

Daniela Pereira de Sá

**Terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da
periodontite em ratos tratados com dose oncológica de
zoledronato**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Ervolino

Coorientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

**ARAÇATUBA -SP
2018**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S111t Sá, Daniela Pereira de.
Terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da
periodontite em ratos tratados com dose oncológica de
zoledronato / Daniela Pereira de Sá. – Araçatuba, 2018
117 f.: il.; tab.

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

1. Osteonecrose 2. Fotoquimioterapia 3. Periodontite
4. Difosfonatos I. T.

Black D6
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dados Curriculares

Daniela Pereira de Sá

Nascimento: 16. 07. 1992 - Bataguassu-MS

Filiação: Maria Regina Pereira de Sá
Josias Gomes de Sá

2010- 2014: Curso de Graduação em Odontologia
Centro Universitário do Norte Paulista - UNORP

2015: Curso de Atualização em Periodontia
Centro de Odontologia Estética – São José do Rio Preto - SP

2016-2018: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Periodontia
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Dedicatória

À **D**EUS

Dedico este trabalho ao meu Criador, Redentor e Salvador, pois existir em Ti e para o Teu louvor é o prazer que há em mim.

Aos meus **P**ais, **M**aria **R**egina e **J**osias

Pela dedicação, carinho, sustento, paciência, orientação, segurança e conforto dispensados a mim. Por acreditarem em meus sonhos e não medirem esforços para me ajudar, por nunca desistirem de mim em todas as circunstâncias.

Mãe, o seu amor, sua entrega, altruísmo, fé e suas orações foram o alicerce para que eu chegasse até aqui. Encontro em você um exemplo de cristã, humana, filha, mãe, profissional e amiga. Eu não seria quem sou se não fosse por todo seu cuidado, preocupação, proteção e companheirismo em todas as situações, nas boas e ruins; foi você que se alegrou e sorriu comigo nos momentos de conforto e calma e também que chorou e dobrou os joelhos em oração nos momentos difíceis (e que não foram poucos, hein!). Minha gratidão por você é eterna e meu amor imensurável, só o Altíssimo Deus pode retribuir tudo quanto você merece. Te amo sempre e para sempre.

Pai, muito obrigado por me apoiar e me ajudar nesse momento, por desejar sempre o melhor para mim. Sei que nós temos nosso jeito de expressarmos os sentimentos e nossas diferenças (ou semelhanças, né?!), mas no fundo no fundo há um sentimento bom. Peço a Deus para que te proteja, te abençoe e que Ele me permita retribuir a você a mãe um pouco de tudo o que fazem por mim.

Mãe e **P**ai devo tudo isso a vocês, muito obrigado por tudo e eu os amo demais.

À querida **F**amília **Z**ol

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.” Clarice Lispector. Essa frase descreve bem o quanto esse trabalho é de vocês!!! E por isso eu os dedico. Meus amigos de faculdade, principalmente, de vida, saibam que sem a colaboração

valiosa de cada um, a realização disso seria impossível. Desfrutar dessa conquista com vocês é algo muito mais do justo. Querida e eterna família ZOL: **“Luan Toro, João Martins, Cristian Statickievst, Thamires Cavazana, Nathalia Januario, Fernanda Furuse, Leticia Ferreira, Tiago Esgalha, Luy de Abreu Costa, Jéssica Santana, Jéssica Freire, Vinícius Ganzaroli, Mariane Bocalon, Isabella Zacarin e Professor Edilson Ervolino”**.

Agradecimentos Especiais

À DEUS

Pela dádiva da vida, pela salvação em Jesus Cristo, pela minha família.

Por me permitir sonhar e realizar sonhos conforme à sua vontade.

Por colocar em meu caminho amigos especiais, que em muitos momentos se fizeram como família, pessoas que me ajudaram e que fizeram meus dias mais alegres e coloridos e que tornaram o fardo da minha jornada mais leve.

Pela minha saúde, integridade, paciência, e por ter me dado crescimento como pessoa, como amiga, como profissional e principalmente como filha D'Ele.

Por me abrir portas e oportunidades das quais eu jamais imaginei viver e merecer, mas sua misericórdia e bondade tão infinitas me alcançam a cada novo dia.

Por viver os Seus milagres de uma maneira extraordinariamente real, e aprender a ser inteiramente dependente Dele, e assim aumentar e lapidar a minha Fé.

Deus, te agradeço com toda minha alma, minha vida e todo meu entendimento, pois o Senhor fez infinitamente mais do que eu pedi ou imaginei, e Sua presença viva em minha vida, foi o que me fez alcançar a vitória.

Ao querido Mestre e Orientador Prof. Edilson Ervolino

Ao meu querido orientador **Professor Dr. Edilson**, o melhor professor e orientador que poderia ter!!! Um ser humano precioso e incrível que consegue reunir tantas virtudes e vive-las com humildade e sinceridade! Nosso maior exemplo de garra, determinação, perfeccionismo, competência, profissional íntegro e ético, respeitador, amigo leal e o docente mais didático que existe no mundo, além de um bom pai e esposo, que desempenha esses e outros adjetivos com tanta maestria. O Rei da querida família ZOL, rsrsrs.

Um orientador que demonstra que ensinar é mostrar que é possível. Sempre nos mostrando o melhor caminho, sempre alegre e comemorando nossas vitórias, sempre empenhado para que nada nos faltasse, nos respaldando em todos os momentos. Muito obrigada por cada palavra de estímulo e apoio, por tornar nossos momentos de laboratório agradáveis, descontraídos e alegres.

Professor Edilson, eu me sinto honrada em ter sido sua orientada, sou imensamente grata ao senhor por ter aberto as portas do seu laboratório para

mim, por ter me ensinado tanto na vida científica da qual eu não conhecia antes, e por ter me apresentado com tanta excelência e esmero um mundo que era novo para mim. Te agradeço por sua dedicação, disponibilidade e competência na orientação deste meu trabalho e de todas as outras coisas que aprendi com o senhor. Obrigado por me animar, revigorar e aconselhar quando eu achava que o fardo era mais pesado do que eu pudesse aguentar, e o senhor sempre me acalmava e me fazia voltar a prosseguir acreditar que tudo daria certo.

Minha admiração e respeito por você só aumentam, por ser esse professor maravilhoso, de um coração enorme, admirável, por agregar valores e conhecimentos eternos. Um Mestre para toda a vida ... Tenho muito orgulho de dizer que fui orientada, aluna e discípula do senhor, pois sei o quanto és bem quisto, respeitado e admirado por todos.

Muito obrigado por ter me dado essa oportunidade e principalmente por ser a peça fundamental na realização desse meu sonho, que Deus o abençoe sempre e muito mais.

Ao meu *Amigo e Irmão Luan Toro*

Luan, Luanzinho, Lulis, Felipe, Príncipe, meu amigo, meu parceiro, meu irmãozinho de alma e coração... uma pessoa da qual posso atribuir tantos adjetivos e virtudes. Há muito tempo tenho pensado a respeito dos meus agradecimentos a você; como expressar tudo o que sinto por ti?! Afinal todas as palavras que existem são insuficientes para demonstrar minha gratidão. Foram tantos dias de convivência, de aprendizado, de parceria e amizade que para mim é uma honra, uma alegria sem fim, poder dizer um pouco de tudo quanto sinto e desejo para você, meu irmão!

Você foi a melhor coisa que me aconteceu em Araçatuba!!! Verdadeiramente, eu não sei o que teria sido de mim se não fosse a graça e a misericórdia de Deus de ter colocado em meu caminho um ombro amigo como o seu. A pessoa que esteve comigo em, absolutamente, todos os momentos, desde o estágio em 2015, e a partir dali começamos uma amizade da qual eu jamais poderia imaginar quão profunda, verdadeira e eterna ela se tornaria. Você é uma inspiração e um grande orgulho para todos nós. Sua dedicação, perfeccionismo, excelência, companheirismo, doação, abdicação, humildade e alegria são alguns

dos tantos adjetivos que eu posso citar a respeito desse ser iluminado que você é. Você é o filho amável que toda mãe gostaria de ter, o aluno exemplar que todo professor gostaria de ter, o amigo leal e fiel que todos gostariam de ter, o professor perfeito e justo que todos os alunos mereciam ter, o ser humano correto e humilde que o mundo precisa ter! Essa pessoa é você, Luan.

Ainda que eu detivesse em minhas mãos todo ouro e riquezas que existem, toda inteligência do mundo, todos os superpoderes de todos os super-heróis, tivesse o domínio sobre todo universo e todas as galáxias, se eu reunisse tudo isso, ainda seria pouco para retribuir o quanto você merece. Sendo assim Luan, eu peço a Deus que conceda todas as melhores bênçãos sobre sua vida, e que Ele realize os mais puros sonhos do seu coração. Desejo que você continue brilhando no caminho do sucesso e da integralidade. Saiba, mais uma vez, que você pode sempre contar comigo para toda e qualquer situação. Muito obrigado meu irmãozinho, Te Amo sempre e para sempre.

Aos meu Amigo, *Mestre e Professor* Dr. Igor Mariotto Beneti

Meu querido Professor Igor, o responsável por despertar em mim, durante a graduação, o interesse e fascínio pela carreira acadêmica. Sua maneira de lecionar, seu carinho, disposição e vontade de ensinar, seu caráter, sua educação e gentileza, seu relacionamento com nós alunos, tudo isso despertou em mim um encantamento pela docência. Nas primeiras vezes que o vi dando aula, eu simplesmente parei e disse a mim mesma: “eu quero ser igual a ele”, sem dúvidas você foi o professor que mais marcou minha graduação. Me faltam palavras para expressar tanto carinho, amor, gratidão e inspiração que sinto por você Professor. Muito obrigado por me ensinar, me ajudar, me apresentar à Unesp de Araçatuba, e graças a você eu pude conhecer meu atual orientador e graças à sua influência hoje eu sei onde quero chegar. Eu peço a Deus para te abençoar sempre, que você continue sendo esse ser tão iluminado, querido, professor agregador, cirurgião dentista espetacular, pai e marido amoroso, amigo parceiro, uma pessoa ímpar. A você minha eterna admiração e gratidão.

Ao meu querido Coorientador Professor *Juliano Milanezi de Almeida*

Professor Juliano, muito obrigado por compartilhar, orientar e ensinar seu conhecimento clínico e científico da Periodontia comigo e todos os colegas de pós-graduação, saiba que o senhor cumpriu essa árdua e linda missão com muita excelência, profissionalismo, respeito e sensibilidade.

Você, sem sombras de dúvidas, é um dos grandes responsáveis pelo meu crescimento clínico dentro do vasto mundo da Periodontia, sempre lembrarei do senhor por sua impecável habilidade, destreza, respeito e ética para com o paciente, perfeccionismo em cada incisão, em cada sutura, em cada delicadeza de detalhes nos casos mais simples até os mais desafiadores. Tenho o senhor como um grande mestre para me espelhar, um exemplo a ser seguido. Se um dia eu conseguir ter um décimo da “mão” que o senhor tem, saiba que serei uma profissional muito realizada; e repito em dizer: “você é top professor, quando eu crescer quero ser igual você”, essa era a frase da qual eu finalizava todas as clínicas do senhor, rsrs.

Muito obrigado por me ajudar no desenvolvimento da minha pesquisa, por contribuir de maneira tão rica, ímpar e indispensável no nosso trabalho, que Deus o retribua por tudo! Muito obrigado querido Professor.

À querida Professora *Letícia Helena Theodoro*

Professora, me sinto honrada em poder compartilhar esse período da minha vida e da minha formação com a senhora. Uma pessoa que é sinônimo de competência, inteligência, praticidade, ética, humanidade e de elegância indiscutível. A senhora sempre me tratou com muito carinho, atenção e disponibilidade, me deu a riquíssima oportunidade de participar da sua clínica no projeto de extensão por dois anos, a qual fez toda diferença no meu aprendizado aqui na FOA, o modo como a senhora sempre nos conduzia e orientava, com certeza ficarão eternizados em mim.

Sou uma grande admiradora da profissional, pesquisadora, docente e pessoa que você é. Um grande exemplo, do qual eu me espelho e que vai muito além das paredes da faculdade. Muito obrigado por sua contribuição clínica, científica e humana para comigo, e repito em dizer “professora sua aula não é só uma

aula, é um show, um espetáculo!” como eu dizia ao final de suas aulas na graduação, rsrsrs. Muito obrigada por tudo, Professora!

À querida *Professora Maria José Hitomi Nagata*

Professora, muito obrigada por seus ensinamentos, disponibilidade, dedicação e contribuição em nossa formação científica e acadêmica. A senhora é um exemplo de docente e pesquisadora. Sempre manteve uma conduta íntegra, ética, disciplinada, de excelência e perfeccionismo. Seu humanismo e profissionalismo para com os pacientes e alunos me fazem ter um imenso respeito e admiração pela senhora.

Muito obrigada por tudo!

Ao querido *Professor Valdir Gouveia Garcia*

Professor tão querido, especial, e um verdadeiro ícone vivo da Periodontia mundial. É uma grande honra ter o conhecido e convivido, ainda que pouco, e testemunhar da pessoa tão humilde e que nos transmite tanta inspiração, admiração, serenidade, paz, conhecimento, persistência, simplicidade, objetividade, carinho, ética, profissionalismo entre tantas outras virtudes de um verdadeiro Mestre.

Agradeço muito por sua relevante contribuição para que minha pesquisa pudesse ser desenvolvida, graças a sua tão certa escolha, há anos atrás, de estudar os lasers na odontologia e ser um dos pioneiros nessa área, hoje nós podemos aprender um pouco desse vasto universo científico. Professor, com certeza, essa gratidão não é só minha, o mundo e a ciência te agradecem por sua rica colaboração.

Muitíssimo obrigado Professor!

Ao querido *Professor Alvaro Francisco Bosco*

Um docente e um Clínico incrivelmente admirável. Uma pessoa que transforma algo tão difícil de se executar em algo simples e possível.

Professor Álvaro, muito obrigado por nos acompanhar e orientar em todas as clínicas da pós-graduação, por todo conhecimento passado, todas as dicas

valiosíssimas que só a experiência clínica com embasamento científico pode proporcionar, e que senhor de maneira brilhante e prática nos ensinava. Quão encantador ver o seu amor pela periodontia, pela docência e por nós alunos, pois semanalmente, deixava seu consultório e seus afazeres para estar conosco e isso não tem dinheiro que pague! Que Deus o recompense em dobro! Me sinto orgulhosa de dizer em qualquer lugar do planeta de ter sido sua aluna e discípula.

Muitíssimo obrigado, querido Professor Álvaro.

Aos meus queridos Professores de São José do Rio Preto

Foi com vocês que tudo começou. Professores que muito contribuíram para minha formação e se tornaram mestres inspiradores, e amigos dos quais sei que posso contar. Me sinto privilegiada por ter sido aluna de vocês. Meus eternos professores **Dr. Elias Kassis, Dra. Patricia Garani, Dr. Ricardo Gomes, Dr Rodolfo Bruniera Anchieta, Dra. Paula Bernardes, Dr. Josimar Zinezi, Dr Guilherme Ferreira, Dr. Rodrigo Verona, Dra Viviane Ferreira, Dra Viviane Curi, Dra Vanda Miazaki.** Muita gratidão por todos e que Deus os abençoe.

À querida Família ZOL

Tudo é fruto do trabalho, empenho, dedicação e ajuda de todos vocês. Não é à toa que nossa equipe é assim conhecida como a “*Família ZOL*”, pois, parceria, apoio e amizade nunca nos faltaram. Minha gratidão eterna a cada um de vocês.

