Apr; 22(3):1197-1208.
- 59- Tanideh N, Tavakoli P, Saghiri MA *et al.* Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis*. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013 Mar; 115(3):332-8.
- 60- Campos L, Nicolau J, Arana-Chaves VE, Simões A. Effects of laser phototherapy on enzymatic activity of salivary glands of hamsters treated with 5-fluorouracil. *Photochem Photobiol* 2014 May-jun; 90(3): 667-72.
- 61- Boutin S, Hagenfeld D, Zimmermann H *et al.* Clustering of subgingival microbiota reveals microbial disease ecotype associated with clinical stages of

- periodontitis in a cross-sectional study. *Front Microbiol* 2017 Mar 1; 8:340. Doi: 10.3389/fmicb.2017.00340.
- 62- Castelli V, Palumbo P, d'Angelo M *et al.* Probiotic DSF counteracts chemotherapy induced neuropathic pain. *Oncotarget* 2018 Jun 15; 9(46): 27998-28008.
- 63- Guo S, Li L, Xu B *et al.* A simple and novel fecal biomarker for colorectal cancer: ratio of *Fusobacterium Nucleatum* to probiotics populations, based on their antagonistic effect. *Clin Chem* 2018 Jun 18. Doi: 10.1373/clinchem.2018.289728.
- 64- Jena PK, Sheng L, Nagar N *et al.* The effect of synbiotics Bifidobacterium infantis and milk oligosaccharides on shaping gut microbiota community structure and NASH treatment. *Data Brief* 2018 May 24; 19:1025-1029.
- 65- Walia S, Kamal R, Dhawan DK, Kanwar SS. Chemoprevention by probiotics during 1,2dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. *Dig Dis Sci* 2018 Apr; 63(4): 900-909.
- 66- Song H, Wang W, Shen B *et al.* Pretreatment with probiotic Bifico ameliorates colitis-associated cancer in mice: transcriptome and gut flora profiling. *Cancer Sci* 2018 Mar; 109(3):666-677.
- 67- Bermúdez-Humarán LG, Aubry C, Motta JP *et al.* Engineering lactococci and lactobacilli for human health. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16:278–283.
- 68- Zitvogel L, Galluzzi L, Viaud S *et al.* Cancer and the gut microbiota: an unexpected link. *Sci Transl Med* 2015 Jan 21; 7(271):271ps1. doi: 10.1126/scitranslmed.3010473.
- 69- Stamatova I, Meurman JH. Probiotics: Health benefits in the mouth. *Am J Dent* 2009; 22:329-38.

- 70- Sattari M, Fathiyeh A, Gholami F *et al.* Effect of surgical flap on IL-1 β and TGF- β concentrations in the gingival crevicular fluid of patients with moderate to severe chronic periodontitis. *Iran J Immunol* 2011 Mar; 8(1) 0:20-6.
- 71- Koivisto L, Heino J, Hakkinen L, Larjava H. Integrins in Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014 Dec 1; 3(12):762-783.
- 72- Raghu Nadhanan R, Abimosleh SM, Su YW *et al.* Dietary meun oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302(11):E1440-E1449.
- 73- Twetman S, Keller MK, Lee L, Yucel-Lindberg T, Pedersen AML. Effect of probiotic lozenges containing *Lactobacillus reuteri* on oral wound healing: a pilot study. *Benef Microbes* 2018 Sep 18; 9(5):691-696.
- 74- Lakritz JR, Poutahidis T, Levkovich T *et al.* Beneficial bacteria stimulate host immune cells to counteract dietary and genetic predisposition to mammary cancer in mice. *Int J Cancer* 2014 Aug 1; 135(3):529-40.

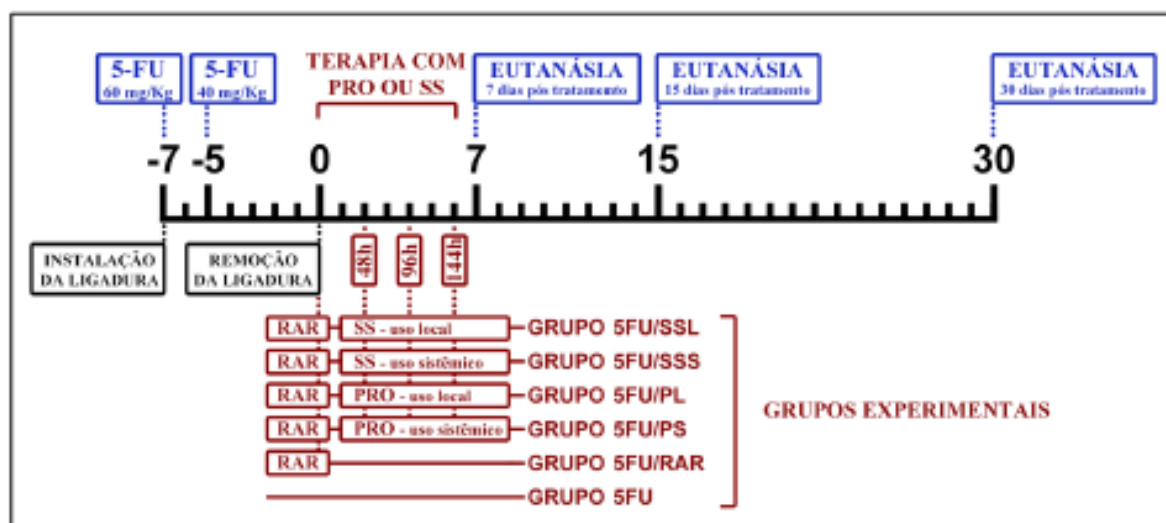


Figura 1: Esquema ilustrando o delineamento experimental do estudo e os procedimentos experimentais executados em seus respectivos intervalos de tempo nos diferentes grupos.