Luan, grande amigo, incentivador, inspirador e parceiro, muito obrigado por me ensinar tanto, por me permitir te conhecer, por ter me ajudado em todo meu trajeto até aqui, por estar comigo em todas as etapas experimentais da nossa pesquisa, desde a parte de biotério até as fases laboratoriais. Obrigado por sua dedicação no nosso grupo de pesquisa. Tenho certeza que você vai muito longe no caminho do sucesso.

João, obrigado por sua amizade, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos da pós graduação, por ser o melhor e mais Top parceiro de clínica,

por ter contribuído tanto para minha aprendizagem e crescimento clínico, científico e pessoal, por compartilhar nossos casos clínicos, por ajudar a tomar decisões, por ser meu ombro amigo de todas as horas, por compartilhar de horas e a madrugada dentro no laboratório, por me passar tanta segurança nos momentos de medo, por ser essa pessoa tão incrível, sensível, trabalhador, dedicado, guerreiro e dono de uma história linda escrita por Deus. Você é um amigo que quero levar da faculdade para vida e saiba que você pode contar sempre comigo. Sua alegria também é a minha, saiba que eu vibro a cada uma de suas vitórias e conquistas. Grande garoto, ainda vamos ouvir muito falar de você e com certeza nos encontraremos novamente nesse pequeno mundo que é todo nosso. Te amo e muito obrigado por tudo. Minha admiração por você é eterna.

Nathália, minha amiga irmã! Nathyzinha, só Deus para recompensar tudo que você fez por mim, por nosso trabalho e pelo nosso grupo. Você é um exemplo de garra, dedicação, determinação, uma jovem tão convicta de seus ideais e objetivos, uma filha exemplar e amorosa, uma profissional extremamente competente no que faz. Eu devo tanto a você, minha amiga, que minha gratidão por sua vida e sua amizade são eternas. Te desejo tudo de melhor que a vida possa oferecer, que você venha desfrutar com grande alegria de todo futuro brilhante que tem pela frente. Te admiro muito por sua bondade, altruísmo, compaixão para com próximo, solidariedade, fraternidade, além de ser uma dentista sensacional e uma pesquisadora de sucesso. Saiba que minha mão sempre estará estendida a você para todos os momentos. Sua amizade é uma preciosidade de Deus para minha vida. Te amo minha irmãzinha. Minha eterna gratidão a ti.

Cristian, amigo especial, te agradeço pela convivência durante o ano de estágio, pelo acolhimento, pelas caronas e que muito me ajudou no início dessa trajetória. Deus te abençoe e ilumine em todos os seus planos e conte comigo no que precisar.

Fernanda, grande pequena garota!!! Exemplo de coragem e determinação, uma amiga querida e que tem um lugar muito especial em meu coração. Fer, muito

obrigado por toda ajuda, por me acolher tão bem, por me fazer rir tantas vezes, a convivência com você é algo leve, agradável e prazeroso. Sua inteligência, habilidade e humildade são admiráveis. Deus te abençoe em tudo, amo sua amizade e conte comigo sempre.

Letícia, uma aluna exemplar, inteligente, dedicada, muito esforçada, pró ativa e disposta a ajudar, as vezes um pouquinho estabánada, mas uma parceira leal. Muito obrigada, por sua amizade, pela convivência e por todo seu empenho no nosso grupo. Que esse ano seja especial, pois você está prestes a realizar um dos sonhos, sua formação acadêmica, me orgulho muito de sua conquista. Parabéns! Deus te abençoe.

Jéssica Santana, muito obrigada por seu empenho e dedicação, por ser uma pessoa agradável e contagiante. Torço muito pelo seu futuro profissional e pessoal. Nunca desista dos sonhos, vá em frente e Deus sempre fará o melhor por ti. Obrigado pela amizade e parceria.

Jéssica Freire, a menina mais doce, gentil, delicada e linda que eu conheço. Jé, muito obrigado por sua dedicação e disponibilidade sempre comigo e com grupo, trabalhar com você no laboratório tornava nossos momentos muito mais alegres e coloridos, sua gentileza e leveza sempre nos cativava. Te desejo um lindo e brilhante futuro, sei que você ainda vai muito longe, Deus conduza cada passo seu e continue essa pessoa maravilhosa, sem maldade, com esse coração imenso. Obrigado por tudo lindinha, nossa “cartoon”.

Tiago, muito obrigado por toda parceria, convivência e amizade. Por ter me ajudado em nossa pesquisa, por sua disposição e doação. Sei que ainda vou ouvir falar muito de você, pois é um aluno inteligente e focado. Estarei a sua disposição a hora que precisar. Deus te abençoe muito. Obrigado pelo carinho e amizade sempre.

Luy, que exemplo de aluno, estagiário dedicado, um ser humano maravilhoso, um menino que preza e valoriza tanto sua família, um amigo para todas as horas.

Luyzinho, que prazer tê-lo em nosso grupo, você com certeza veio para agregar, somar e multiplicar nossas conquistas. Não tenho palavras suficientes para agradecer-lo por tudo, que Deus abençoe sua vida em todos os aspectos. Sua humildade, simplicidade e parceria nos motiva, continue esse garoto especial que és. Amo você meu amigo.

Vinicius, muito obrigado por tudo, pelo apoio, pela ajuda nas nossas pesquisas e por sua amizade. Apesar do pouco tempo que convivemos, tenho certeza da pessoa maravilhosa e do aluno ímpar que você é, te desejo muito sucesso, saiba que pode contar comigo sempre e que Deus te abençoe.

Mariane e Isabella, que acabaram de chegar, muito obrigado pela amizade e parceria de vocês.

Aos *Amigos* do Departamento de Ciências Básicas

Gestter, meu amigo querido, um exemplo de discente comprometido e dedicado. Minha admiração por você é imensa. Obrigado pelo convívio em tantas Imunos, biotérios, almoços e caronas. É um aprendizado constante conviver com um amigo tão humilde, honesto, educado, divertido, de bem com a vida, inteligente, disposto, que tem prazer em ensinar, e tão parceiro como você. Muito obrigado pela amizade, eu torço muito pelo seu sucesso, te desejo uma gloriosa defesa de doutorado, muitas conquistas, sucesso, e que seu cabelo cresça (rsrsrs), que vida seja doce e alegre. Amo você.

Aos amigos **Jaqueline Suemi Hassumi, Leticia Pitol, Naara Monteiro, Ana Claudia Ervolino, José Neto, Maria Clara Bertoline, Kelly Torres, Bruna Kotake** obrigado pela parceria e amizade de sempre, por ajudarem sempre que precisamos. Deus os abençoe ricamente.

À querida *Professora* Roberta Okamoto

A professora mais chique, elegante, fofa, querida, competente e inteligente que existe! Professora que honra ter sido sua aluna na pós-graduação, e mais ainda ter convivido tão próxima da senhora todo esse tempo. Todos os momentos no

departamento de ciências básicas foram muito preciosos, enriquecedores e agradáveis, a senhora sempre muito disposta e solícita conosco. Admiro a grande profissional e pessoa que você é, e quero levar sua amizade para toda vida. Muito obrigado por sempre contribuir em nossas pesquisas! Te desejo tudo de bom que a vida possa oferecer.

À querida *Professora Mariza Matsumoto*

Professora querida, especial, fofa, alegre e divertida, inteligentíssima, uma profissional de um potencial incrível. Te conhecer e conviver de perto contigo me fez ver o quão humilde e maravilhosa a senhora é. Os almoços na faculdade, os lanches e festinhas no departamento foram muito mais que momentos de descontração, mas foram momentos em que ficarão para sempre em minhas melhores memórias. Muito obrigado pelos ensinamentos (amo suas aulas de histologia), por me orientar e ensinar inúmeras vezes, por sempre estender as mãos a mim e pela amizade valiosa.

Ao querido *Professor Roberto Botacin*

Professor Mito!!! Inesquecível!!! Com o melhor senso de humor que existe!! Um profissional muito dedicado! Professor Botacin sempre alegrando o ambiente, tornando tudo muito mais agradável. Professor, muito obrigado por tudo, o senhor é um excelente docente (o temido da anatomia, rsrsr), de um coração imenso e tem toda minha admiração! Deus o abençoe e ilumine sempre.

Ao querido *Professor Cláudio Casatti*

Sinônimo de inteligência, competência, docente dedicado e íntegro. Professor Casati, saiba que foi uma honra imensa conhece-lo, minha admiração, respeito e carinho pelo senhor só aumentam. Sempre humilde, família, justo, humano e divertido, compartilhando de suas experiências e histórias conosco. Querido professor muito obrigado por tudo, admiro demais o senhor e te desejo tudo de bom. (Professor “Tibúrcio”, rsrs).

Ao querido *Professor e Amigo Leonardo Peres Faverani*

Professor querido, um ser humano simplesmente encantador! Professor Léo, muito obrigado por toda sua dedicação, ensinamento e momentos compartilhados. Obrigado por sempre estar disposto a contribuir com nosso grupo de pesquisa, por ser um professor tão agregador e querido. Ver o seu crescimento dentro da universidade é uma alegria para mim, te desejo muito sucesso na brilhante carreira. Deus te abençoe sempre, pois você merece muito mais. Obrigado pela honra de ter sido sua aluna, pela amizade e carinho.

Aos demais *Docentes do Departamento de Ciências Básicas*

Prof. Tit. José Américo de Oliveira, Prof. Adj. Roelf Justino Cruz Rizzolo, Prof^a. Ass. Dra. Alaíde Gonçalves, agradeço a todos pelo convívio agradável, pelos ensinamentos e por me inspirarem na carreira acadêmica.

Aos *Docentes do Núcleo de ATM*

Prof. Ass. Dr. Paulo Renato Junqueira Zuim, Profa. Ass. Dra. Karina Helga Turcio Carvalho, Profa. Ass. Dra. Aimeé Maria Giotti, Profa. Ass. Dra. Daniela Atili Brandini de Weert, Prof. Ass. Dr. Renato Salviato Fajardo e Prof. Ass. Dr. Stefan Fiuza de Carvalho Dekon, agradeço pela rica oportunidade que me deram ao participar da Clínica de DTM, que fez toda diferença no meu crescimento profissional e pessoal. Parabéns pelo trabalho desempenhado nesse projeto, pois além de oferecerem atendimento técnico odontológico, devolvem qualidade de vida aos pacientes. Minha eterna gratidão e admiração por todos vocês.

Aos *Colegas de Pós-Graduação*

Cada um com suas histórias, sonhos, objetivos, personalidade e maneira insubstituível de ser, contribuíram muito para meu crescimento. A convivência e a troca de experiências nos tornaram próximos e despertaram em mim uma grande admiração, respeito e carinho por todos vocês.

Muito obrigada por terem feito parte da minha vida!

Fred Lucas, Breno Alves, David Gusman, Marina Módolo, Marta Nueremberg, Dani Janjácomo, Camila Ivanaga, Henrique Mateus, Guilherme Fiorin, Natália de Campos, Paula Faleiros, Carolina Santinoni, Eduarda Belém, Eliane Caliente, Arthur Cavalcanti, Jéssica Gomes, Morganna Souza, Gabriel Mulinari, Fábio Batista, André Oliva e Murilo César, Pedro Ferreira, Jéssica Figueira.

Aos meus *Amigos* de *São José do Rio Preto*

Ahh, a saudade!! Se essa matasse!!! Ainda bem que não. Mesmo separados fisicamente, sei que distância nunca mudou o meu amor, amizade, fraternidade e carinho por vocês. Vocês que estiveram sempre ao meu lado, torceram por mim, oraram por mim e compartilharam da minha vida. O meu coração sempre esteve ligado a vocês todos os dias, horas e segundos possíveis.

Às minhas *Amigas* de *Apartamento*

Minhas irmãzinhas **Deborah, Francys, Manuella e Sandra**. Compartilhar a minha vida com vocês era uma alegria diária, hoje valorizo o quanto vocês foram essenciais nesses 6 anos em Rio Preto. Quando nos separamos de cidade, não imaginava o quanto eu sofreria por estar longe da rotina ao lado de vocês, mas até nisso Deus me ensinou. Aprendi a ama-las muito mais e a demonstrar o quanto são especiais na minha vida, e entendi que a saudade tem lá seu lado bom, porque pudemos viver em harmonia e naquele momento contar com a ajuda uma da outra; foi um aprendizado constante, essa ausência foi dolorida, mas mesmo nos dias em que a saudade não cabia em mim e escorria pelos olhos, eu pude sentir o cuidado de Deus ao me consolar. Por essa e tantas outras coisas que vivemos juntas, eu agradeço muito vocês.

Aos meus *Amigos* e *Irmãos* da *Primeira Igreja Batista* de *SJRP*

“Em todo o tempo ama o amigo e para a hora da angústia nasce o irmão.”
Provérbios 17:17.

Meus amigos, irmãos em Cristo Jesus, que tanto torceram por mim! Como retribuir por tanto carinho, cuidado e preocupação comigo?!. A ajuda dessa igreja

maravilhosa foi algo de Deus, e faltam-me palavras para expressar minha gratidão. Eu louvo ao Senhor Jesus pela vida de cada irmão, pastores e líderes, por todo incentivo, apoio e oração! Minha eterna gratidão à PIB-RP.

Aos meus *A*migos de *F*aculdade e *P*rofissão

Pessoas marcantes, inesquecíveis que sempre estiveram ao meu lado. Às amigas de faculdade, **Ana Lídia, Deise Cristina, Shirley, Renata, Aline Barreto, Aline Alampi, Anna Munique, Francys Paula, Stephanie, Sabrina e Fernanda**, muito obrigado por me incentivarem e acreditarem em mim, as vezes mais até do que eu mesmo. Deus as abençoe infinitamente.

Aos amigos cirurgiões dentista que me inspiraram e me ajudaram durante meu tempo em Rio Preto, **Dr. Tadeu, Dra. Cassia e Dra. Stefani Guerra, Dra. Kalizia Okuda, Dra. Patrícia Bovo, Professora Dra. Patrícia Garani, Dr. Rodrigo Mariani, Dr. Silvio Pardo, Dr. Fleury Mattos da Cruz, Dra. Milene Pinhatari, Professor Dr. Rodolfo Anchieta, Dr. Alex Angelino, Professora Dra. Bella Ishikiriana e Professor Dr. Sergio Ishikiriana**, profissionais incríveis que me inspiram a querer ser melhor a cada dia, cada um contribui imensamente para minha formação e não há preço que pague todos os valores e conhecimentos que pude obter com vocês. Muito obrigado por tudo.

Aos meus *F*amiliares

A família é o maior e mais valioso presente que ganhamos de Deus. Agradeço a todos os meus familiares que sempre torceram por mim, que desde a graduação me apoiaram e ajudaram de alguma forma. Nesse tempo em Araçatuba eu agradeço em especial à minha tia-mãe **Joely**, meu tio **Cícero** e primos **Eduardo e Yago** que por incontáveis vezes prontamente me ajudaram tanto financeiramente, como em me dar forças nos momentos mais difíceis que passei. Tios e primos muito obrigado por tudo, sem vocês eu não teria alcançado mais essa conquista. Amo vocês.

Aos meus primos **Maicom, Regiani** e nossa princesa **Maitê Sá**, muito obrigado por compartilharem tantos momentos comigo, por me aconselharem, por me mostrarem sempre um bom caminho em todas adversidades. Ter vocês morando

em Araçatuba foi uma grande demonstração do cuidado de Deus para comigo, afinal, Ele já sabia o quanto eu precisaria da minha família! Amo muito vocês.

Aos *Amigos de Araçatuba*

Viviane, minha amiga querida, parceira de apartamento e vida. Vivi, eu tenho muito a te agradecer por tudo, por ter aberto as portas de sua casa para me acolher no momento que eu mais precisei, obrigado pelas conversas, pelos passeios, por muitas vezes ser a minha “família” nos almoços de domingo, por compartilhar da sua vida e sua rotina comigo, por me aconselhar e ajudar sempre. Eu louvo e agradeço a Deus por sua vida e peço que Ele te retribua em dobro, que vida lhe traga belas e prazerosas surpresas e conquistas. Vou sentir falta de tudo aqui, e da nossa convivência.

Larissa e Leticia, amigas queridas, presentes de Deus. Muito obrigado por me receberem tão bem, por terem aberto suas vidas, suas casas e oferecem essa linda amizade. Obrigado por me fazerem sentir tão bem aqui em Araçatuba, por me acolherem tão carinhosamente. Que Deus possa iluminar o caminho de vocês e que sejam muito abençoadas e felizes.

À minha *Amiga Fernanda Caroline*

Nandinha minha amiga do coração!!! Sou eternamente grata a você por toda ajuda, amizade e companheirismo para comigo. No momento que tanto precisei, você se prontificou e estendeu suas mãos para mim, abrindo as portas de sua casa, e com isso permitiu que eu pudesse fazer o estágio aqui durante todo ano de 2015. Nos conhecemos desde que nascemos, nunca fomos tão próximas, mas Deus e vida nos deu uma segunda chance de nos reencontrarmos e construirmos uma amizade. Saiba que podes sempre contar comigo, que será um prazer retribuir tudo o que fez por mim. Deus te abençoe sempre. Amo você amiga! Muito obrigado!

Aos Amigos e Irmãos da Quinta Igreja Batista de Araçatuba

Ao meu **Pastor Silvio Hinzs** e à sua família. A convivência e a comunhão com vocês fortaleceram e alegraram meus dias, sou muito grata a Deus por ter colocados pessoas tão incríveis, especiais e inesquecíveis. Quero sempre tê-los em minha vida! Muito obrigado **Lucas, Rodrigo, Christian, Thaís, Carol Galdeano, Raquel Caetano, Roberta, Renata, Maria Eduarda, Julio César, Marcos Júnior, Eduarda, Aliandra, Thiago, Raquel Paraizo, Raquel Pacheco, Célia e José Carlos, Fran e Marquinho e Vinícius.**

Agradeço em especial à irmã **Andrea Santana**, pela amizade, parceria e ajuda nas aulas de inglês. Quando eu precisei das suas aulas, de prontidão você não hesitou em me ajudar, e com isso tive a oportunidade de ganhar uma amiga, uma irmã da qual eu levo em meu coração com muito carinho e gratidão. Andréa, muito obrigado por toda ajuda. Deus te abençoe sempre.

Agradecimientos

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, e em especial à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, nas pessoas do senhor diretor **Prof. Tit. Wilson Roberto Poi** e do senhor vice-diretor **Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho**, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação a nível de mestrado e esta pesquisa científica.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, na pessoa de seu coordenador **Prof. Adj André Luiz Fraga Briso**, por sua dedicação e excelência com que o conduz.

A todos meus eternos e admirados **Mestres Professores**, que tanto se dedicam ao ensino com excelência e disposição para transmitir todo o conhecimento necessário, não se limitando às teorias, mas permitindo que eu realmente vivesse a Odontologia, e em especial a Periodontia, em sua forma mais profunda e linda. Com certeza encerro mais esse ciclo da minha vida com muito mais conhecimento e segurança graças ao alicerce adquirido nesta casa. Muito obrigado.

Meu agradecimento à **Disciplina de Histologia e Embriologia**, representada pelos professores **Prof. Adj. Cláudio Aparecido Casatti**, **Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino**, **Prof.^a Ass. Dra. Alaíde Gonçalves** e **Prof.^a Adj. Dra. Mariza Akemi Matsumoto**, pela oportunidade de acompanhar as aulas e laboratórios, e me fascinarem pela linda histologia.

Não menos importante, agradeço também à **Disciplina de Periodontia** do curso de graduação, ilustramente representada pelos professores **Prof.^a Adj. Maria José Hitomi Nagata**, **Prof.^a Adj. Leticia Helena Theodoro**, **Prof. Adj. Juliano Milanezi de Almeida**, **Prof.^a Subs. Natalia de Campos**, pela oportunidade de acompanhar todas as aulas, laboratórios e clínicas da disciplina, me dando a oportunidade de aprimorar os conhecimentos e serem uma referência para minha vida acadêmica.

Ao **Departamento de Ciências Básicas**, na pessoa da chefe de departamento **Prof.^a Adj. Doris Hissako Sumida**, e aos servidores técnicos administrativos

Eliseide Maria Ferreira Silva Navega, André Luís Mattos Piedade e Arnaldo César dos Santos, pelo apoio e possibilidade de execução de toda a parte experimental e laboratorial do presente trabalho, e da agradável convivência.

Ao **Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada** na pessoa do **chefe de departamento Prof. Adj. Juliano Milanezi de Almeida**.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Valéria, Cristiane, Diogo e, em especial à Lilian** pela eficiência e presteza de sempre.

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

Aos funcionários do **Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Camilo e João Batista** que ofereceram suporte para a obtenção dos animais utilizados nesta pesquisa.

Aos funcionários da **Seção de Manutenção** pela disponibilidade em ajudar sempre que surgiu algum imprevisto.

Aos funcionários do **SAEPE, Patrik, Renato, Samuel e Maurício**, pela ajuda prestada com os laboratórios e salas de aula da graduação, nas multimídias e até no concerto do meu notebook, sempre com muita paciência e disponibilidade.

A todos os funcionários que estiveram presentes nesta etapa da minha vida! Aos que me ajudaram de alguma maneira a construir a minha história dentro desta Universidade durante a Pós-graduação.

À querida doutoranda **Melise Jacon Peres Ueno** por me ajudar e ensinar no aparelho de microtomografia computadorizada, que mesmo com barrigão de

quase 9 meses, estava disposta, paciente e alegre conosco. E também à doutoranda **Cláudia Cristina Bigueti**, por acompanhar em alguns dias das análises microtomográficas.

Aos **alunos do Curso de Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, em especial as **Turmas XV e XVI** que pude acompanhar durante todo ano letivo, obrigado pelo respeito, credibilidade e confiança depositados a nós alunos da Pós-graduação.

Aos meus **pacientes**, pelo voto de confiança e pela esperança que depositam em mim... Meu profundo respeito!

Aos meus **animais experimentais**... Meu profundo respeito!

Επίγραφε

*“Aquele que é capaz de fazer infinitamente mais do
que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com
o seu poder que atua em nós” Efésios 3:20*

Resumo

Sá, DP. **TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE EM RATOS TRATADOS COM DOSE ONCOLÓGICA DE ZOLEDRONATO**. 2018. 117 f.: p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba – SP, 2018.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), como monoterapia ou como coadjuvante à raspagem e alisamento radicular (RAR) no tratamento da periodontite experimental (PE) em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato. Cento e vinte ratos foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais, cada um composto por 30 ratos. Durante 8 semanas, foi administrado 100 µg/Kg de zoledronato com intervalo de três dias entre as injeções. No 14^o dia do início do protocolo medicamentoso, foi instalada uma ligadura nos primeiros molares inferiores para indução de PE. Após 14 dias a ligadura foi removida e foram realizados os seguintes tratamentos: exclusivamente uma sessão de RAR (grupo PE-RAR), exclusivamente três sessões de aPDT (grupo PE-aPDT) e uma sessão de RAR associada à três sessões de aPDT (grupo PE-RAR-aPDT). As sessões de aPDT foram realizadas aos 0, 2 e 4 dias pós tratamento local. No grupo PE-NL não foi realizado nenhum tratamento local. Após 7, 14 e 28 dias pós tratamento periodontal local foram realizadas as eutanásias. Foi realizada análise microtomográfica (micro-CT), análise histopatológica, histométrica da porcentagem tecido ósseo (PTO) e porcentagem de tecido ósseo não vital (PTONV) e imunistoquímica para fator de crescimento transformador beta (TGFβ) nos tecidos periodontais. Os dados obtidos foram submetidos à análise

quantitativa e estatística com nível de significância de 5%. Não houve diferença estatisticamente significativa nos seguintes parâmetros microtomográficos: perda óssea alveolar, volume ósseo na furca, número e espessura de trabéculas ósseas. O processo de reparação tecidual pós tratamento foi mais favorável em PE-aPDT e PE-RAR-aPDT. Não houve diferença estatisticamente significativa na PTO, todavia, a PTONV foi menor tanto em PE-aPDT quanto em PE-RAR-aPDT. A imunomarcagem para TGF β foi maior em PE-RAR, PE-aPDT e PE-RAR-aPDT aos 7 dias pós tratamento. Conclui-se que o emprego da aPDT, quando empregada como monoterapia ou como terapia coadjuvante à RAR, se mostrou mais efetiva e segura para tratamento da PE em ratos.

Palavras chaves: Osteonecrose; Fotoquimioterapia; Periodontite; Difosfonatos.

Abstract

Sá, DP. **ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY IN THE TREATMENT OF PERIODONTITIS IN TREATED RATS WITH ONCOLOGICAL DOSE OF ZOLEDRONATE.** 2018. 117 f.: p Essay (Master's Degree) – São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Aracatuba – SP, 2018.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) as a monotherapy or adjunct to scaling and root planning (SRP) for the treatment of experimental periodontitis (EP) in rats treated with oncological dosage of zoledronate. A hundred and twenty rats were randomly divided in four experimental groups, each one of them composed by 30 rats. During a period of 8 weeks, 100 µg/Kg of zoledronate was administered every three days. After 14 days of the beginning of the drug protocol, a ligature was installed in the lower first molars for EP induction. After 14 days, ligature was removed and the following treatments were performed: a single session of SRP, exclusively (group EP-SRP), three sessions of aPDT, exclusively (group EP-aPDT), and one session of SRP associated to the three sessions of aPDT (group EP-SRP-aPDT). aPDT sessions were performed at days 0, 2, and 4 after the local treatment. In the fourth group, no local treatment was made (EP-NLT). After 7, 14, and 28 days after the local periodontal treatment, the animals were euthanized. Microcomputed tomography (micro-CT) analysis, histopathologic analysis, percentage of bone tissue (PBT), percentage of non-vital bone (PNVB), and immunohistochemistry for transforming growth factor beta (TGFβ) in the periodontal tissues were performed. Obtained data underwent quantitative analysis and statistics considering 5% level of significance. No statistical

difference was detected in the following microtomographic parameters: alveolar bone loss, bone volume in the furcation, number and thickness of the trabeculae. Tissue healing after the treatment was more favorable in EP-aPDT and EP-RAR-aPDT groups. No significant differences were detected in PTO; however, PNVB was lower both in EP-aPDT and EP-SRP. Immunolabeling for TGF β was higher in EP-SRP, EP-aPDT and EP-SRP-aPDT at day 7 post-treatment. It is concluded that when aPDT is used as monotherapy or as adjunct therapy associated with SRP, it is more effective and safe for the treatment of EP in rats.

Key words: Osteonecrosis; Photochemotherapy; Periodontitis; Diphosphonates.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Delineamento experimental do estudo. **(a)** Esquema ilustrando o delineamento experimental com os procedimentos experimentais executados em seus respectivos intervalos de tempo. **(b-c)** Aspecto clínico do primeiro molar inferior com PE duas semanas após a instalação da ligadura e imediatamente após sua remoção. **(d-e)** Execução do procedimento de RAR no primeiro molar inferior, a qual foi realizada nos grupos PE-RAR e PE-RAR-aPDT. **(f-g)** Execução da aPDT no primeiro molar inferior, a qual foi realizada nos grupos PE-aPDT e PE-RAR-aPDT (em **f** está sendo evidenciada a aplicação do fotosensibilizador e em **g** está sendo mostrada a irradiação com laser de baixa potência. 88
- Figura 2:** Aspecto microtomográfico do primeiro molar inferior e periodonto de inserção aos 28 dias pós tratamento periodontal local. **(a-d)** Gráficos evidenciando a perda óssea alveolar (POA) **(a)**, o volume ósseo alveolar (VOF) **(b)**, o número de trabéculas ósseas (Th.Tb) **(c)** e a espessura de trabéculas ósseas **(d)** no periodonto de inserção do primeiro molar inferior. **(e-h)** Aspecto microtomográfico bidimensional do primeiro molar inferior e periodonto de inserção em PE-NTL **(e)**, PE-RAR **(f)**, PE-aPDT **(g)** e PE-RAR-aPDT **(h)**. **(i-p)** Aspecto microtomográfico tridimensional do primeiro molar inferior e periodonto de inserção em uma vista vestibular **(i-l)** e em uma vista lingual **(m-p)** da mandíbula em PE-NTL **(i, m)**, PE-RAR **(j, n)**, PE-aPDT **(k, o)** e PE-RAR-aPDT **(l, p)**. Teste estatístico: ANOVA – Tukey. Barras de escala: 1 mm. 89
- Figura 3:** Fotomicrografias mostrando o aspecto histológico do primeiro molar inferior e periodonto de inserção aos 7 dias pós tratamento periodontal local em PE-NTL **(a)**, PE-RAR **(b)**, PE-aPDT **(c)** e PE-RAR-aPDT **(d)**. Abreviações e símbolos: ii, infiltrado inflamatório; oa, osso alveolar, rn, restos necróticos; setas brancas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias ou ocupadas por restos necróticos de osteócitos; tc, tecido conjuntivo. Aumento original: 100x. Barras de escala: 300µm. Coloração: HE. 90

Figura 4: Fotomicrografias mostrando o aspecto histológico do primeiro molar inferior e periodonto de inserção aos 28 dias pós tratamento periodontal local em PE-NTL **(a)**, PE-RAR **(b)**, PE-aPDT **(c)** e PE-RAR-aPDT **(d)**. Abreviações e símbolos: ii, infiltrado inflamatório; oa, osso alveolar, rn, restos necróticos; setas brancas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias ou ocupadas por restos necróticos de osteócitos; tc, tecido conjuntivo. Aumento original: 100x. Barras de escala: 300µm. Coloração: HE.

91

Figura 5: Gráficos evidenciando a porcentagem de tecido ósseo (PTO) **(a)** e a porcentagem de tecido ósseo não vital (PTONV) **(b)** na região de furca do primeiro molar inferior aos 7, 14 e 28 dias pós tratamento periodontal local nos grupos PE-NTL, PE-RAR, PE-aPDT e PE-RAR-aPDT. Teste estatístico: ANOVA – Tukey. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-NTL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-RAR; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-aPDT; §, diferença estatisticamente significativa intragrupo em relação aos 7 d pós tratamento periodontal local.

92

Figura 6: Imunomarcação para TGFβ no periodonto de inserção do primeiro molar inferior aos 7 dias pós tratamento periodontal local. Gráficos mostrando a densidade óptica de imunomarcação para TGFβ **(a)** nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrografias evidenciando a imunomarcação em PE-NTL **(b)**, PE-RAR **(c)**, PE-aPDT **(d)** e PE-RAR-aPDT **(e)**. Teste estatístico: ANOVA – Tukey. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-NTL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-RAR; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-aPDT; §, diferença estatisticamente significativa intragrupo em relação aos 7 d pós tratamento periodontal local. Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar. Aumento original: 400x. Barras de escala: 100 µm.