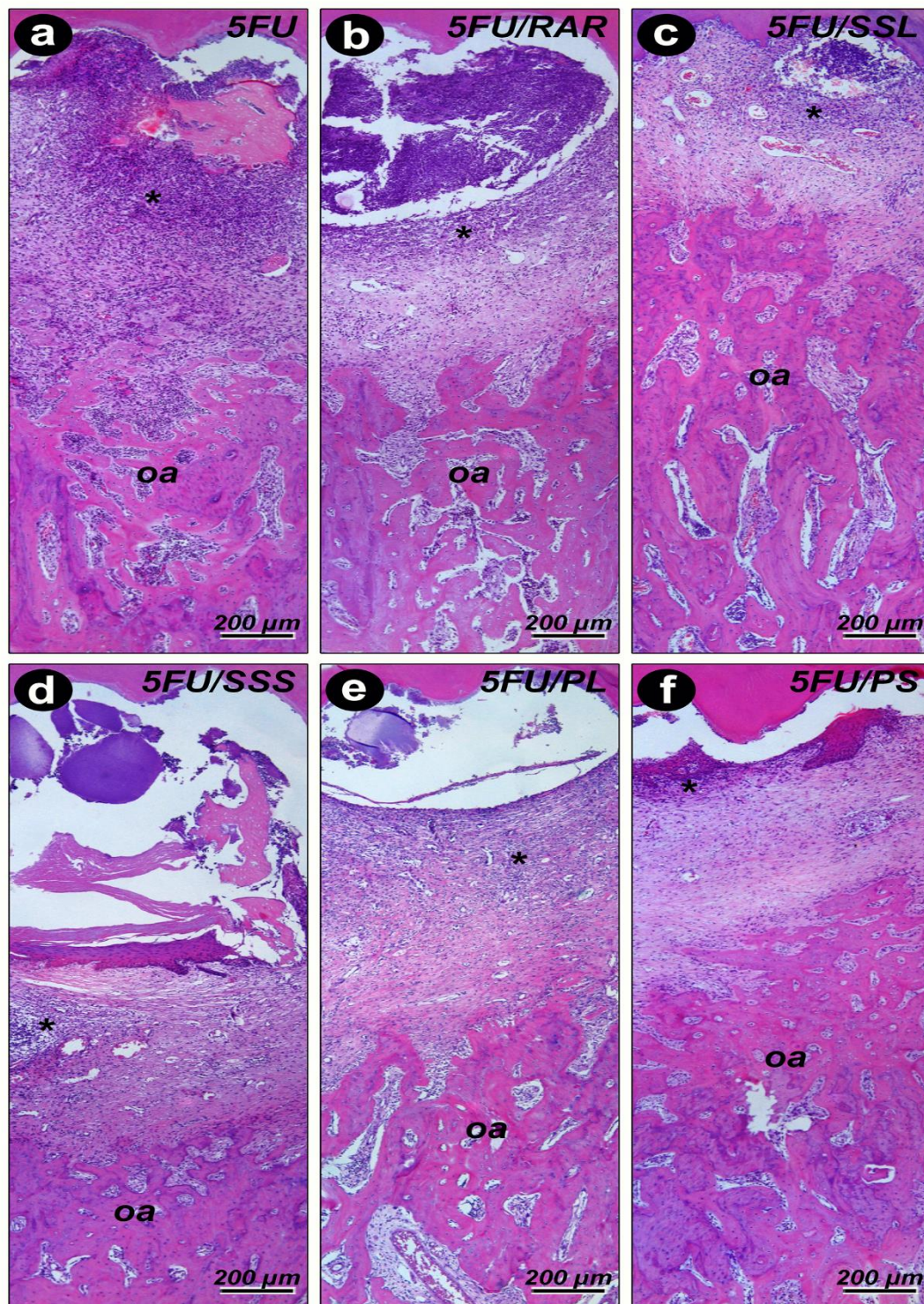


Figura 2: Fotomicrografias do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando a magnitude da resposta inflamatória local, o nível de perda óssea alveolar e o processo de reparo periodontal nos grupos 5FU (a), 5FU/RAR (b), 5FU/SSL (c), 5FU/SSS (d), 5FU/PL (e) e 5FU/PS (f) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: asteriscos, infiltrado inflamatório; oa, osso alveolar. Aumento original: 200x. Barras de escala: 200 µm. Coloração: hematoxilina e eosina (H&E).

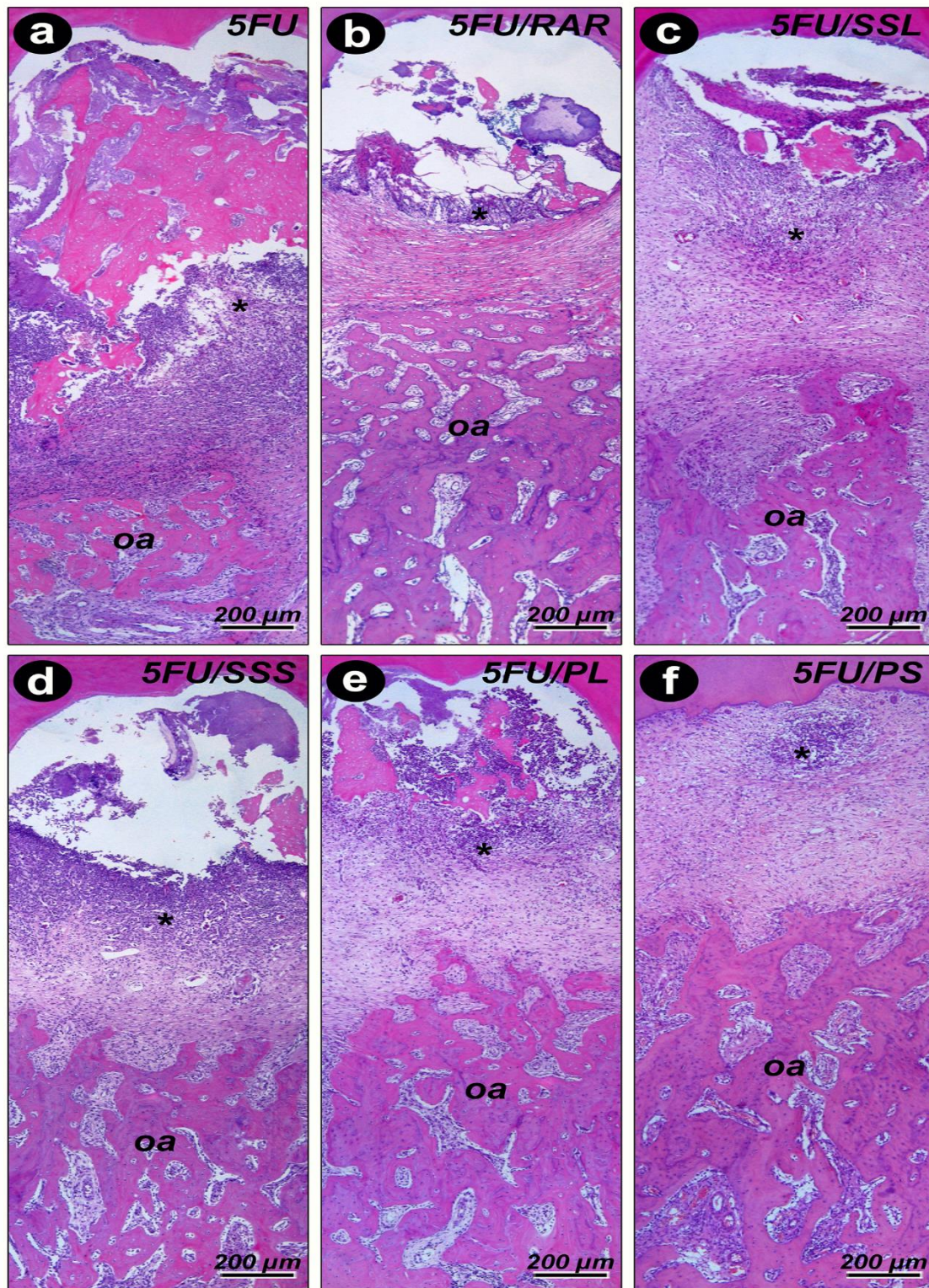


Figura 3: Fotomicrografias do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando a magnitude da resposta inflamatória local, o nível de perda óssea alveolar e o processo de reparo periodontal nos grupos 5FU (a), 5FU/RAR (b), 5FU/SSL (c), 5FU/SSS (d), 5FU/PL (e) e 5FU/PS (f) aos 15 dias. Abreviações e símbolos: asteriscos, infiltrado inflamatório; oa, osso alveolar. Aumento original: 200x. Barras de escala: 200 µm. Coloração: hematoxilina e eosina (H&E).