93

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do padrão inflamatório dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos e períodos experimentais. 95

Tabela 2: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do padrão de estruturação dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos e períodos experimentais. 96

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

AAOMS: Associação Americana de Cirurgiões Buco-Maxilo-Faciais

AF: Área de furca

AM: Amazonas

ANOVA: Análise de Variância

AO: Osso alveolar

aPDT: Terapia fotodinâmica antimicrobiana

ATF: Área total de furca

ATO: Área ocupada por tecido ósseo

BPs: Bisfosfonatos

CEUA: Comissão de ética no uso em animais

Cm²: Centímetro quadrado

DAB: Tetracloridrato de diamibenzidina

DP: Doença periodontal

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO: Espécies reativas de oxigênio

EUA: Estados Unidos da América

FOA: Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g: Gramas

HE: Hematoxilina e eosina

InGaAlP: Índio Gálio Alumínio Fósforo

J: Joule

J/cm²: Joules por centímetro quadrado

Kg: Kilograma

M: Molar

mg: Miligrama

ml: Mililitros

mm²: Milímetros quadrados

mW: Miliwatts

micro-CT: Microtomografia computadorizada

nm: Nanômetro

n = Tamanho

NaCl: Cloreto de sódio

NTL: Nenhum tratamento local

ONM-M: Osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa

p: Probabilidade do valor

PBS: Tampão fosfato salino

PE: Periodontite experimental

pH: Potencial hidrogeniônico

POA: Perda óssea alveolar

PTO: Porcentagem de tecido ósseo

PTONV: Porcentagem de tecido ósseo não vital

RAR: Raspagem e alisamento radicular

s: Segundos

SP: São Paulo

TGFβ: Fator de transformação do crescimento beta

Th.TB : Espessura de trabéculas ósseas

Th.N: Número de trabéculas ósseas

μm: Micrômetro

μg/kg: Microgramas por quilograma

μg: Micrograma

μl: Microlitro

UNESP: Universidade Estadual Paulista

VOF: Volume de osso na furca

VOI: Volume ósseo de interesse

W: Watts

Lista de Símbolos

LISTAS DE SÍMBOLOS

%: Por centro

@: Arroba

<: Menor

≤: Menor ou igual

=: Igual

+: Mais

-: Menos

±: Mais ou menos

β: Beta

®: Marca registrada

°C: Graus Celsius

x: Vezes

Lista de Anexos

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Normas para publicação segundo o periódico Journal of Periodontology. 98

ANEXO B: Certificado da Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA). 117

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3. RESULTADOS.....	62
4. DISCUSSÃO.....	65
5. CONCLUSÃO.....	70
6. AGRADECIMENTOS	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
FIGURAS.....	87
TABELAS.....	94
ANEXOS.....	97

*Manuscrito para publicação**

*Journal of Periodontology

- Anexo A.



LABORATÓRIO DE
OSTEOBIOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA

Title: ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY IN THE TREATMENT OF PERIODONTITIS IN TREATED RATS WITH ONCOLOGICAL DOSE OF ZOLEDRONATE

Author:

* **Daniela Pereira de Sá**¹ DDS

† **Juliano Milanezi de Almeida**² DDS, MS, PhD

‡ **Edilson Ervolino**³ DDS, MS, PhD

* Ms Student in Dentistry at Araçatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista-UNESP, Department of Surgery and Integrated Clinic. Brazil.

† Adjunct Professor at Araçatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista- UNESP, Department of Surgery and Integrated Clinic. Brazil.

‡ Assistant Professor at Araçatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista-UNESP, Department of Basic Sciences. Brazil.

Corresponding author: Edilson Ervolino

Address: Rodovia Marechal Rondon, Km 528, S/N, Araçatuba - SP, Brazil.

CEP: 16066-840

Phone: (+55) 18 3636-2801

E-mail: eervolino@foa.unesp.br

1. INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BFs) consistem em uma linha de medicamentos empregados para tratamento de doenças que desencadeiam osteólise, pois são potentes inibidores da reabsorção óssea.^{1,2} Apesar de apresentarem grande efetividade terapêutica, tais medicamentos estão relacionados com um grave efeito adverso que se constitui em um grande desafio para a odontologia, a osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONM-M), da qual foi definida como a presença de osso exposto, região maxilo-facial por um período maior que oito semanas, em pacientes submetidos à tratamento prévio ou atual com droga antirreabsortiva e/ou antiangiogênica.³ A ONM-M afeta até 12% dos pacientes sob terapia com BFs administrados pela via intravenosa e é menos frequente naqueles sob tratamento com BFs administrados pela via oral. Além disso, os BFs têm um efeito cumulativo, que pode afetar até 21% dos pacientes após o terceiro ano de uso.^{4,5}

A etiopatogenia da ONM-M é pobremente compreendida, o que dificulta sobremaneira sua prevenção e tratamento.⁶ Dentre os supostos fatores etiopatogênicos destacam-se: a severa inibição da atividade osteoclástica, o que impossibilitaria a remodelação óssea e resultaria no acúmulo de tecido ósseo não vital; a ação citotóxica sobre as células da mucosa bucal, o que reduziria a capacidade de reparação dos tecidos moles, conseqüentemente, ocasionaria o comprometimento do tecido ósseo subjacente; o efeito antiangiogênico, que resultaria tanto na necrose avascular do tecido ósseo quanto no comprometimento da reparação tecidual; a maior susceptibilidade à infecção, uma vez que ocorre aumento na adesão e colonização de bactérias ao tecido ósseo sob terapia com BFs quando o mesmo fica exposto na cavidade bucal; e

a disfunção da resposta imunológica local, o que comprometeria os mecanismos tanto de defesa quanto de reparação tecidual.⁷⁻¹⁶

Estudos epidemiológicos têm apontado a doença periodontal (DP) como um importante fator de risco local para a ONM-M. De modo semelhante, estudos empregando modelos animais com PE correlacionaram esta condição com a ONM-M.^{7, 17-22} O tratamento padrão para a periodontite é a raspagem e alisamento radicular (RAR), a qual promove a remoção de depósitos bacterianos e fatores retentivos de placa bacteriana.²³ Estudos clássicos na literatura comprovam a efetividade da RAR em reverter e estabilizar a periodontite.²⁴⁻²⁸ Similarmente, estudos experimentais em animais mostram que a RAR também é efetiva no tratamento da PE.²⁹⁻³¹ Em contrapartida, Braun e Iacono³² reportaram a ocorrência de ONM-M pós-tratamento de periodontite com RAR em paciente sob tratamento com zoledronato. Araújo³³ demonstrou que o emprego da RAR para tratamento da PE em ratos submetido ao tratamento com dose oncológica de zoledronato, elevou substancialmente a quantidade de tecido ósseo não vital no sítio tratado, condizente com um estágio 0 da ONM-M, ou seja, características histológicas ou radiográfica ou subclínicas de necrose tecidual; todavia, não reportou manifestação clínica da ONM-M.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), uma modalidade de laserterapia, consiste em uma reação fotoquímica oxigênio-dependente, que ocorre sob ação da luz, na qual a ativação de um agente fotossensibilizador gera altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando a uma cascata de eventos oxidativos que promovem a morte bacteriana pela ação citotóxica.³⁴⁻³⁸ Além da ação antimicrobiana, alguns estudos mostram que a aPDT ainda

preserva grande parte das ações bioestimulatórias do laser em baixa intensidade.³⁹⁻⁴¹

Longo⁴² reportou que o emprego da aPDT, como monoterapia ou como coadjuvante à RAR, foi efetiva no tratamento da PE em ratos sob tratamento com o quimioterápico 5-fluorouracil. Em função dos efeitos negativos que o tratamento com zoledronato promove nos sítios com DP e diante dos efeitos benéficos que o emprego da aPDT exerce sobre os tecidos periodontais, o objetivo do presente estudo foi avaliar a efetividade e a segurança da aPDT no tratamento da PE em ratos sob terapia com dose oncológica de zoledronato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho utilizou 120 ratos machos (6 meses de idade), da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com peso corporal compreendido entre 400 – 550g. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “*Guide to the care and use of experimental animals*” e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA – UNESP (**PROCESSO FOA nº 534-2016**).

2.1. Delineamento experimental

2.1.1. Anestesia

Todos os procedimentos de manipulação experimental (instalação da ligadura, RAR, RAR-aPDT, aPDT e eutanásia) foram executados sob ação de cloridrato de cetamina (80mg/kg)[§] e cloridrato de xilazina^{||} (10mg/kg) pela via de administração intramuscular.

2.1.2. Protocolo de tratamento com dose oncológica de zoledronato

O tratamento com zoledronato teve duração de oito semanas. A administração de zoledronato[¶] ocorreu pela via intraperitoneal obedecendo um intervalo de três dias entre as injeções. A dose de zoledronato foi de 100µg/Kg, a qual foi diluída em 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%.[#] A dose de zoledronato e plano de tratamento consistiram em uma adaptação para o rato do

[§] Francotar[®], Virbac, SP, Brazil.

^{||} Rompum[®], Bayer, RS, Brazil.

[¶] Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA.

[#] MEDFLEX, Guará – Brasília – DF – Brazil.

protocolo empregado para complementação da terapia oncológica em humanos.^{43,44}

2.1.3. Periodontite induzida por ligadura

Na segunda semana de tratamento com zoledronato, foi instalada uma ligadura de algodão** ao redor do primeiro molar inferior direito e esquerdo, com intuito de promover o acúmulo de placa bacteriana e, conseqüentemente, induzir a PE.

2.1.4. Grupos experimentais

Na quarta semana de tratamento com zoledronato a ligadura foi removida e os ratos foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais: PE-NTL (n=30), que não receberam nenhum tratamento periodontal local; PE-RAR (n=30), cuja PE foi tratada exclusivamente com uma sessão de RAR; PE-aPDT (n=30), cuja PE foi tratada exclusivamente com três sessões de aPDT; e PE-RAR-aPDT (n=30), cuja PE foi tratada com uma sessão de RAR e três sessões de aPDT (Figura 1).

2.1.5. Raspagem e alisamento radicular

Foi realizada sessão única de RAR com curetas manuais mini-five 1-2* através de dez movimentos de tração disto-mesial, nas faces vestibular e lingual, e dez movimentos de tração cérvico-oclusais, nas áreas interproximais e de furca.

** fio de algodão #24; Coats Corrente, SP, Brazil.

* Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, USA.

2.1.6. Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

A aPDT foi realizada aos 0, 2 e 4 dias pós RAR, totalizando 3 sessões. Foi efetuada a deposição de 1,0 ml do agente fossensibilizador azul de metileno[†] (100 µg/ml) na bolsa periodontal dos primeiros molares inferiores, o qual permaneceu por sessenta segundos em contato com os tecidos periodontais. Em seguida foi realizada a irradiação com laser de baixa intensidade. O laser utilizado no presente estudo foi THERA LASE[‡] com emissor de InGaAlP nos seguintes parâmetros: comprimento de onda - 660 nm (laser visível - vermelho); potência - 35 mW; modo de operação - laser contínuo; diâmetro do spot - 0,0283 cm²; modo de aplicação – contato pontual; energia - 2,1 J/ponto; quantidade de pontos de aplicação - 2; tempo de exposição - 60s; densidade energética por ponto - 74,2 J/cm²; irradiância - 1,23 W/cm². O laser foi aplicado nas tábuas ósseas vestibular e lingual do primeiro molar inferior com a ponteira laser posicionada perpendicularmente às raízes do dente. O protocolo aPDT e os parâmetros do laser basearam-se em estudos de Longo⁴² e Garcia et al.^{42,45}

2.1.7. Eutanásia

Findado o protocolo experimental, os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca com solução de 0,9% de cloreto de sódio acrescida de 0,1% de heparina[§] (100 ml), seguida de solução fixadora (800 ml) constituída de 4% de formaldeído^{||} em tampão

[†] Farmácia Aphoticário. Araçatuba – SP – Brazil.

[‡] D.M.C. Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brazil.

[§] CRISTALIA PRODUCTOS QUIMICOS FARMACEUTICOS LTDA

^{||} Sigma, Saint Louis, MO, USA.

fosfato salino (PBS)[¶] 0,1M, pH 7,4, aos 7, 14 e 28 dias pós tratamento periodontal local.

2.2. Amostras

2.2.1. Obtenção das amostras

As hemimandíbulas foram cuidadosamente dissecadas e submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora durante 72 horas.

2.2.2. Processamento das amostras

As hemimandíbulas esquerdas e direitas foram destinadas às análises microscópicas e microtomográficas, respectivamente. As hemimandíbulas direitas foram apenas submetidas à lavagem em água durante 24 horas. As hemimandíbulas esquerdas foram submetidas à desmineralização em PBS acrescido de 10% de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA),[#] durante 60 dias. Posteriormente, tais amostras foram processadas de modo convencional, incluídas em parafina e seccionadas (4 µm de espessura) em micrótomo.

Para a análise histopatológica dos tecidos periodontais e para a análise histométrica da PTO e PTONV as secções histológicas foram submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina (HE).

Para análise imunoistoquímica, as secções histológicas foram submetidas à técnica da imunoperoxidase indireta empregando-se: anticorpo primário anti-TGFβ do rato gerado em cabra^{**} por 24 horas; anticorpo secundário biotilado^{*}

[¶] Sigma, Saint Louis, MO, USA.

[#] Sigma, Saint Louis, MO, USA.

^{**} SC-1348, Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, TX, USA.

^{*} Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA.

por 2 horas; estreptavidina conjugada com HRP[†] por 1 hora; 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB)[‡] por 2 minutos. Não foi efetuada a contracoloração. O processamento imunoistoquímico seguiu o protocolo descrito por Garcia et al.⁴⁵ Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos mesmos procedimentos, suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

2.3. Análise das amostras

2.3.1. Análise da condição geral de saúde e exame intrabucal

Foi verificada a condição geral de saúde dos animais durante todo o período experimental e efetuado o monitoramento do peso corporal periodicamente. Foi realizado o exame intrabucal, que consistiu na inspeção visual minuciosa da cavidade bucal, em especial, dos sítios com PE.

2.3.2. Análise microtomográfica computadorizada

As hemimadíbulas direitas dos grupos PE-NTL, PE-RAR, PE-aPDT e PE-RAR-aPDT aos 28 dias pós tratamentos locais foram escaneadas via microtomógrafo[§] acoplado a um computador, Workstation de Controle ^{||} (Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia – MUBIO, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA-UNESP). Seguiu-se os seguintes parâmetros para o escaneamento: resolução de 8 µm, ângulo de rotação de 0.5°, corrente de feixe a 500 µA, filtro de alumínio de 0,5 mm com tempo de exposição de 540 milissegundos. As imagens foram reconstruídas via programa N-RECON

[†] Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit[®].

[‡] DAB chromogen Kit[®], Dako Laboratories, CA, EUA.

[§] SkyScan 1272, Bucker[®].

^{||} Dell[®].

v.1.6.3.3 em cerca de 380 a 400 fatias de acordo com os parâmetros adotados. Após a reconstrução, as imagens foram processadas pelo programa C-TAN v 1.10.11.0 para obtenção dos cortes sagitais, e posteriormente foram analisadas pelo programa DATAVIEWER v 1.4.3 para definição do área de interesse e análise da região de furca do primeiro molar inferior direito, e desta juntamente com as faces mesial e distal deste dente. O software CT-VOX v 2.0.0.0 foi utilizado para a obtenção e visualização das imagens tridimensionais das hemimandíbulas.

As análises das imagens obtidas pela microtomografia computadorizada ao serem importadas para o programa DATAVIEWER foram tomadas as medidas lineares nas três dimensões espaciais e, em seguida, todas as imagens foram orientadas e salvas em fatias coronais (2000x1336). As medidas volumétricas foram realizadas após a seleção de uma região de interesse 3D com o programa C-TAN. Durante o desenho da região de interesse, o examinador buscou o corte onde a cavidade pulpar situada nas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior direito estivessem mais amplas e visíveis, determinando a região central da furca. Após identificadas estas regiões, foram selecionados 25 cortes anteriores e 25 cortes posteriores à primeira imagem escolhida, totalizando uma área de 50 cortes da região central da furca para análise quantitativa do tecido ósseo. A região de interesse foi delimitada circundando a região total da furca do primeiro molar inferior esquerdo. Após definidos tais limites, estes foram ajustados conforme necessidade. Esta forma delineada foi adequadamente submetida à interpolação da área a ser medida e se obteve o volume de interesse. Na imagem tridimensional, os índices foram calculados através da região de interesse binarizada. Os parâmetros

arquitetônicos avaliados foram: volume ósseo na região de furca (VOF-%), espessura de trabéculas no tecido ósseo na região de furca (Tb.Th-mm²), número de trabéculas no tecido ósseo da região de furca (Tb.N - mm²). Para análise do nível da perda óssea alveolar (POA), com auxílio do programa DATAVIEWER, foram feitas três medidas lineares da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar na mesial, distal e região central da furca.