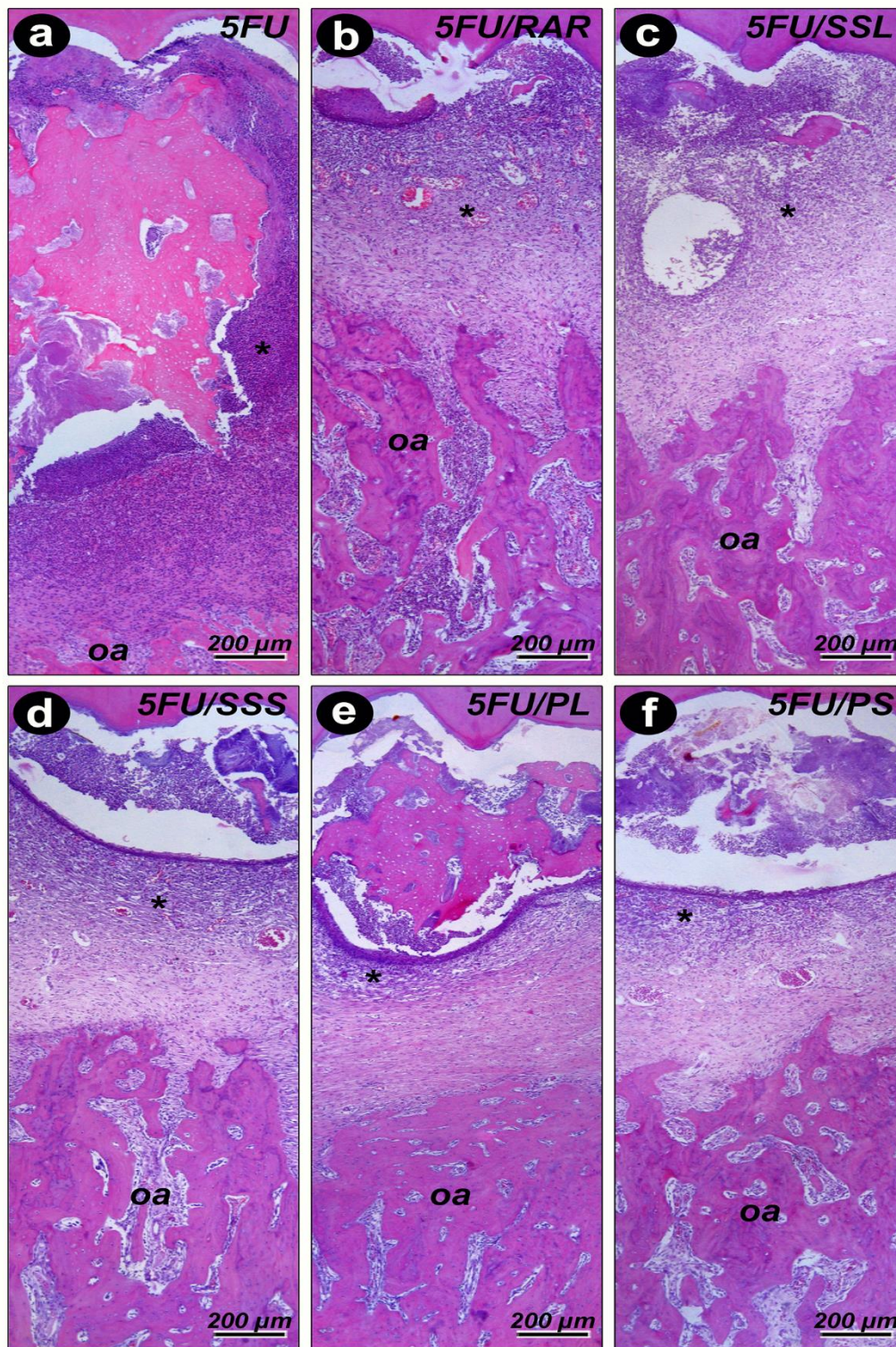


Figura 4: Fotomicrografias do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando a magnitude da resposta inflamatória local, o nível de perda óssea alveolar e o processo de reparo periodontal nos grupos 5FU (a), 5FU/RAR (b), 5FU/SSL (c), 5FU/SSS (d), 5FU/PL (e) e 5FU/PS (f) aos 30 dias. Abreviações e símbolos: asteriscos, infiltrado inflamatório; oa, osso alveolar. Aumento original: 200x. Barras de escala: 200 µm. Coloração: hematoxilina e eosina (H&E).

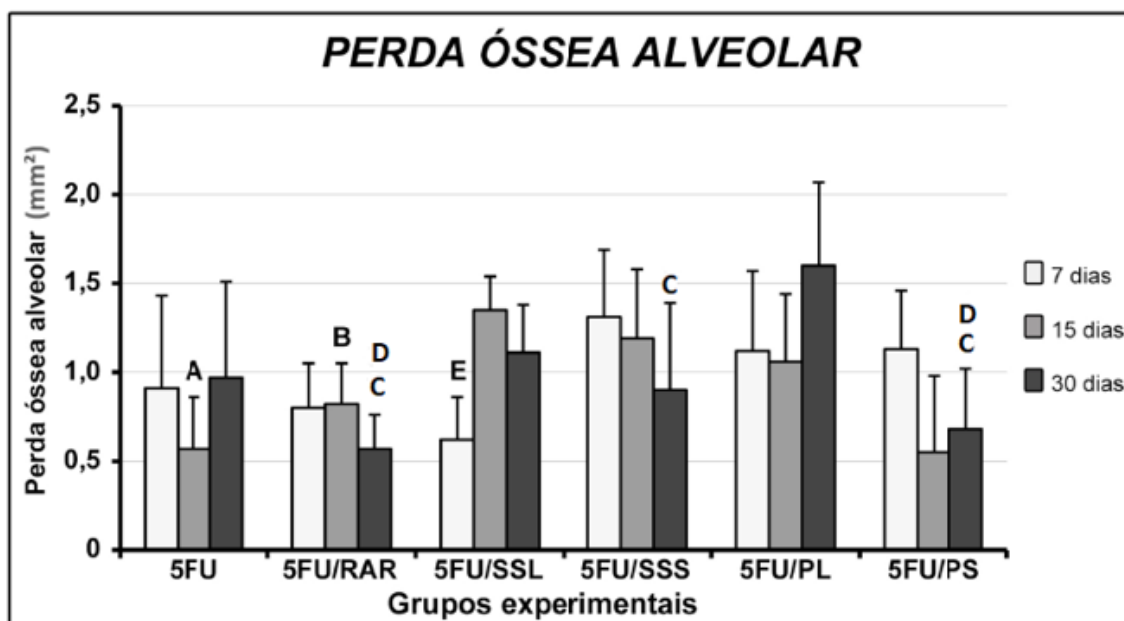


Figura 5: Gráfico mostrando a média e desvio padrão da área de perda óssea alveolar (mm^2) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo, nos diferentes grupos experimentais e períodos de avaliação. Abreviações e símbolos: A, diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos 5FU/SSL e 5FU/SSS, no mesmo período; B, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU/SSL, no mesmo período; C, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU/PL, no mesmo período; D, diferença estatisticamente significativa em relação aos 7 dias, no mesmo grupo; E, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU/SSS, no mesmo período.