2.4 Análise histopatológica dos tecidos periodontais

A análise histopatológica foi efetuada em microscopia de luz por um histologista certificado (E.E.) e cego aos tratamentos, avaliando-se os seguintes parâmetros: intensidade da resposta inflamatória local; extensão do processo inflamatório; reabsorção óssea alveolar, padrão de estruturação do tecido conjuntivo na região de furca, padrão de estruturação do tecido ósseo na região de furca. Os parâmetros e os escores empregados na análise histopatológica estão apresentados nas Tabela 1 e 2.

2.5 Análise histométrica da PTO e PTONV

Três secções histológicas equidistantes foram utilizadas para a mensuração da Porcentagem de Tecido Ósseo (PTO) e da Porcentagem de Tecido Ósseo Não Vital (PTONV) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo.

Para a determinação da PTO na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo, foi utilizado o programa Axiovision 4.8.2.[¶] Inicialmente foi mensurada a Área Total da Furca (ATF) e em seguida a Área Ocupada por Tecido Ósseo

[¶] Carl Zeiss®, Gottingen, Germany.

(ATO), ambas em mm². Posteriormente, foi calculada a PTO. A ATF foi demarcada apicalmente por uma linha reta traçada do ápice da raiz mesial em direção ao ápice da raiz distal. A partir desta linha seguiu-se todo o contorno da superfície externa do cemento situado entre as raízes. A ATO teve o mesmo limite apical da ATF e a partir deste seguiu-se todo o contorno da superfície externa do tecido ósseo entre as raízes. A PTO foi calculada multiplicando-se ATO por 100 e dividindo-se por ATF ($PTO = (ATO \times 100) / ATF$). A PTO foi expressa como porcentagem média \pm desvio padrão em cada grupo experimental.

Para a determinação da PTONV na região de furca foi utilizado o programa descrito anteriormente. Na ATF contornou-se a(s) área(s) constituída(s) por tecido ósseo não vital (TONV). PTONV foi calculada multiplicando-se TONV por 100 e dividindo-se por ATO ($PTONV = (TONV \times 100) / ATO$). A PTONV foi expressa como porcentagem média \pm desvio padrão em cada grupo experimental.

2.6 Análise imunoistoquímica de TGF β nos tecidos periodontais

Foram adquiridas imagens das secções histológicas imunomarcadas com fator de crescimento transformador beta TGF β , como descrito anteriormente. Com o auxílio do programa de análise de imagens foi demarcada a área correspondente à imunomarcção por meio da ferramenta limiar de cor, o que possibilitou a obtenção da densidade óptica de imunomarcção, expressa em porcentagem sob a forma de média \pm desvio padrão.

2.7 Análise estatística

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa Bioestat 5.3.# O tamanho da amostra (n=10) foi calculado para garantir o poder do teste de 95% ($p < 0.05$). Para análise clínica e histopatológica foi empregado o teste de análise de variância de Kruskal-Wallis e o pós teste de Student-Newman-Keuls. Para análise histométrica e imunoistoquímica foi empregado o teste de Shapiro-Wilk, análise de variância (ANOVA) e o pós teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Condições gerais de saúde e exame intrabucal

As condições gerais de saúde dos animais utilizados neste estudo se mantiveram estáveis durante todo o período experimental. Tais animais toleraram bem todos os procedimentos experimentais (instalação da ligadura, RAR e/ou as três sessões de aPDT). Não houve diferença intragrupo e intergrupos no peso corporal médio dos animais ao longo do experimento (dados não mostrados). Ao exame intrabucal não se observou a manifestação clínica da ONM-M em nenhum dos grupos experimentais.

3.2. POA, VOF, Tb.Th e Tb.N no osso alveolar do primeiro molar inferior direito

Não houve diferença estatisticamente significativa na POA, VOF, Tb.N e Tb.Th entre os diferentes grupos experimentais aos 28 dias pós tratamento periodontal local (Figura 2).

Mamirauá Institute, Manaus, AM, Brazil.

3.3. Aspecto histológico dos tecidos periodontais ao longo do tratamento com dose oncológica de zoledronato do primeiro molar inferior esquerdo

A PE em PE-NTL mostrou uma evolução progressiva e com curso desfavorável, chegando ao final do período experimental condizente com um estágio 0 de ONM-M (Figuras 3 e 4). Em PE-RAR o tratamento da PE com RAR, exclusivamente, melhorou alguns parâmetros inflamatórios, todavia, não conteve o aumento progressivo de tecido ósseo não vital, o que resultou ao final do período experimental em um quadro compatível com um estágio 0 de ONM-M (Figura 3 e 4). Nos grupos em que a PE foi tratada com aPDT, como monoterapia ou como coadjuvante à RAR (PE-aPDT e PE-RAR-aPDT), o processo de reparação tecidual apresentou um curso mais favorável, tanto em relação aos parâmetros inflamatórios, quanto em relação ao padrão de estruturação dos tecidos peridontais, inclusive, contendo o aumento progressivo da quantidade de tecido ósseo não vital, ou seja, não apresentando relação com a ONM-M (Figura 3 e 4). Os parâmetros, escores, distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica em PE-NTL, PE-RAR, PE-aPDT e PE-RAR-aPDT nos diferentes períodos experimentais estão apresentados na Tabela 1 e 2.

3.4. PTO e PTONV na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo

A PTO não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos e períodos experimentais (Figura 5).

A PTONV em PE-RAR se mostrou significativamente maior que em PE-NTL em todos os períodos experimentais. Em PE-aPDT a PTONV se apresentou significativamente menor que PE-NTL aos 14 e 28 dias pós tratamento periodontal local. A PTONV em PE-aPDT foi significativamente menor que em

PE-RAR e PE-RAR-aPDT em todos os períodos experimentais. PE-RAR-aPDT apresentou PTONV maior que em PE-NTL aos 7 dias e menor que em PE-RAR tanto aos 14 quanto aos 28 dias pós tratamento periodontal local (Figura 5).

Em PE-NTL e PE-RAR a PTONV se apresentou progressivamente maior ao longo dos períodos experimentais se mostrando significativamente maior aos 28 dias quando comparado com os 7 dias pós tratamento periodontal local. Em PE-aPDT e PE-RAR-aPDT, a PTONV se mostrou estabilizada ao longo dos diferentes períodos experimentais (Figura 5).

3.5. TGF β nos tecidos periodontais do primeiro molar inferior esquerdo

A densidade óptica de imunomarcção para TGF β se mostrou significativamente maior em PE-RAR e PE-aPDT aos 7 dias quando comparada com PE-NTL. PE-RAR-aPDT apresentou maior imunomarcção aos 7 dias tanto quando se compara com PE-NTL quanto com PE-aPDT. Aos 28 dias, a densidade óptica de imunomarcção em PE-RAR-aPDT foi maior que em PE-NTL. Em PE-RAR e PE-RAR-aPDT aos 14 e 28 dias a densidade óptica de imunomarcção se mostrou significativamente maior que aos 7 dias (Figura 6).

4. DISCUSSÃO

O zoledronato é um medicamento empregado com grande efetividade no tratamento de doenças osteolíticas, no entanto, tem sido associado com certa frequência ao desencadeamento da ONM-M.¹⁻³ A DP mostrou-se presente na maioria dos pacientes que desenvolveram a ONM-M, especialmente, pós exodontia, o que sugere uma associação entre estas duas condições patológicas.^{17-18,20,46-47} Sabe-se que a RAR é o tratamento de primeira escolha para a DP, no entanto, o seu emprego pode exercer um efeito negativo sobre os tecidos periodontais durante terapia com dose oncológica de zoledronato.^{32,33} Deste modo, avaliar alternativas terapêuticas mais efetivas e seguras se faz necessário. Sendo assim, a proposta deste estudo foi avaliar o emprego da aPDT, como monoterapia ou como terapia coadjuvante à RAR, no tratamento da PE em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato. Constatou-se que a aPDT foi capaz de promover efeitos positivos sobre os tecidos periodontais, o que a tornou mais segura e efetiva para o tratamento da PE do que exclusivamente a RAR durante terapia com zoledronato.

Estudos em modelos experimentais animais têm sido de grande importância para nortear as pesquisas clínicas. É consolidado na literatura científica o uso de ratos para a investigação da evolução e para avaliação de estratégias de tratamento da PE.⁴⁸⁻⁵⁰ Da mesma forma, o emprego de modelos experimentais animais têm contribuído para a elucidação da etiopatogenia e avaliação de terapias para ONM-M.⁵¹⁻⁵⁴ Além disso, alguns estudos experimentais indicam uma forte correlação entre a PE e o desencadeamento da ONM-M, o que é confirmado por estudos epidemiológicos em humanos.⁵⁵⁻

^{57,17-22} Apesar dos estudos indicarem tal correlação, ainda são extremamente escassos os que avaliaram o tratamento da DP durante terapia com dose oncológica de BFs, ou seja, sob uma condição com alto risco para o desencadeamento da ONM-M. Estudo prévio, desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, evidenciou em ratos sob terapia com dose oncológica de zoledronato que o tratamento da PE exclusivamente com RAR desencadeou uma exarcebação prolongada da resposta inflamatória local e um aumento substancial da quantidade de tecido ósseo alveolar não vital, condizente com um estágio 0 de ONM-M,³³ o que corrobora com os dados obtidos no presente estudo no grupo PE-RAR. Ainda de acordo com tais resultados, Braun e Iacono,³² reportaram em paciente que fazia uso crônico de zoledronato que a RAR foi capaz de desencadear a ONM-M.

No presente estudo, a análise de micro-CT realizada aos 28 dias pós tratamento periodontal local, demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa no nível de perda óssea alveolar, volume ósseo, número e espessura de trabéculas ósseas na região de furca em nenhum dos grupos experimentais que compõem o presente estudo. Os dados da análise histométrica corroboram com esses achados, demonstrando que a PTO na região de furca não apresentou diferença em nenhum dos grupos experimentais, ou seja, o efeito do zoledronato, que é a severa inibição da reabsorção óssea, não foi alterado com a presença da PE e nem com os tratamentos locais realizados. Todavia, houve um aumento significativo da PTONV no grupo PE-RAR, esses resultados reforçam achados anteriores de que procedimentos odontológicos invasivos e que requerem, após sua execução, uma certa capacidade de reparo tanto dos tecidos moles, quanto dos tecidos duros, pode

predispôr ao desencadeamento da ONM-M.^{7,33,46} Em contrapartida, quando a aPDT foi empregada como monoterapia ou como coadjuvante à RAR, no tratamento da PE, a PTONV se apresentou significativamente menor que em PE-NTL e PE-RAR.

A boa higiene bucal, um controle efetivo de placa bacteriana e a ausência de infecções orais são de extrema importância para diminuir o risco de ONM-M.⁵⁸ Todavia torna-se um dilema a escolha de um tratamento efetivo e, acima de tudo, seguro para a DP durante tratamento com potentes BFs. O emprego de outras modalidades terapêuticas ou coadjuvantes à RAR para tratamento da DP poderia se constituir em alternativa de terapia nestas condições. A aPDT é uma modalidade de laserterapia, que apresenta potente efeito antimicrobiano e propriedades bioestimulatórias sobre os tecidos periodontais. Apesar de ser uma modalidade terapêutica bastante empregada, este é o primeiro estudo que propôs e avaliou seus efeitos no tratamento da PE ao longo da terapia com dose oncológica de zoledronato. Estudos em modelos experimentais animais mostraram uma grande efetividade da aPDT como terapia coadjuvante à RAR no tratamento da PE, mesmo em condições em que a resposta do hospedeiro se mostrava comprometida, como acontece na presença de diabetes mellitus, imunossupressão, tabagismo e deficiência hormonal,^{59-65,30} corroborando com os achados do presente estudo. Alguns estudos clínicos controlados e randomizados também demonstraram efetividade da aPDT como terapia coadjuvante à RAR no tratamento da DP,⁶⁶⁻⁶⁸ todavia, outros estudos desta natureza não evidenciaram benefícios adicionais quando se emprega tal terapia coadjuvante.⁷⁰⁻⁷² Em uma revisão sistemática e meta-análise de estudos clínicos,

Al-Hamoudi et al.⁷³ concluíram que a associação de RAR e aPDT foi capaz de promover melhora em parâmetros clínicos da DP.

No presente estudo, o emprego exclusivo da aPDT para tratamento da PE foi a terapia avaliada que resultou em menor PTONV, ou seja, se constituiu na modalidade terapêutica menos agressiva aos tecidos periodontais sob efeito do zoledronato. Tais resultados se mostram em concordância com aqueles obtidos em outros estudos experimentais em animais em outras condições desfavoráveis.^{30,42,60-64,74} No entanto, deve ser levado em consideração que na prática clínica odontológica o emprego exclusivo da aPDT não apresenta grande efetividade, tendo em vista que não é capaz de promover a remoção mecânica do biofilme bacteriano, ou seja, não é capaz de desestruturá-lo completamente, exercendo uma ação paliativa na DP em função da promoção da redução da carga microbiana. No entanto, em situações onde a presença da DP sem tratamento ou o tratamento mecânico periodontal convencional pode se constituir em risco para a ONM-M, o emprego de uma terapia que exerça uma ação paliativa pode se constituir na terapia mais indicada.

A análise histopatológica dos tecidos periodontais evidenciou que no grupo PE-RAR o processo inflamatório local se mostrou grandemente exacerbado em todos os períodos experimentais. Em PE-aPDT a resposta inflamatória foi mais discreta e controlada ao longo dos períodos experimentais, o que se justifica por se tratar de uma modalidade de terapia minimamente invasiva. No grupo PE-RAR-aPDT a resposta inflamatória evoluiu de moderada à discreta ao longo dos períodos experimentais, o que é justificado pelo tratamento periodontal invasivo com RAR, na fase inicial, e supostamente por uma ação bioestimulatória da aPDT, na fase final deste processo. No que se

refere à análise imunoistoquímica direcionada para TGF β , constatou-se que nos grupos submetidos ao tratamento periodontal local (PE-RAR, PE-aPDT e PE-RAR-aPDT) o nível desta citocina se mostrou elevado aos 7 dias pós-tratamento.

O TGF β exerce ação na regulação da proliferação celular e diferenciação celular, modulação da inflamação e resolução do processo inflamatório. Diante do exposto, pode ser constatado que quanto maior a ação da terapia periodontal sobre contenção da resposta inflamatória e maior sua ação sobre a elevação nos níveis de TGF β , maior foi a efetividade e a segurança da terapia periodontal. Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores que relacionam elevações nos níveis de TGF β pós tratamento periodontal com aumento da capacidade de reparação de tais tecidos.⁷⁵⁻⁸⁰

Neste estudo se empregou múltiplas sessões (três) de aPDT para tratamento da PE baseado na maior efetividade que foi reportada por estudos anteriores em outras condições experimentais.^{42,39,81-84} Tal protocolo é justificado para que os tecidos periodontais tratados se beneficiem ao máximo do potente efeito antimicrobiano e das propriedades bioestimulatórias da aPDT na fase inicial do processo de reparação. Um outro aspecto extremamente importante relacionado com o uso da aPDT é que esta modalidade terapêutica não possui efeito adverso quando indicada e executada corretamente. Deste modo, nossos achados podem se constituir em importantes norteadores para pesquisas clínicas que visam o estabelecimento de protocolos efetivos, seguros e sem efeito adverso para tratamento da DP durante tratamento com dose oncológica de zoledronato.

5. CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que o uso da aPDT, como monoterapia ou como terapia coadjuvante à RAR, se mostrou efetiva e segura no tratamento da PE em ratos sob terapia com dose oncológica de zoledronato, evitando que a PE progredisse para um estágio subclínico de ONM-M, como ocorreu quando não se estabeleceu tratamento periodontal local ou quando se empregou exclusivamente a RAR.

6. AGRADECIMENTOS

À Disciplina de Periodontia e ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. Ao Grupo de Estudos e Pesquisas com Lasers em Odontologia (**GEPLO**).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2008. 83(9):1032-1045.
2. Tanaka Y, Murata-Hirai K, Iwasaki M. Expansion of human $\gamma\delta$ cells for adoptive immunotherapy using a bisphosphonate prodrug. *Cancer Sci*. 2018 Mar; 109(3):587-599. doi: 10.1111/cas.13491. Epub 2018 Feb
3. Ruggiero S, Price N, Lipton A, Jain VK. Prevention and management of osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate therapy. *Supportive cancer therapy*, 2004.
4. Gómez Font R, Martínez García ML, Olmos Martínez JM. Osteonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments. Update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 May 1;13(5):E318-24.
5. Nalliah R. Prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis in patients with cancer could be as high as 13.3 percent. *JADA* 2012;143(2):170-171
10.14219/jada.archive.2012.0128.
6. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws - 2014 Update, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 72 (2014) 2381-2.

7. Aghaloo T, Hazbon R, Tetradis S. Pathophysiology of Osteonecrosis of the jaws. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2015 Nov;27(4):489-96.
8. Badel T, Paaviniemi IS, Carek AJ, Rosin-Grget K, Grbesa D. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate. *Coll Antropol.* 2013 Jun;37(2):645-51.
9. Migliorati CA, Epstein JB, Abt E, Berenson JR. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates in cancer: a narrative review. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 Jan;7(1):34-42. doi: 10.1038/nrendo.2010.195. Epub 2010 Nov 16.
10. Allen MR, Burr DB. Mandibular necrosis in beagle dogs treated with bisphosphonates. *Orthod Craniofac Res.* 2009 Aug;12(3):221-8. doi: 10.1111/j.1601-6343.2009.01456.x.
11. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF, Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis, *Br. J. Haematol.* 144 (2009) 667-76.
12. Açil Y et al., The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012 Dec;40(8):e229-35.

13. Ail Y et al., Effects of zoledronate on irradiated bone in vivo: analysis of the collagen types I, V and their cross-links lysylpyridinoline, hydroxylysylpyridinoline and hydroxyproline. *Calcif Tissue Int.* 2013 Mar;92(3):251-60.
14. Saracino S, Canuto RA, Maggiora M, Oraldi M, Scoletta M, Ciuffreda L, Exposing human epithelial cells to zoledronic acid can mediate osteonecrosis of jaw: an in vitro model, *J. Oral Pathol. Med.* 41 (2012) 788-92.
15. Saito T, Izumi K, Shiomi A, Uenoyama A, Ohnuki H, Kato H, Zoledronic acid impairs re-epithelialization through down-regulation of integrin α v β 6 and transforming growth factor β signalling in a three-dimensional in vitro wound healing model, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 43 (2014) 373-80.
16. Jacobs C et al., Mechanical loading increases pro inflammatory effects of nitrogen-containing bisphosphonate in human periodontal fibroblasts. *Clin Oral Investig.* 2018 Mar;22(2):901-907.
17. Kang B et al., Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res.* 2013, 28:1631-40.

18. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws - 2014 Update, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 72 (2014) 2381-2.
19. Nicolatou-Galitis et al., Periodontal disease preceding osteonecrosis of the jaw (ONJ) in cancer patients receiving antiresorptives alone or combined with targeted therapies: report of 5 cases and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015 Dec;120(6):699-706.
20. Song M et al., Preexisting Periapical Inflammatory Condition Exacerbates Tooth Extraction-induced Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw Lesions in Mice. *J Endod.* 2016 Nov;42(11):1641-1646.
21. Soundia A et al., Osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice after extraction of teeth with periradicular. *Bone.* 2016 Sep;90:133-41.
22. McGowan K, McGowan T, Ivanovski S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: A systematic review. *Oral Dis.* 2017 Jun 28. doi: 10.1111/odi.12708.
23. Hung HC, Douglass CW. Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss. *J Clin Periodontol.* 2002 Nov;29(11):975-86.

24. Hill RW et al., Four types of periodontal treatment compared over two years. *J Periodontol.* 1981 Nov;52(11):655-62.
25. Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Haffajee AD. Long-term effect of surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1984 Aug;11(7):448-58.
26. Ramfjord SP et al., Four modalities of periodontal treatment compared over five years. *J Periodontal Res.* 1987 May;22(3):222-3.
27. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Molvar MP, Dyer JK. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol.* 1996 Feb;67(2):93-102 1996 Feb;67(2):93-10.
28. Haffajee AD et al., The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases, *J. Clin. Periodontol.* 24 (5) (1997) 324–334.
29. Theodoro LH et al., Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. *Lasers Med Sci.* 2015 May;30(4):1209-18.
30. Swerts AA, Santos BFE, Bruzadelli SR, Brigagão MRPL, Lima DC, Fernandes LA. Treatment of experimental periodontal disease by

- laser therapy in simvastatin-modified rats. *J Appl Oral Sci.* 2017 Jul-Aug;25(4):387-395.
31. ALMEIDA, J. M., THEODORO, L. H., BOSCO, A.F., NAGATA, M. J. H., OSHIWA, M., GARCIA, V.G. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2007a;78:566-575.
32. Braun E, Iacono VJ. Bisphosphonates : case report of nonsurgical periodontal therapy and osteonecrosis. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2006 Aug;26(4):315-9.
33. Araujo - Periodontite experimental em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato: análise da progressão da doença e avaliação da resposta periodontal ao tratamento mecânico convencional. [Dissertação]. Araujo, NJ: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2017. 100 f.: 4 il.; 2 tab.
34. Kashef N, Akbarizadeh M, Kamrava SK. Effect of sub-lethal photodynamic inactivation on the antibiotic susceptibility and biofilm formation of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013 Dec; 10 (4):368-73.

35. Kranz S, Huebsch M, Guellmar A, Voelpel A, Tonndorf-Martini S, Sigusch BW. Antibacterial photodynamic treatment of periodontopathogenic bacteria with indocyanine green and near-infrared laser light enhanced by Trolox (TM). *Lasers Surg Med.* 2015 Apr;47(4):350-60.
36. Darabpour E, Kashef N, Mashayekhan S. Chitosan nanoparticles enhance the efficiency of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation of bacterial biofilms: An in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016 Jun;14:211-7.
37. Pourhajibagher M, Chiniforush N, Shahabi S, Sobhani S, Monzavi MM, Monzavi A, Bahador A. Monitoring gene expression of rcpA from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* versus antimicrobial photodynamic therapy by relative quantitative real-time PCR. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017 Sep;19:51-55.
38. Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci* 3:412-418.
39. Oruba Z, Labuz P, Macyk W, Chomyszyn-Gajewska M. Antimicrobial photodynamic therapy-A discovery originating from the pre-antibiotic era in a novel periodontal therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015 Dec;12(4):612-8.

40. de Oliveira PGF, et al., Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy in induced periodontal disease. Animal study with histomorphometrical, immunohistochemical, and cytokine evaluation. *Lasers Med Sci.* 2016; 1275-83.
41. Xue D, Zhao Y. Clinical effectiveness of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy for residual pockets during supportive periodontal therapy: A systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017 Mar;17:127-133.
42. Longo - Avaliação de diferentes protocolos de aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento da periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: estudo histomorfométrico, imunoistoquímico, imunológico e microbiológico. [Tese]. *Arch Oral Biol.* 2015 Longo, M: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2015. 178 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM.
43. Silva PG, Ferreira Junior AE, Teófilo CR et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonates-related osteonecrosis. *Arch Oral Biol.* 2015 Sep;60(9):1237-45. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.05.015. Epub 2015 Jun 6.

44. Food and Drug Administration, Dose Calculator: Conversion Chemoterapy of Human to Animals, <<http://www.acesdata.fda.gov>>. Accessed 2014-02.
45. Garcia VG et al., Effect of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2016 Feb;51(1):26-37.
46. Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, Pingel JE, Williams A, Jorgensen M, Kesavalu L, Wronski TJ: Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res.* 2012, 27:2130-43
47. Mawardi H, Treister N, Richardson P, Anderson K, Munshi N, Faiella RA, Woo SB: Sinus tracts--an early sign of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws? *J Oral Maxillofac Surg.* 2009, 67:593-601.
48. Donos N, ParkJC, Vajgel A, de Carvalho Farias B, Derela X. Description ofthe periodontal pocket i preclinical models: limitations and considerations. *Periodontol* 2000. 2018 Feb;76(1):16-34. doi: 10.1111/prd.12155. Epub 2017 Nov 30.
49. Kuraji R, Fujita M, Ito H, Hashimoto S, Nmabe Y. Effect of experimental periodontitis on metalobic system in rats with diet-induced obesity (DYO): an analysis of serum biochemical paramenters. *Odontology.* 2018

- Apr;106(2):162-170. doi: 10.1007/s10266-017-0322-5. Epub 2017 Dec 14.
50. Vargas-Sanches PK, Moro MG, Santos FAD et al. Agreement, correlation, and kinetics of the alveolar bone-loss measurement methodologies in a ligature-induced periodontitis animal model. *J Appl Oral Sci.* 2017 Sep-Oct;25(5):490-497. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0517.
51. Curra et al., Medication-related osteonecrosis of the jaw. Introduction of a new modified experimental model. *Acta Cir Bras.* 2016 May;31(5):308-13.
52. Williams DW et al., Impaired bone resorption and woven bone formation are associated with development of osteonecrosis of the jaw-like lesions by bisphosphonate and anti-receptor activator of NF- κ B ligand antibody in mice. *Am J Pathol.* 2014 Nov;184(11):3084-93.
53. Yalcin-Ulker GM, Cumbul A, Duygu-Capar G, Uslu U, Sencift K. Preventive effect of phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline against medication-related osteonecrosis of the jaw: an animal study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017 Nov;75(11):2354-2368. doi: 10.1016/j.joms.2017.04.017. Epub 2017 Apr 26.

54. Vidal-Gutiérrez X, Gómes-Claves JF, Gaitán-Cepeda LA. Dental extraction following zoledronate, induces osteonecrosis in rat's jaw. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017 Mar 1;22(2):e177-e184.
55. Soundia A et al., Zoledronate Impairs Socket Healing after Extraction of Teeth with Experimental Periodontitis. *J Dent Res*. 2018 Mar;97(3):312-320.
56. Li CL, Lu WW, Seneviratne CJ, Leung WK, Zwahlen RA, Zheng LW Role of periodontal disease in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats. *Clin Oral Implants Res*. 2016 Jan;27(1):1-6.
57. Cheong S, Sun S, Kang B, Bezouglaia O, Elashoff D, McKenna CE, Aghaloo TL, Tetradis S, Bisphosphonate uptake in areas of tooth extraction or periapical disease. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Dec;72(12):2461-8. doi: 10.1016/j.joms.2014.07.004. Epub 2014 Jul 12.
58. Tsurushima H1, Kokuryo S, Sakaguchi O, Tanaka J, Tominaga K Bacterial promotion of bisphosphonate-induced osteonecrosis in Wistar rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Nov;42(11):1481-7.
59. Dimopoulos et al., Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. *Annals of Oncology* 20: 117–120, 2009.

60. Abduljabbar T, Vohra F, Javed F, Akram Z. Antimicrobial photodynamic therapy adjuvant to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Mar;17:138-146. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.11.008.
61. Fernandes LA, Martins TM, de Almeida JM, Theodoro LH, Garcia VG. Radiographic assessment of photodynamic therapy as an adjunctive treatment on induced periodontitis in immunosuppressed rats. *J Appl Oral Sci*. 2010 May-Jun;18(3):237-43.
62. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Martins TM, Okamoto T, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol*. 2009 Mar;36(3):219-28. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01355.x.
63. Garcia VG, Fernandes LA, Macrainsi VC, de Almeida JM, Martins TM, Bosco AF, Nagata MJ, Cirelli JÁ, Theodoro LH. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol*. 2011 Dec;38(12):1106-14. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01785.x. Epub 2011 Sep 15.
64. Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomo Nagata MJ, Casatti CA, Ervolino E, Theodoro LH. Adjunctive antimicrobial

- photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol.* 2013 Apr;84(4):556-65. doi: 10.1902/jop.2012.120163. Epub 2012 Jun 9.
65. Gualberto EC Jr, Theodoro LH, Longo M, Novaeis VC, Nagata MJ, Ervolino E, Garcia VG. antimicrobial photodynamic therapy minimizes the deleterious effect of nicotine in female rats with induced periodontitis. *Lasers Med Sci.* 2016 Jan;31(1):83-94. doi: 10.1007/s10103-015-1820-8. Epub 2015 Nov 6.
66. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol.* 2008 Nov;79(11):2156-65. doi: 10.1902/jop.2008.080103 .
67. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008, 35(10):877-884.
68. Andersen R, et al., Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing, *J. Clin. Dent.* 18 (2) (2007) 34–38.
69. Berakdar M, Callaway A, Eddin MF, Ross A, Willershausen B. Comparison between scaling-root-planing (SRP) and SRP/photodynamic therapy: six month study. *Head Face Med.* 2012 Apr 5;8:12.

70. Christodoulides N et al., Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial, *J. Periodontol.* 79 (9) (2008) 1638–1644.
71. Chondros P, et al., Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial, *Lasers Med. Sci.* 24 (5) (2009) 681–688.
72. Betsy J, et al., Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial, *J. Clin. Periodontol.* 41 (6) (2014) 573–581.
73. Petelin M, et al., Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis, *Lasers Med. Sci.* 30 (6) (2015) 1647–1656.
74. Al-Hamoudi N. Is antimicrobial photodynamic therapy an effective treatment for chronic periodontitis in diabetes mellitus and cigarette smokers: a systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017 Sep;19:375-382. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.05.018. Epub 2017 May 27.
75. Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. Changes in transforming growth factor-beta1 in gingival crevicular fluid following periodontal surgery. *J Clin Periodontol.* 2004 Jul;31(7):527-33.

76. Skaleric U, Kramar B, Petelin M, Pavlica Z, Wahl SM. Changes in TGF-beta 1 levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs. *Eur J Oral Sci.* 1997 Apr;105(2):136-42.
77. Rocha Júnior AM, Vieira BJ, de Andrade LC, Aarestrup FM. Low-level laser therapy increases transforming growth factor-beta expression and induces apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr;27(2):303-7. doi: 10.1089/pho.2008.2277.
78. Dereka XE, Markopoulou CE, Vrotsos IA. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors.* 2006 Dec;24(4):260-7.
79. Vikram V, Ramakrishnan T, Anilkumar K, Ambalavanan N. Changes in transforming growth factor- β 1 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis following periodontal flap surgery. *J Clin Diagn Res.* 2015 Feb;9(2):ZC13-6. doi: 10.7860/JCDR/2015/11039.5539. Epub 2015 Feb 1.
80. Souza SL, Andrade PF, Silva JS et al. Effects of antimicrobial photodynamic therapy on transforming growth factor- β 1 levels in the gingival crevicular fluid. *Photomedicine and Laser Surgery.* 1 Feb 2013 <https://doi.org/10.1089/pho.2012.3328>.