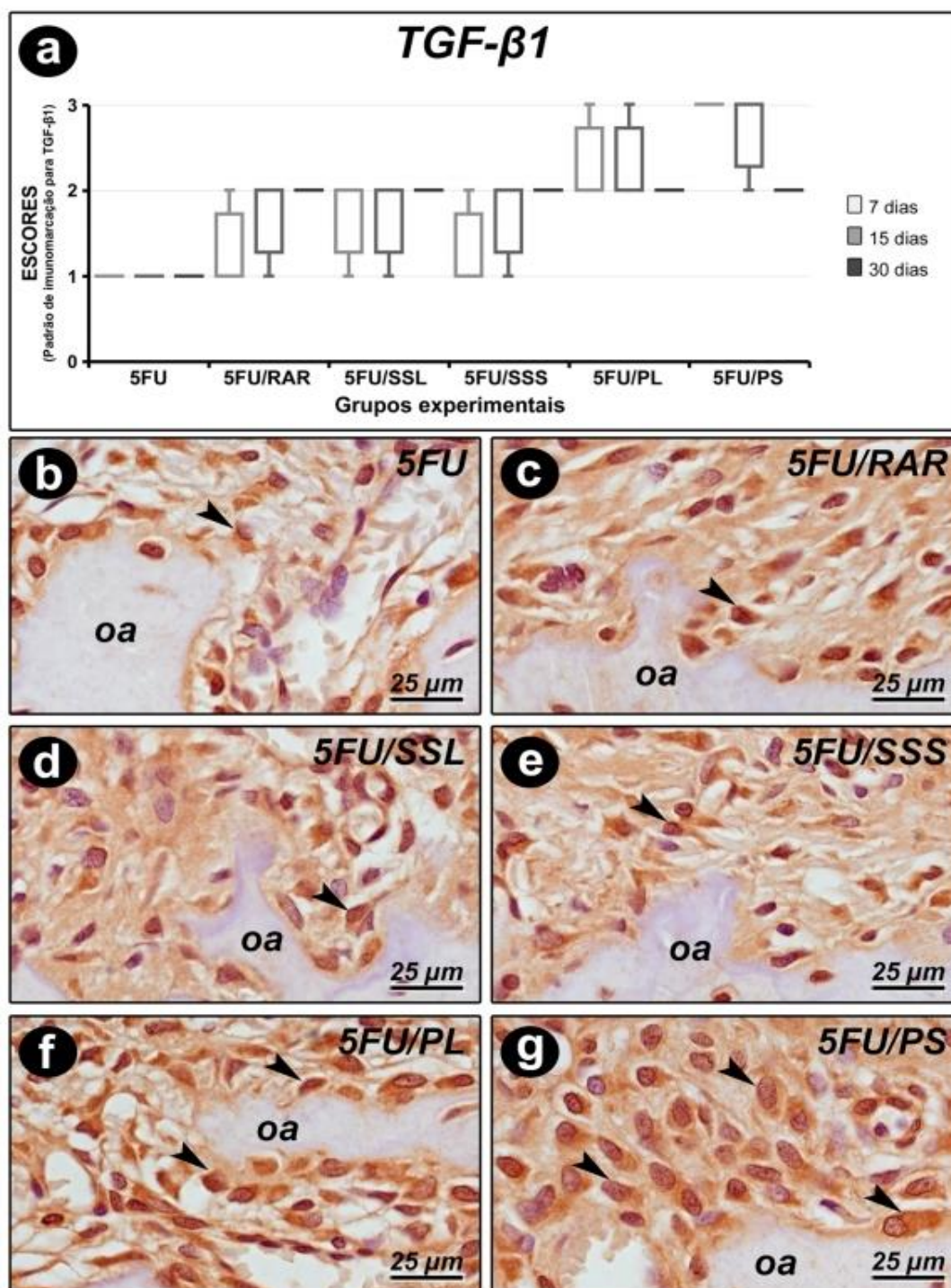


Figura 6: Imunomarcagem para TGF- β 1 na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando a mediana e desvio interquartil dos escores atribuídos ao padrão de imunomarcagem para TGF- β 1. (b-g) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcagem para TGF- β 1 nos grupos 5FU (b), 5FU/RAR (c), 5FU/SSL (d), 5FU/SSS (e), 5FU/PL (f) e 5FU/PS (g) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: setas, células imunomarcadas; oa, osso alveolar. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μ m. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

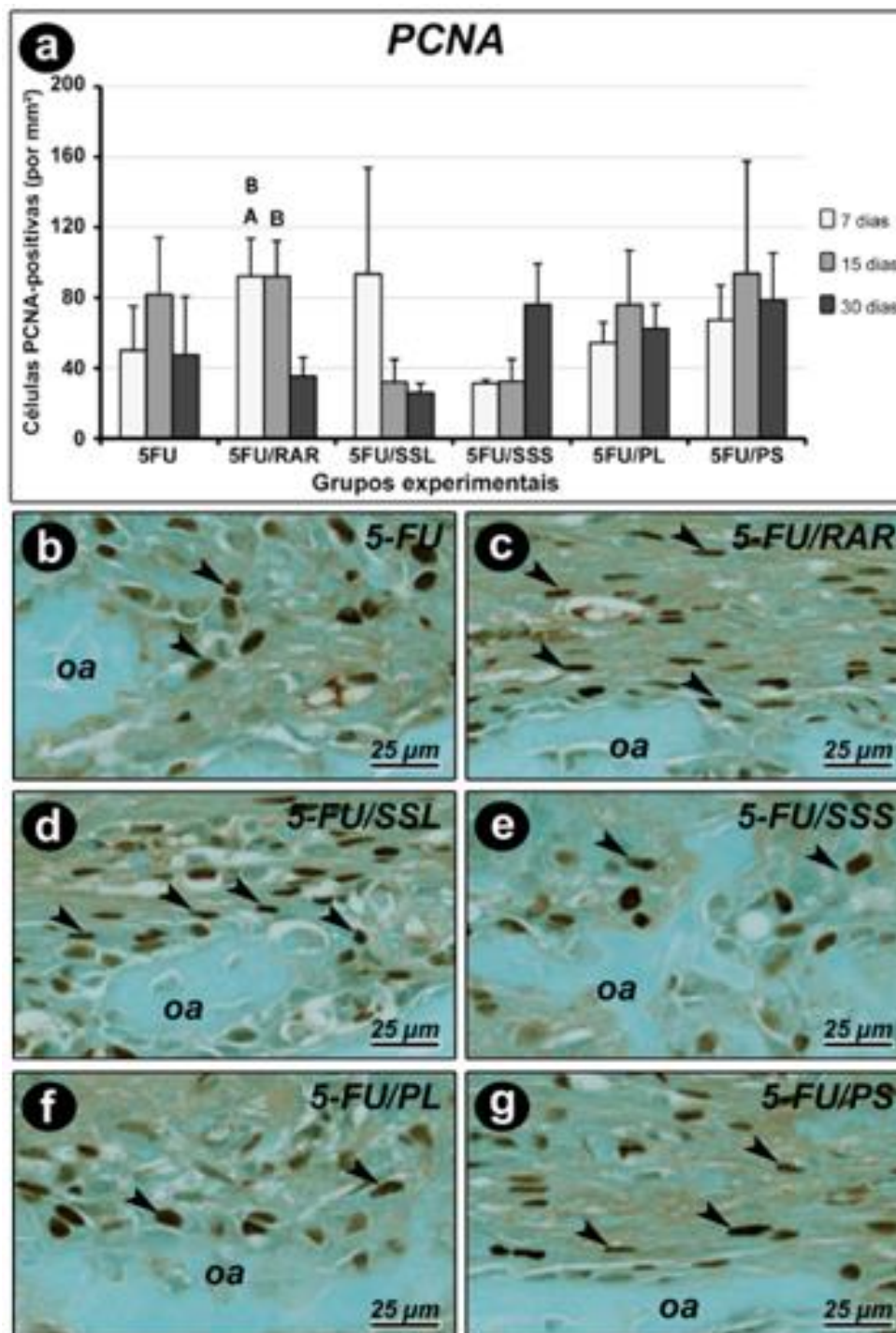


Figura 7: Imunomarcção para PCNA na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando média e desvio padrão da quantidade de células PCNA-positivas por mm^2 nos diferentes grupos experimentais e períodos. (b-g) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para PCNA nos grupos 5FU (b), 5FU/RAR (c), 5FU/SSL (d), 5FU/SSS (e), 5FU/PL (f) e 5FU/PS (g) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; A, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU/SSS, no mesmo período; B, diferença estatisticamente significativa em relação aos 30 dias, no mesmo grupo. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μm . Contracoloração: Fast green.

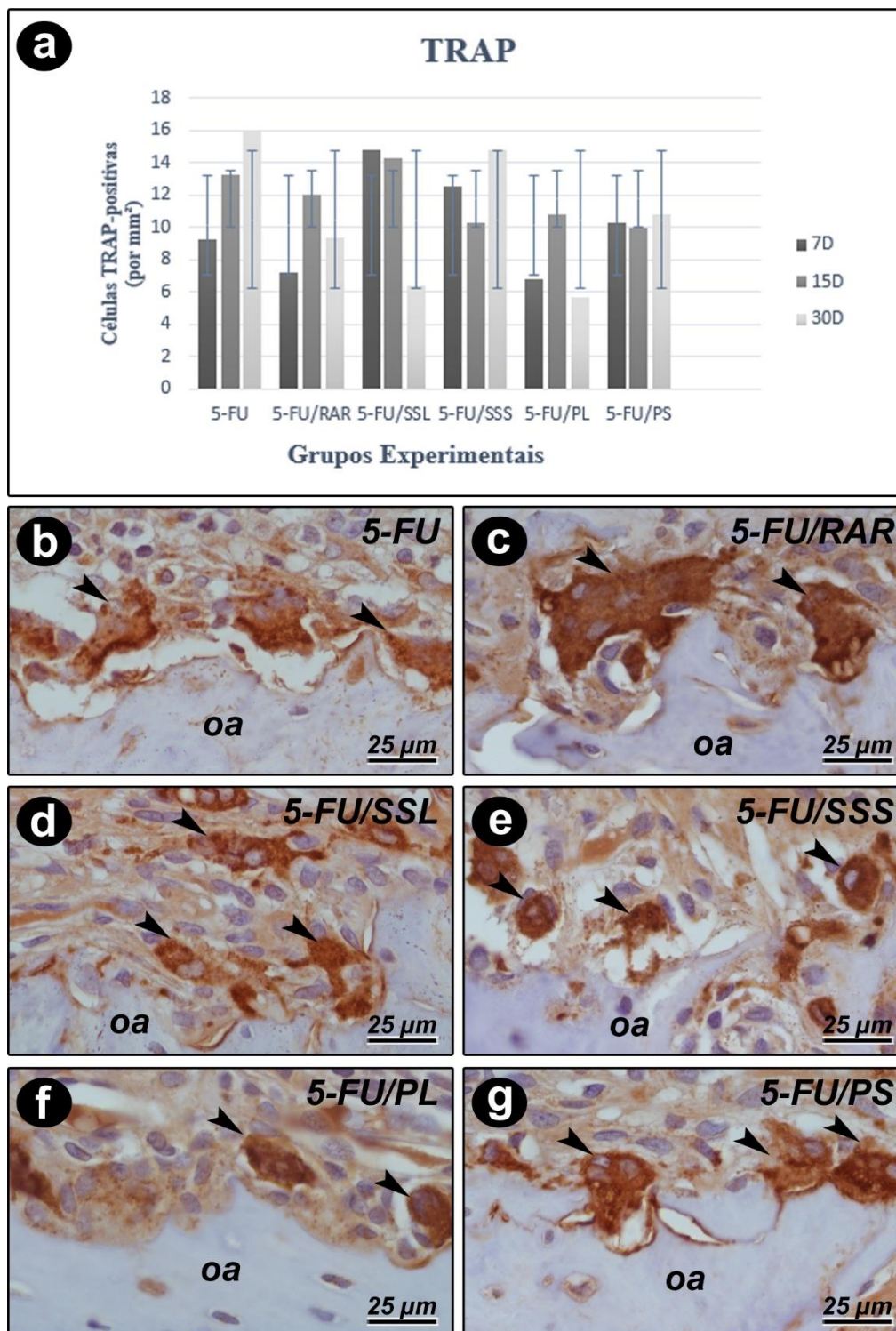


Figura 8: Imunomarcção para TRAP na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando média e desvio padrão da quantidade de células TRAP-positivas por mm² nos diferentes grupos experimentais e períodos. (b-g) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP nos grupos 5FU (b), 5FU/RAR (c), 5FU/SSL (d), 5FU/SSS (e), 5FU/PL (f) e 5FU/PS (g) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

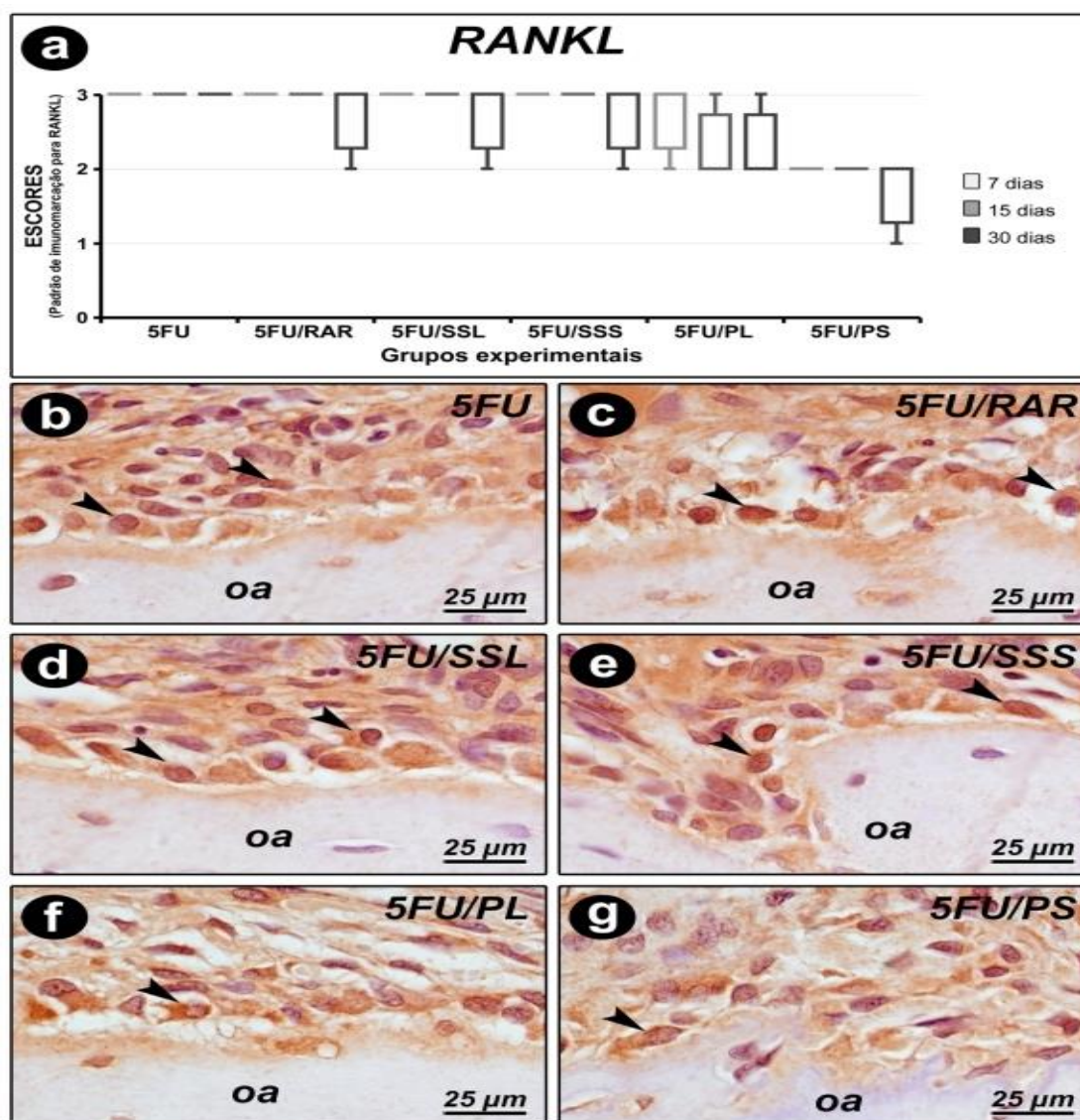


Figura 9: Imunomarcção para RANKL na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando a mediana e desvio interquartis dos escores atribuídos ao padrão de imunomarcção para RANKL. (b-g) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para RANKL nos grupos 5FU (b), 5FU/RAR (c), 5FU/SSL (d), 5FU/SSS (e), 5FU/PL (f) e 5FU/PS (g) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: setas, células imunomarcadas; oa, osso alveolar. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