81. Belinello-Souza EL, Alvarenga LH, Lima-Leal C, Almeida P, Leite CG et al. Antimicrobial photodynamic therapy combined to periodontal treatment: Experimental model. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017 Jun;18:275-278. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.03.008. Epub 2017 Mar.
82. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol.* 2008 Nov;79(11):2156-65. doi: 10.1902/jop.2008.080103 .
83. Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, Theodoro LH. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2014 Oct;49(5):584-94. doi: 10.1111/jre.12138. Epub 2013 Nov 9.
84. Theodoro LH, Pires JR, Fernandes LA, Gualberto Júnior EC, Longo M, de Almeida JM, Garcia G. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontally infected tooth sockets in rats. *Lasers Med Sci.* 2015 Feb;30(2):677-83. doi: 10.1007/s10103-013-1400-8. Epub 2013 Aug 3.

Figuras

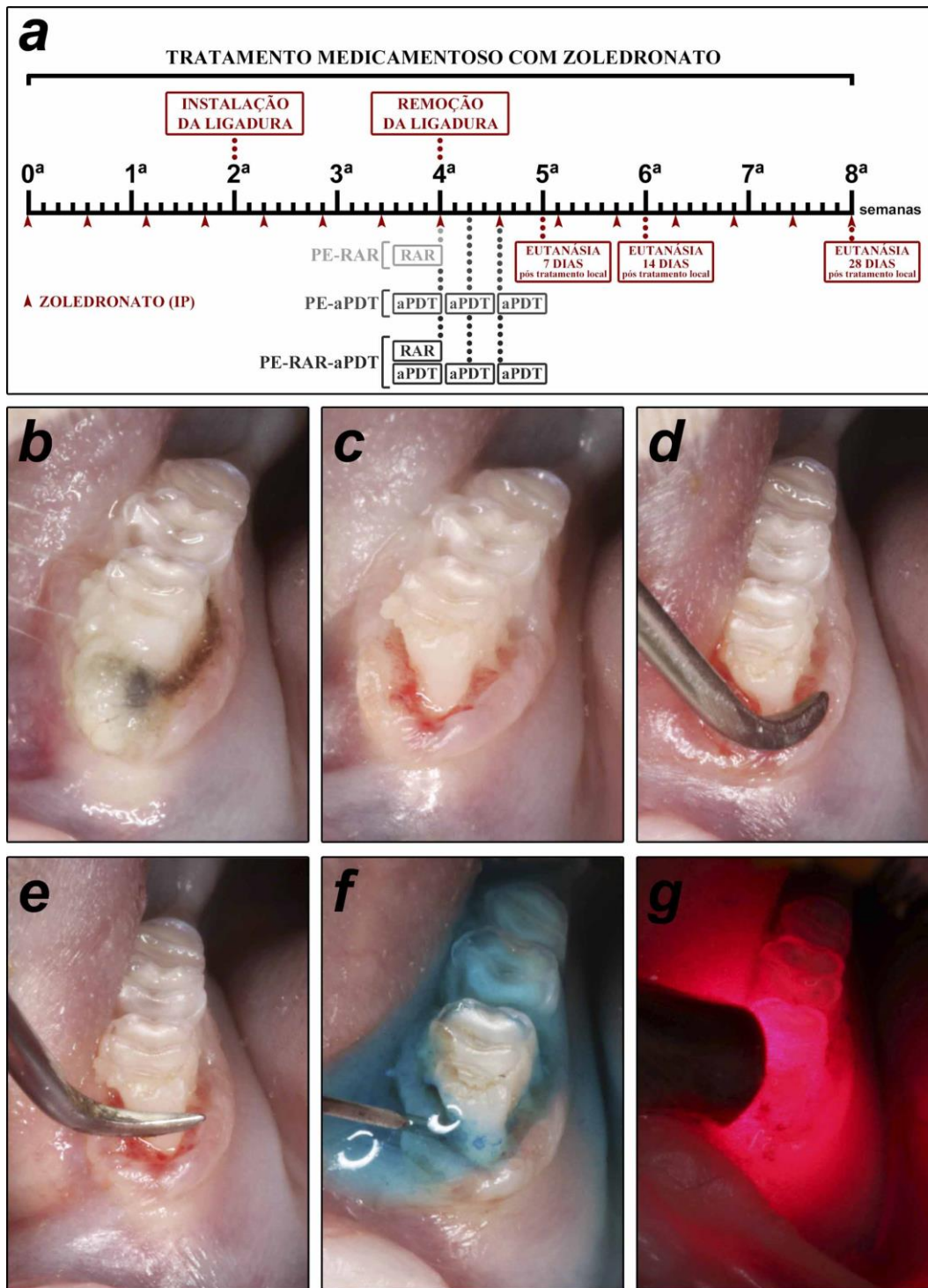


Figura 1: Delineamento experimental do estudo. **(a)** Esquema ilustrando o delineamento experimental com os procedimentos experimentais executados em seus respectivos intervalos de tempo. **(b-c)** Aspecto clínico do primeiro molar inferior com PE duas semanas após a instalação da ligadura e imediatamente após sua remoção. **(d-e)** Execução do procedimento de RAR no primeiro molar inferior, a qual foi realizada nos grupos PE-RAR e PE-RAR-aPDT. **(f-g)** Execução da aPDT no primeiro molar inferior, a qual foi realizada nos grupos PE-aPDT e PE-RAR-aPDT (em **f** está sendo evidenciada a aplicação do fotosensibilizador e em **g** está sendo mostrada a irradiação com laser de baixa potência).

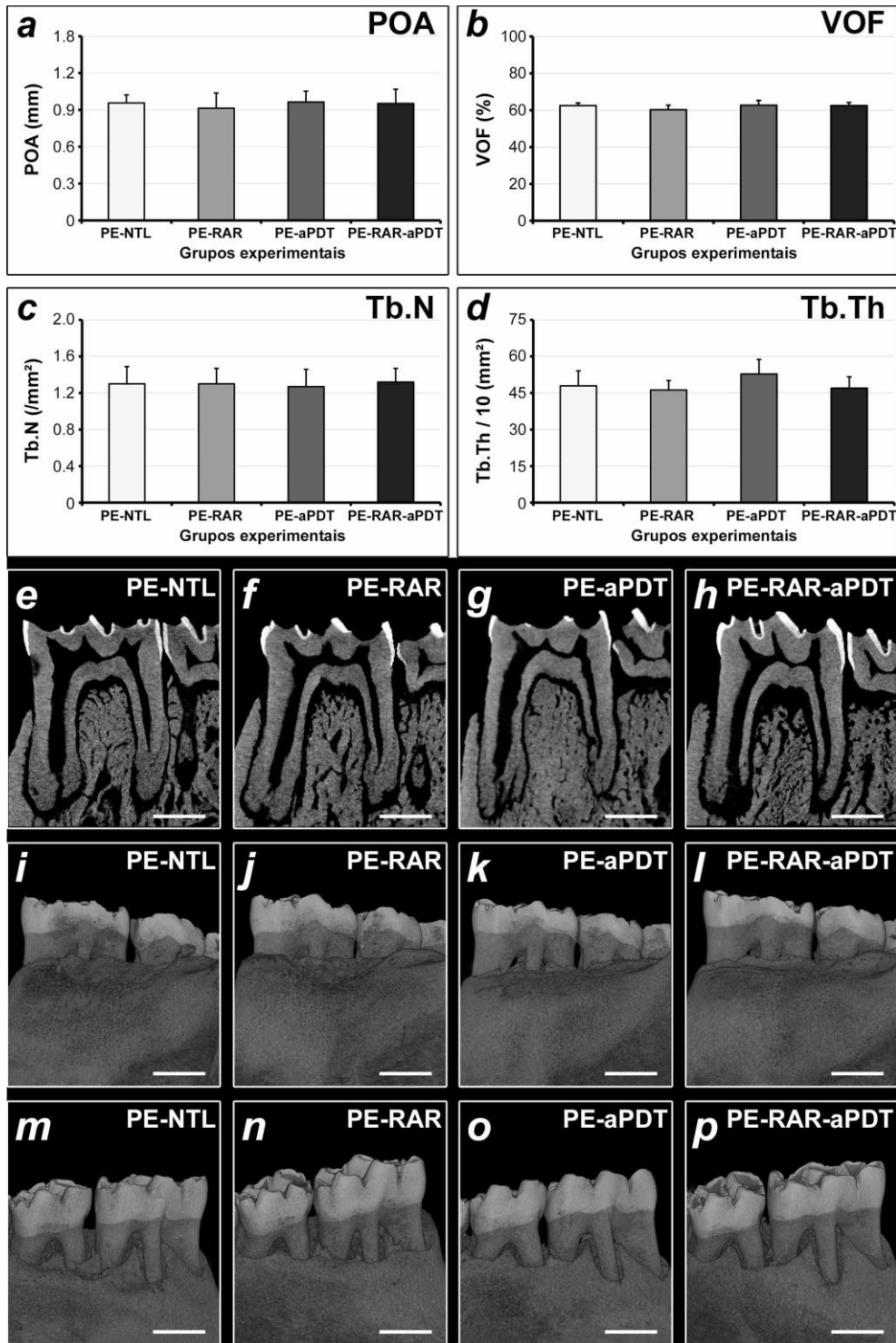


Figura 2: Aspecto microtomográfico do primeiro molar inferior e periodonto de inserção aos 28 dias pós tratamento periodontal local. **(a-d)** Gráficos evidenciando a perda óssea alveolar (POA) **(a)**, o volume ósseo alveolar (VOF) **(b)**, o número de trabéculas ósseas (Th.Tb) **(c)** e a espessura de trabéculas ósseas **(d)** no periodonto de inserção do primeiro molar inferior. **(e-h)** Aspecto microtomográfico bidimensional do primeiro molar inferior e periodonto de inserção em PE-NTL **(e)**, PE-RAR **(f)**, PE-aPDT **(g)** e PE-RAR-aPDT **(h)**. **(i-p)** Aspecto microtomográfico tridimensional do primeiro molar inferior e periodonto de inserção em uma vista vestibular **(i-l)** e em uma vista lingual **(m-p)** da mandíbula em PE-NTL **(i, m)**, PE-RAR **(j, n)**, PE-aPDT **(k, o)** e PE-RAR-aPDT **(l, p)**. Teste estatístico: ANOVA – Tukey. Barras de escala: 1 mm.

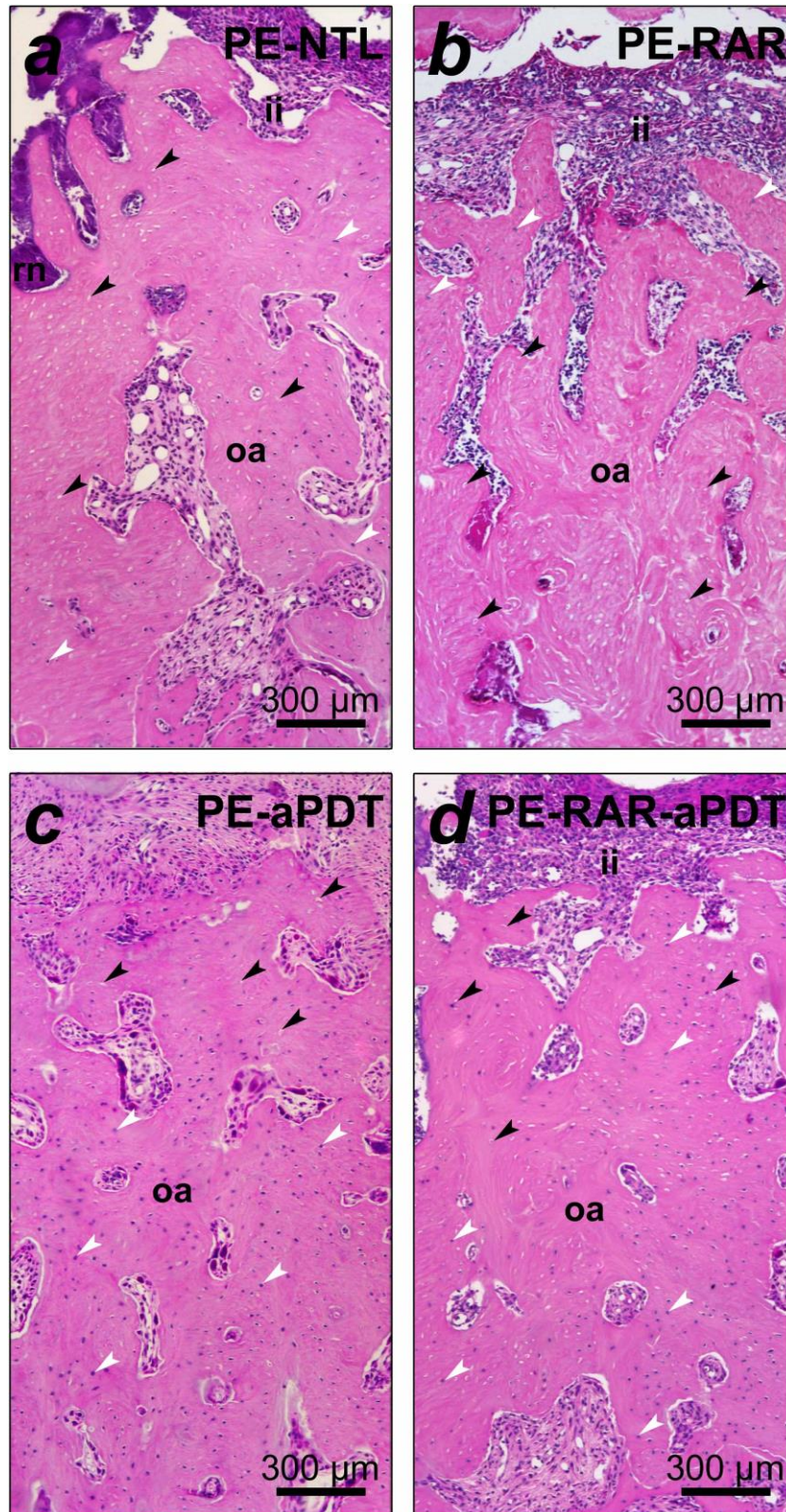


Figura 3: Fotomicrografias mostrando o aspecto histológico do primeiro molar inferior e periodonto de inserção aos 7 dias pós tratamento periodontal local em PE-NTL **(a)**, PE-RAR **(b)**, PE-aPDT **(c)** e PE-RAR-aPDT **(d)**. Abreviações e símbolos: ii, infiltrado inflamatório; oa, osso alveolar, rn, restos necróticos; setas brancas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias ou ocupadas por restos necróticos de osteócitos; tc, tecido conjuntivo. Aumento original: 100x. Barras de escala: 300µm. Coloração: HE.