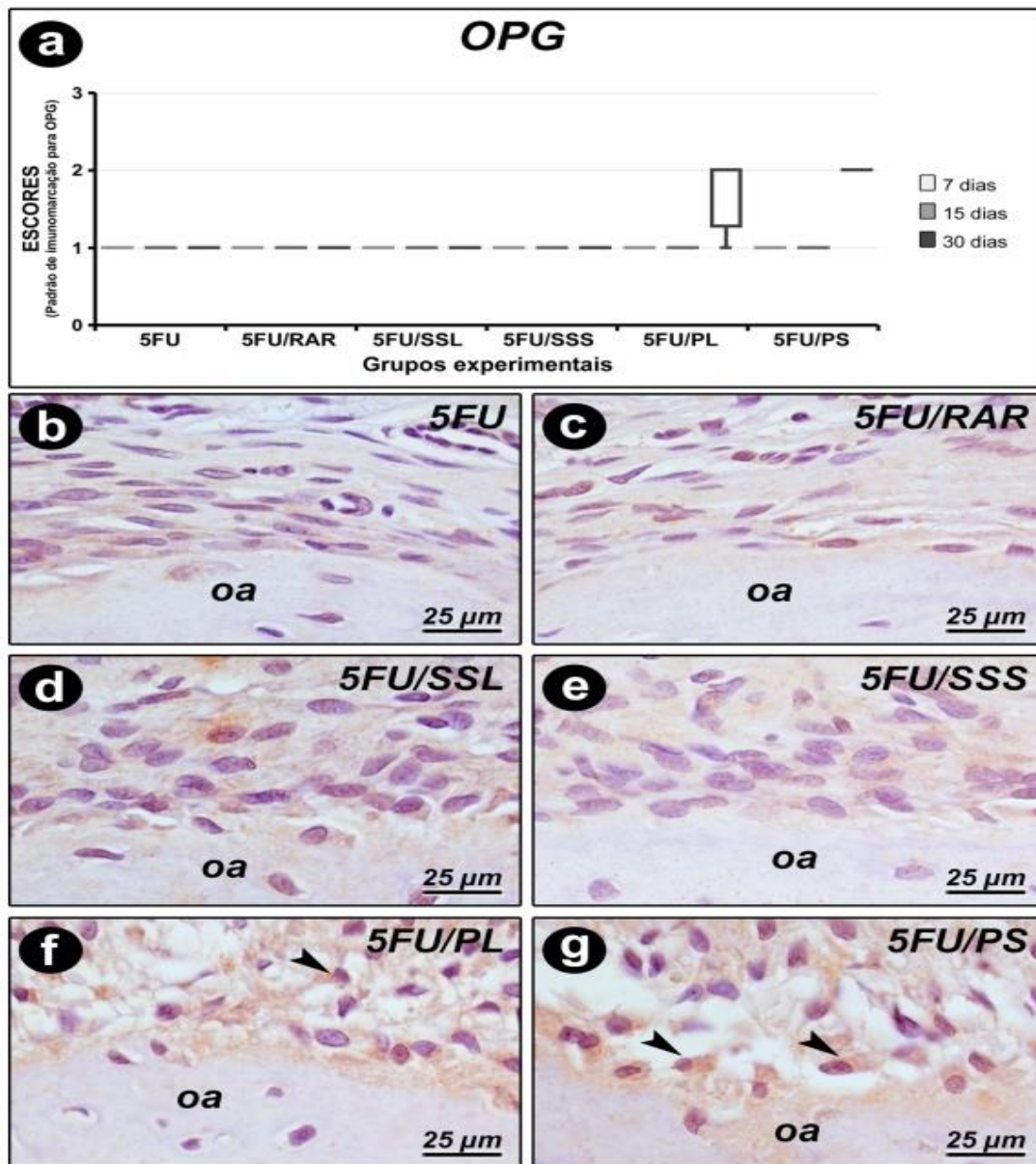


Figura 10: Imunomarcção para OPG na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando a mediana e desvio interquartis dos escores atribuídos ao padrão de imunomarcção para OPG. (b-g) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OPG nos grupos 5FU (b), 5FU/RAR (c), 5FU/SSL (d), 5FU/SSS (e), 5FU/PL (f) e 5FU/PS (g) aos 30 dias. Abreviações e símbolos: setas, células imunomarcadas; oa, osso alveolar. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μ m. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

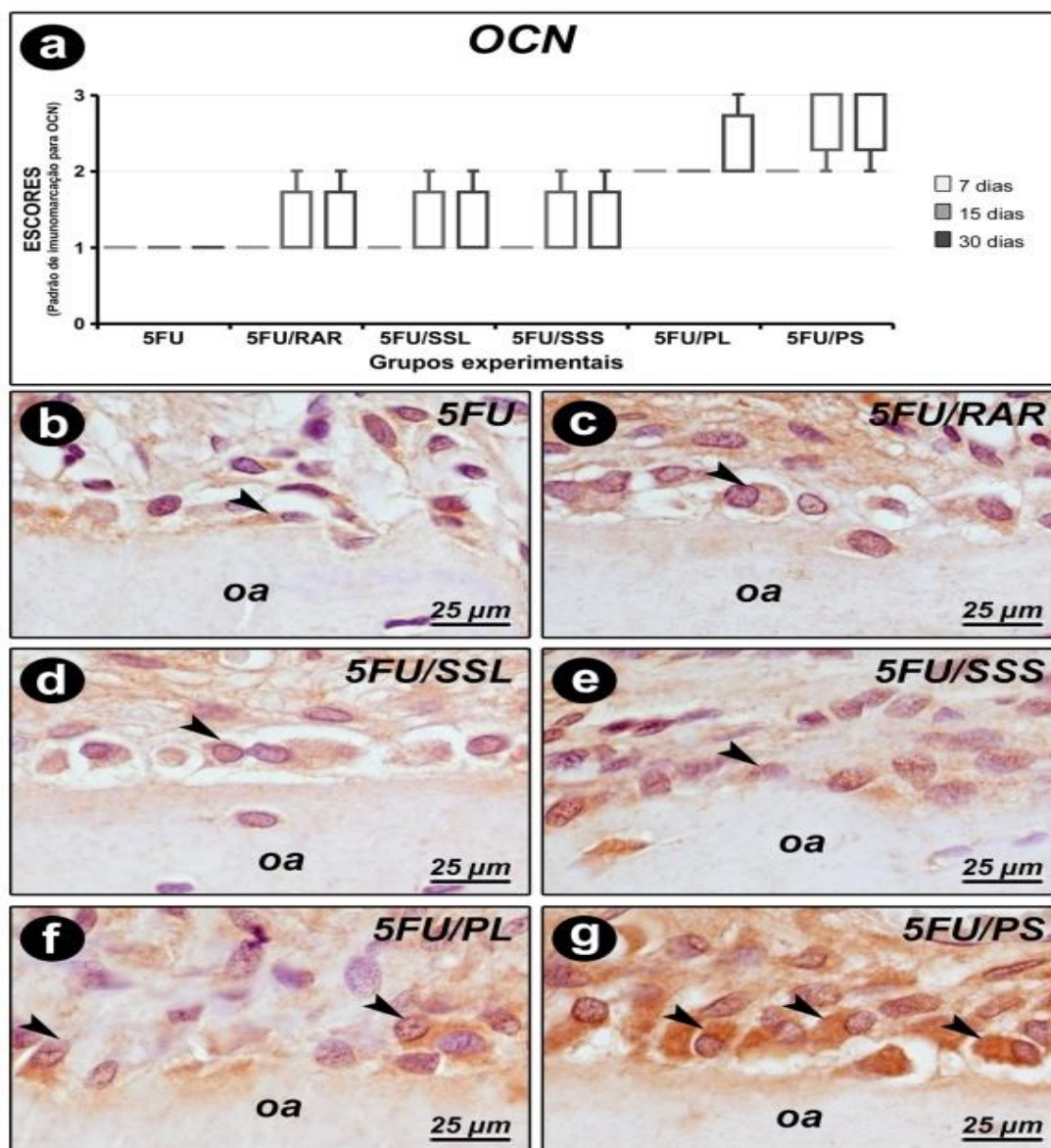


Figura 11: Imunomarcagem para OCN na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando a mediana e desvio interquartil dos escores atribuídos ao padrão de imunomarcagem para OCN. (b-g) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcagem para OCN nos grupos 5FU (b), 5FU/RAR (c), 5FU/SSL (d), 5FU/SSS (e), 5FU/PL (f) e 5FU/PS (g) aos 30 dias. Abreviações e símbolos: setas, células imunomarcadas; oa, osso alveolar. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 25 μ m. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

| ESCORE PARA CADA PARÂMETRO | PORCENTAGEM DE ANIMAIS POR ESCORE | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | GRUPOS EXPERIMENTAIS | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 5FU | | | 5FU/RAR | | | 5FU/SSL | | | 5FU/SSS | | | 5FU/PL | | | 5FU/PS | | |
| | 7d | 15d | 30d | 7d | 15d | 30d | 7d | 15d | 30d | 7d | 15d | 30d | 7d | 15d | 30d | 7d | 15d | 30d |
| INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (0) ausência de inflamação | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (1) pequena quantidade de células inflamatórias (até 1/3 das células são células inflamatórias) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (2) moderada quantidade de células inflamatórias (de 1/3 até 2/3 das células são células inflamatórias) | | | | | | 33% | | | 33% | | | 33% | | | 33% | | 66% | 100% |
| (3) grande quantidade de células inflamatórias (mais de 2/3 das células são células inflamatórias) | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 66% | 100% | 100% | 66% | 100% | 100% | 66% | 100% | 100% | 66% | 100% | 33% | |
| MEDIANA | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (0) ausência de inflamação | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (1) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (2) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca | | | | | | | | | | | | | | | | | 66% | 100% |
| (3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e ósseo da região de furca | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 33% | |
| MEDIANA | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA (CEMENTO E DENTINA) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (0) ausente | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (1) apenas área reabsorvidas inativas | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (2) poucas áreas de reabsorção ativas | | | | | | | 33% | 33% | 33% | | | | 33% | 33% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| (3) muitas áreas de reabsorção ativas | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 66% | 66% | 66% | 100% | 100% | 100% | 66% | 66% | | | | |
| MEDIANA | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (0) dentro dos padrões de normalidade | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (1) pequena quantidade de áreas de reabsorção | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (2) moderada quantidade de áreas de reabsorção | | 33% | 33% | | 33% | 33% | | 33% | 33% | | 33% | 33% | | 33% | 33% | | 100% | 100% |
| (3) grande quantidade de áreas de reabsorção | 100% | 66% | 66% | 100% | 66% | 66% | 100% | 66% | 66% | 100% | 66% | 66% | 100% | 66% | 66% | 100% | | |
| MEDIANA | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 |

PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA


| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| (0) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (1) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (2) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas | | | | 33% | 33% | 66% | 33% | 33% | 66% | 33% | 33% | 66% | 33% | 66% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| (3) desestruturação tecidual severa | 100% | 100% | 100% | 66% | 66% | 33% | 66% | 66% | 33% | 66% | 66% | 33% | 66% | 33% | | | | |
| MEDIANA | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO ALVEOLAR DA REGIÃO DE FURCA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| (0) trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (1) trabéculas ósseas de contorno irregular recobertas tanto por muitos osteoblastos quanto por osteoclastos ativos | | | | | | | | | | | | | | | | 33% | 66% | 66% |
| (2) trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos | | | | 33% | 66% | 66% | 33% | 66% | 66% | 33% | 66% | 66% | 100% | 100% | 100% | 66% | 33% | 33% |
| (3) áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos | 100% | 100% | 100% | 66% | 33% | 33% | 66% | 33% | 33% | 66% | 33% | 33% | | | | | | |
| MEDIANA | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 |

Tabela 1 - Análise histopatológica através de escores e porcentagem dos seguintes parâmetros avaliados: intensidade da resposta inflamatória local; extensão do processo inflamatório; reabsorção radicular externa (cimento e dentina); reabsorção óssea alveolar; padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca e padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar da região de furca.

Anexo A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

unesp  **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 **"Efeitos do uso de probiótico administrado localmente ou sistemicamente coadjuvante à terapia periodontal mecânica, no tratamento da doença periodontal experimentalmente induzida em animais sistemicamente normais ou imunossuprimidos com quimioterápico (5-FU): estudo histomorfométrico e imunoistoquímico em ratos"**, Processo FOA nº 2014-00541, sob responsabilidade de Valdir Gouveia Garcia apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 21 de novembro de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 19 de Outubro de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 19 de Novembro de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Use local or systemic probiotic in mechanical therapy at periodontal disease in normal or immunosuppressed animals by chemiotherapeutic (5-FU): histomorphometric and immunoistochemical study in rats"**, Protocol FOA nº 2014-00541, under the supervision of Valdir Gouveia Garcia presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on November 21, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 19, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 19, 2018.


Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani
 Coordenador 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 B - Lista de verificação de diretrizes para experimentação animal “ARRIVE Guidelines”



The ARRIVE Guidelines Checklist

Animal Research: Reporting In Vivo Experiments

Carol Kilkenny¹, William J Browne², Innes C Cuthill³, Michael Emerson⁴ and Douglas G Altman⁵

¹The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, UK, ²School of Veterinary Science, University of Bristol, Bristol, UK, ³School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK, ⁴National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, ⁵Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford, Oxford, UK.

| | ITEM | RECOMMENDATION | Section/ Paragraph |
|-------------------------|------|--|-----------------------|
| Title | 1 | Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible. | 40 |
| Abstract | 2 | Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study. | 41 |
| INTRODUCTION | | | |
| Background | 3 | <p>a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale.</p> <p>b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.</p> | 44 |
| Objectives | 4 | Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested. | 45 |
| METHODS | | | |
| Ethical statement | 5 | Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research. | 45 |
| Study design | 6 | For each experiment, give brief details of the study design including: <ul style="list-style-type: none"> a. The number of experimental and control groups. b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when). c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals). A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out. | 47 |
| Experimental procedures | 7 | For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example: <ul style="list-style-type: none"> a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s). b. When (e.g. time of day). c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze). d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used). | 46-48 |
| Experimental animals | 8 | <p>a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range).</p> <p>b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naïve, previous procedures, etc.</p> | 45 |

The ARRIVE guidelines. Originally published in PLoS Biology, June 2010¹

| | | | |
|---|----|---|-------|
| Housing and husbandry | 9 | Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free [SPF]; type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment. | 46 |
| Sample size | 10 | a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant. | 46-47 |
| Allocating animals to experimental groups | 11 | a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed. | 47 |
| Experimental outcomes | 12 | Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes). | 49-52 |
| Statistical methods | 13 | a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach. | 52 |
| RESULTS | | | |
| Baseline data | 14 | For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated). | 53 |
| Numbers analysed | 15 | a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50%). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why. | 53 |
| Outcomes and estimation | 16 | Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval). | 53-56 |
| Adverse events | 17 | a. Give details of all important adverse events in each experimental group. b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events. | 53 |
| DISCUSSION | | | |
| Interpretation/scientific implications | 18 | a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results ² . c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research. | 56-62 |
| Generalisability/translation | 19 | Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology. | 61-62 |
| Funding | 20 | List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study. | 62 |



References:

1. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
2. Schulz KF, Altman DG, Moher D, the CONSORT Group (2010) CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 340:c332.

Anexo B: Lista de diretrizes do estudo, seguindo os princípios do “ARRIVE Guidelines”. As numerações de cada tópico correspondem às páginas em que se encontram cada parágrafo correspondente ao assunto mencionado.

Anexo C - Normas para publicação segundo o Periódico “Journal of Periodontal Research”

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance, 7. Data Protection.

Journal of Periodontal Research guarantees an effective review and publication process.

Rapid review processing: on average 32 days from submission to first decision

Rapid publication: on average 55 days from acceptance to online availability and

Medline indexing

Useful Websites: [Submission Site](#), [Author Services](#), [Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

ref1. GENERAL

The *Journal of Periodontal Research* is an international research periodical the purpose of which is to publish original clinical and basic investigations and review articles concerned with every aspect of periodontology and related sciences. Reports of scientific meetings in periodontology and related fields are also published.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in the *Journal of Periodontal*

Research. Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell's [Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

The *Journal of Periodontal Research* adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Author ship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

The *Journal of Periodontal Research* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Please also include specifications of the source of funding for the study

and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

2.2. Ethical Approvals

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Photographs of People

The *Journal of Periodontal Research* follows current HIPAA guidelines for the protection of patients/subject privacy. If an individual pictured in a digital image or photograph can be identified, his or her permission is required to publish the image. The corresponding author may submit a letter signed by the patient authorizing the *Journal of Periodontal Research* to publish the image/photo. Or, a form provided by the *Journal of Periodontal Research* (available by clicking the “Instructions and Forms” link in Manuscript Central) may be downloaded for your use. This approval must be received by the Editorial Office prior to final acceptance of the manuscript for publication. Otherwise, the image/photo must be altered such that the individual cannot be identified (black bars over eyes, tattoos, scars, etc.). The *Journal of Periodontal Research* will not publish patient photographs that will in any way allow the patient to be identified, unless the patient has given their express consent.