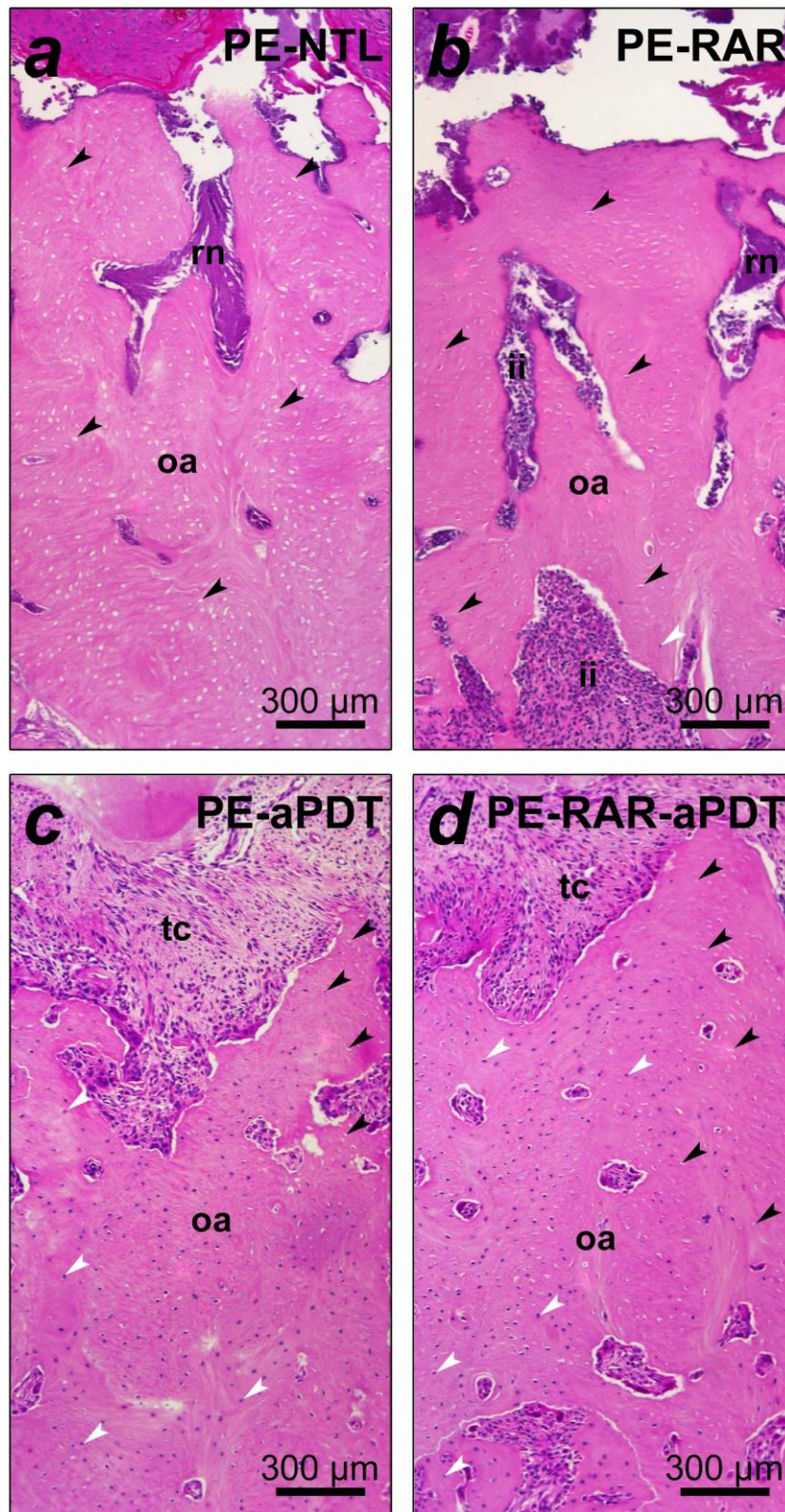


Figura 4: Fotomicrografias mostrando o aspecto histológico do primeiro molar inferior e periodonto de inserção aos 28 dias pós tratamento periodontal local em PE-NTL (a), PE-RAR (b), PE-aPDT (c) e PE-RAR-aPDT (d). Abreviações e símbolos: ii, infiltrado inflamatório; oa, osso alveolar, rn, restos necróticos; setas brancas, osteócitos; setas pretas, lacunas vazias ou ocupadas por restos necróticos de osteócitos; tc, tecido conjuntivo. Aumento original: 100x. Barras de escala: 300μm. Coloração: HE.

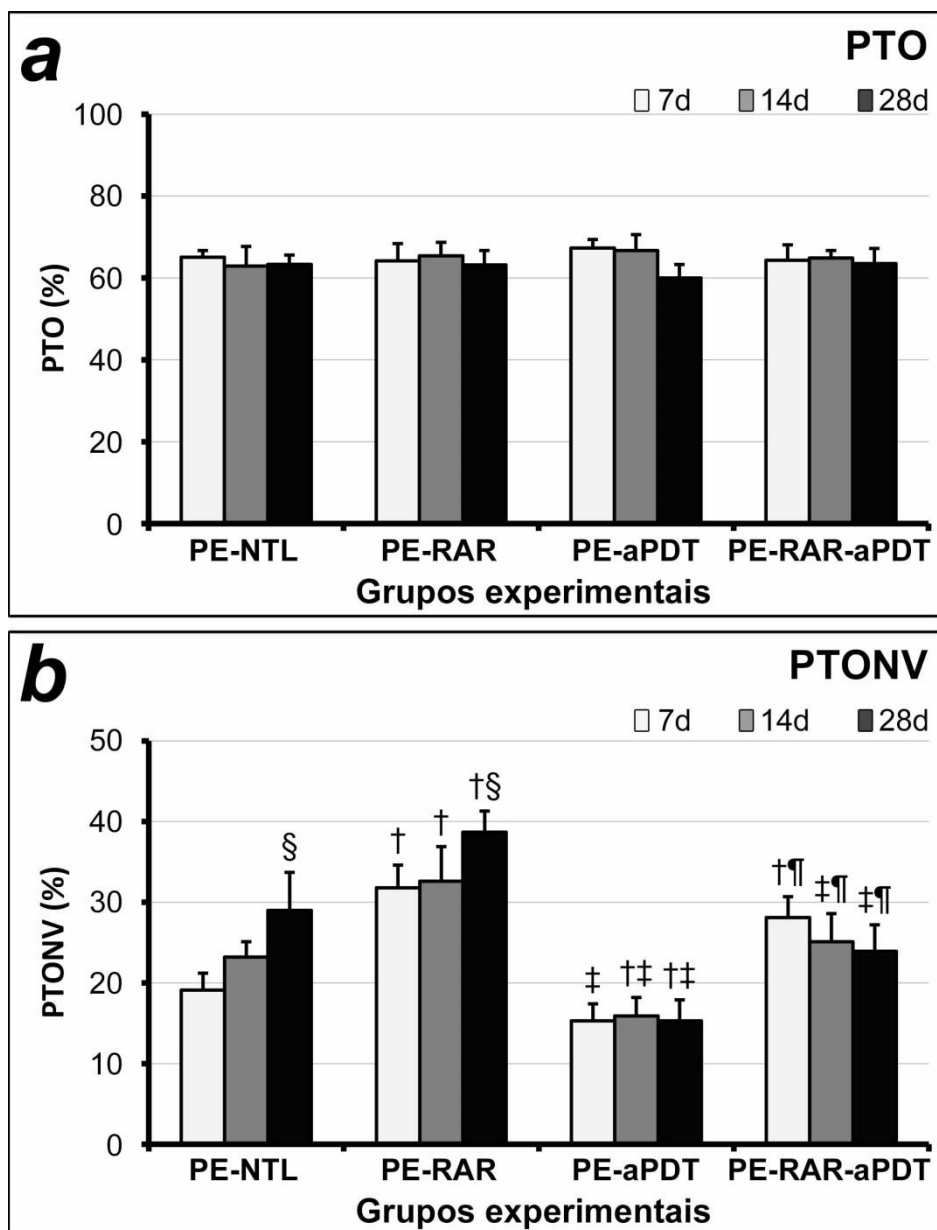


Figura 5: Gráficos evidenciando a porcentagem de tecido ósseo (PTO) **(a)** e a porcentagem de tecido ósseo não vital (PTONV) **(b)** na região de furca do primeiro molar inferior aos 7, 14 e 28 dias pós tratamento periodontal local nos grupos PE-NTL, PE-RAR, PE-aPDT e PE-RAR-aPDT. Teste estatístico: ANOVA – Tukey. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-NTL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-RAR; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-aPDT; §, diferença estatisticamente significativa intragrupo em relação aos 7 d pós tratamento periodontal local.

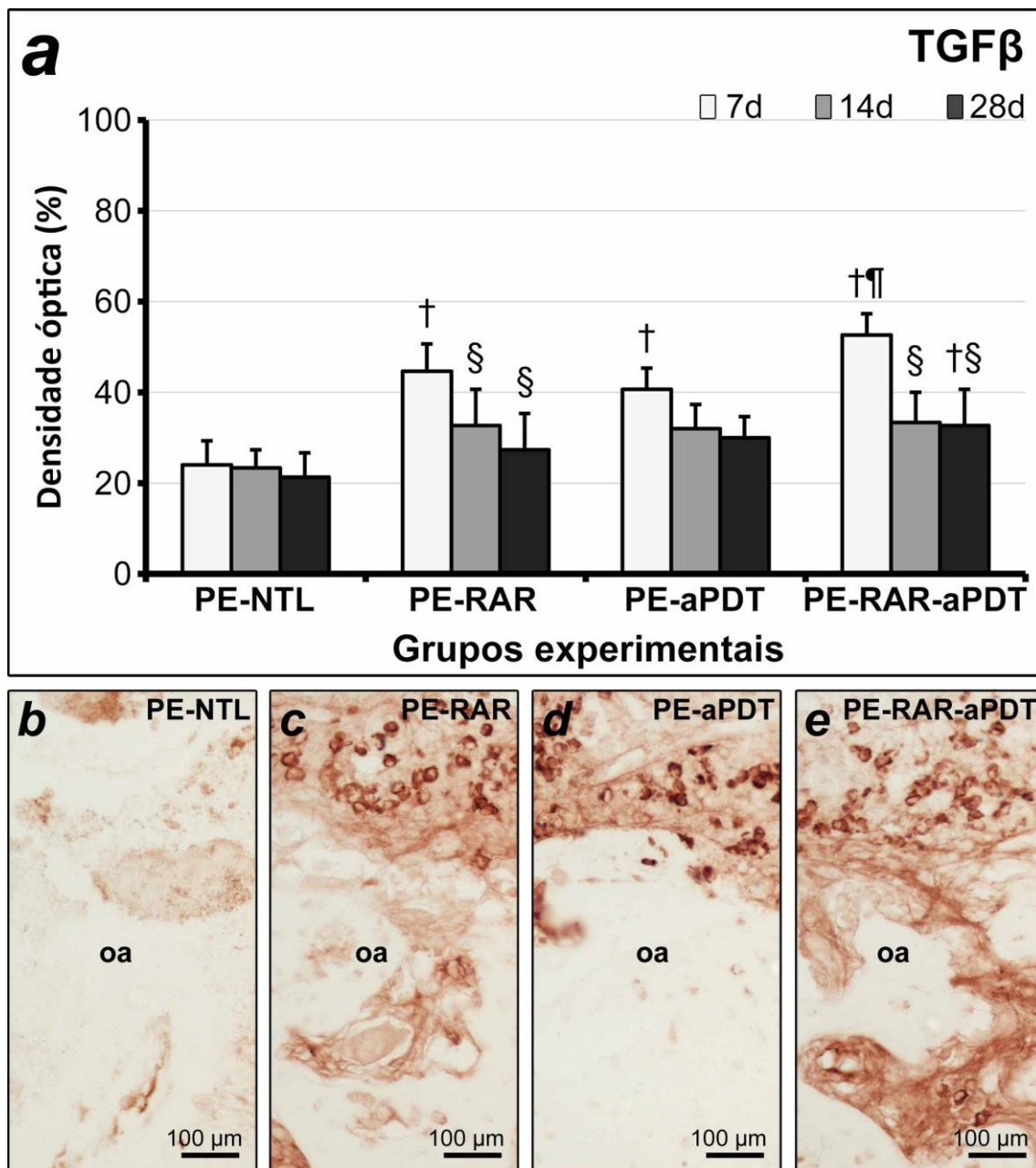


Figura 6: Imunomarcção para TGF β no periodonto de inserção do primeiro molar inferior aos 7 dias pós tratamento periodontal local. Gráficos mostrando a densidade óptica de imunomarcção para TGF β (a) nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrografias evidenciando a imunomarcção em PE-NTL (b), PE-RAR (c), PE-aPDT (d) e PE-RAR-aPDT (e). Teste estatístico: ANOVA – Tukey. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-NTL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-RAR; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-aPDT; §, diferença estatisticamente significativa intragrupo em relação aos 7 d pós tratamento periodontal local. Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar. Aumento original: 400x. Barras de escala: 100 μ m.

Tabelas

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

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA: PADRÃO INFLAMATÓRIO												
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES											
	GRUPOS EXPERIMENTAIS											
	PE-NTL			PE-RAR			PE-aPDT			PE-RAR-aPDT		
	7d	14d	28d	7d	14d	28d	7d	14d	28d	7d	14d	28d
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL												
1) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2) inflamação discreta (até 1/3 das células são células inflamatórias)	-	-	-	-	-	-	100%	100%	100%	40%	40%	100%
3) inflamação moderada (de 1/3 até 2/3 das células são células inflamatórias)	-	-	-	-	20%	20%	-	-	-	60%	60%	-
4) inflamação intensa (mais de 2/3 das células são células inflamatórias)	100%	100%	100%	100%	80%	80%	-	-	-	-	-	-
MEDIANA	4	4	4	4	4	4	2†	2†	2†	3†	3†	2†
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO												
1) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca	-	-	40%	40%	40%	40%	100%	100%	100%	60%	60%	60%
4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca	100%	100%	60%	60%	60%	60%	-	-	-	40%	40%	40%
MEDIANA	4	4	4	4	4	4	3†	3†	3†	3†	3†	3

Símbolos: †, diferença estatisticamente significante em relação ao PE-NTL; ‡, diferença estatisticamente significante em relação ao PE-RAR.

Tabela 2: Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do padrão de estruturação dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos e períodos experimentais.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA: PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DOS TECIDOS												
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES											
	GRUPOS EXPERIMENTAIS											
	PE-NTL			PE-RAR			PE-aPDT			PE-RAR-aPDT		
	7d	14d	28d	7d	14d	28d	7d	14d	28d	7d	14d	28d
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO CIMENTO DA REGIÃO DE FURCA												
1) ausência de reabsorção externa	80 %	80 %	80 %	60 %	60 %	60 %	100 %	100 %	80 %	60 %	80 %	80 %
2) apenas áreas de reabsorção inativas	-	20 %	20 %	-	20 %	40 %	-	-	20 %	-	20 %	20 %
3) poucas áreas de reabsorção ativas (até 3 focos)	20 %	-	-	40 %	20 %	-	-	-	-	40 %	-	-
4) muitas áreas de reabsorção ativas (mais de 3 focos)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEDIANA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA												
1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	-	-	-	-	80 %	80 %	80 %	-	-	60 %
3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	-	60 %	60 %	80 %	20 %	20 %	20 %	80 %	100 %	40 %
4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose	100 %	100 %	100 %	40 %	40 %	20 %	-	-	-	20 %	-	-
MEDIANA	4	4	4	3	3	3[†]	2^{†‡}	2^{†‡}	2^{†‡}	3^{†¶}	3^{†¶}	2^{†¶}
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO ALVEOLAR DA REGIÃO DE FURCA												
1) trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2) trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3) trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4) trabéculas ósseas com presença de áreas de tecido ósseo não vital com presença de osteoclastos ativos e/ou inativos	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
MEDIANA	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-NTL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-RAR; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao PE-aPDT.

Anexos

ANEXO A: NORMAS PARA PUBLICAÇÃO SEGUNDO O PERIÓDICO “JOURNAL OF PERIODONTOLOGY”

Journal of Periodontology Author Instructions

Updated May 2017

This update includes changes to the Review Articles section.

The Journal of Periodontology publishes articles relevant to the science and practice of periodontics and related areas. Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that text, figures, photographs, and tables have not appeared in any other publication, except as an abstract prepared and published in conjunction with a presentation by the author(s) at a scientific meeting, and that material has been submitted only to this journal.

The Journal of Periodontology accepts manuscript submissions online at ScholarOne Manuscripts. To start a new submission, enter the Author Center and click "Click here to submit a new manuscript." Details regarding each submission step are