2.4 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available

at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material.

The *Journal of Periodontal Research* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.5 Conflict of Interest and Source of Funding

Please disclose information concerning sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest under Acknowledgements

2.6 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.7. Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.8. Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the

paper will receive an email prompting them to login to Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS), they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agrément

If the OnlineOpen option is not selected, the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected, the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Agreements (OAA):

Creative Commons License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial - NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements, please visit the Copyright FAQ hosted on Wiley Author Services <http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-301.html> and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)], you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy, please visit <http://www.wiley.com/go/funderstatement>

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jre>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. For further assistance, please contact the editorial office at jreedoffice@wiley.com

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jre>

- Log-in or, if you are a new user, click “register here”.

- If you are registering as a new user.

- After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.

- Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'

- Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.

- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/jre> and enter your email address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.

- Log-in and select “Corresponding Author Center”

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your “Corresponding Author Center”, submit your manuscript by clicking the submission link under “Author Resources”.

- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from

your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.

- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
 - You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
 - Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal.
- Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc/.docx) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, figure legends and tables but *no* embedded figures. Figure tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to the Journal of Periodontal Research will be reviewed by two experts in the field. The Journal of Periodontal Research uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suggest a Reviewer

The Journal of Periodontal Research attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of 2 potential international reviewers whom you consider capable of reviewing your manuscript.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.7. Email Confirmation of Submission

After submission you will receive an email to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation email after 24 hours, please check your email address carefully in the system. If the email address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your email server. Also, the emails should be received if the IT department adds our email server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre'. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit your revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Articles: must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles must conform to the highest international standards in the field.

Review Articles: are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged.

Mini Reviews are covering a smaller area and may be written in a more free format.

Short Communications: Short communications, limited to 1-3 pages, including illustrations and references, will be considered for rapid publication. Such papers must be based on work that is of special importance or having the potential for great impact, or a body of work that is complete but of insufficient scope to warrant a full-length paper. Short communications need not follow the usual divisions.

Meeting Reports: Reports of scientific meetings in periodontology and related fields are also published.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 7 published pages (including figures and tables) are subject to a charge of GBP70.00 per additional page. For guidance purposes, one published page amounts approximately to 5,500 characters; text should be reduced if figures/tables are included within the 7 pages. If authors are unable to pay additional page fees they will need to reduce the length of their articles.

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

Abbreviations and symbols: Abbreviations should be in accordance with Guidelines laid down by the American Society of Microbiology. Unless they are in common usage (e.g. DNA), all terms must be displayed in full in the key words, and the first time that they appear in the abstract, the main text, tables and figures, followed by the abbreviation in parentheses. If an abbreviation is used in the body of figure or table only it must be defined in the figure legend or table footnotes. The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro* and *in vivo* are to be italicized. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of *Webster's Third New International Dictionary* will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined in the typescript. The full proper name (e. g. *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e. g. *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e. g. streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalized and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e. g. *Ps* for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names.

It is strongly recommended that all abbreviations be introduced in the first paragraph in Materials and Methods. Alternatively, define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used; e.g., "Cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM)." Generally, eliminate abbreviations that are not used at least three times in the text (including tables and figure legends).

5.3. Structure

All manuscripts submitted to the Journal of Periodontal Research should include: Title page, abstract, main text, references and tables, figures and figure legends were appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, name(s) of the author(s), initials, and institutional affiliation(s), and the name and complete mailing address, including email address, of the author responsible for correspondence. We accept only one corresponding author per manuscript and in case of co-correspondence a foot note will be added indicating 'Both the authors have contributed equally to the work. The author must list 4 keywords for indexing purposes.

Abstract: The abstract should consist of 1) the objective 2) the background data discussing the present status of the field 3) methods 4) results 5) conclusion.

Main Text of Original Research Articles

Introduction: Summarize the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively.

Material and methods: Materials and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made.

Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all of the data in the tables and illustrations. Important observations should be emphasized.

Discussion: Summarize the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Main Text of Reviews, Short Communications and Meeting Reports

These need not follow the usual divisions.

Acknowledgements: Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support must be acknowledged.

5.4. References

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text, and should be kept to a pertinent minimum. References should include the beginning

and ending page numbers. Identify references in the text, tables, and figure legends by arabic numerals in superscript format. References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first notation of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which is based on *Index Medicus*. Manuscripts accepted but not published may be cited in the reference list by placing "in press" after the abbreviated title of the journal. Abstracts and manuscripts not yet accepted may be cited in full in the text but not in the reference list. References must be verified by the author(s) against the original documents.

We recommend the use of a tool such as [Reference Manager](#) for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://refman.com/downloads/styles>

Examples:

(1) *Standard journal article*

(List all authors up to 6; for 7 or more list the first 3 and add "et al.") Dockrell H, Greenspan JS. Histochemical identification of T- cells in oral lichen planus. *Oral Surg* 1979; 48: 42-49. Thomas Y, Sosman J, Yrigoyen O, et al. Functional analysis of human T- cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B-cell differentiation. *J Immunol* 1980; 125: 2402-2405.

(2) *Corporate author*

The Royal Marsden Hospital Bone- Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone- marrow graft without preconditioning in post- hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977; 2: 628-630.

(3) *No author given*

Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas [Editorial]. *Br Med J* 1981; 283: 628-635.

(4) *Journal supplement*

Mastri AR. Neuropathology of diabetic neurogenic bladder. *Ann Intern Med* 1980; 92 (2 pt 2): 316- 324.

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979; 54 (suppl 1): 26- 28.

(5) *Journal paginated by issue*

Seaman WB. The case of the pancreatic pseudocyst. *Hosp Pract* 1981; 16 (Sep): 24-29.

(6) *Personal author(s)*

Eisen HN. *Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response*, 5th edn. New York: Harper Row, 1984:406-420.

(7) *Editor, compiler, chairman as author*

Dausset J, Colombani J, eds. *Histocompatibility testing 1972*. Copenhagen: Munksgaard, 1973: 12-18.

(8) *Chapter in a book*

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: WB Saunders, 1974: 457-480.

(9) *Published proceedings paper*

DePont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. Proceedings of 3rd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-50.

(10) *Agency publication*

Ranofsky AL. Surgical operations in short-stay hospitals: United States - 1975. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 1978; DHEW publication no. (PHS) 78-1785. (Vital and health statistics; series 13; no. 34.)

(11) *Dissertation or thesis*

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen. Berkeley, CA: University of California, 1965. 156pp. Dissertation.

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with arabic numerals. Use titles which are self explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single column width (54 mm) after reduction, although in some cases 113 mm (double column) and 171 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

5.6. Supporting material

Supporting material, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted.

It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Material is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Material is such that it cannot be accommodated on the journal's Web site, the author agrees to make the Supporting Material available free of charge on a permanent Web site, to which links will be set up from the journal's website. The author must advise Wiley Blackwell if the URL of the website where the Supporting Material is located changes. The content of the Supporting Material must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of Supporting Material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Material' and providing titles of figures, tables, etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the authors Web site cannot be reviewed. The Supporting Material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A

working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html . This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

6.2. Early Online Publication Prior to Print

The Journal of Periodontal Research is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited

and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3. Production Tracking

Online production tracking is available for your article through Wiley Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production.

6.4. Video Abstracts

A video abstract can be a quick way to make the message of your research accessible to a much larger audience. Wiley and its partner Research Square offer a service of professionally produced video abstracts, available to authors of articles accepted in this journal. You can learn more about it at www.wileyauthors.com/videoabstracts. If you have any questions, please direct them to videoabstracts@wiley.com.

7. Data Protection

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication.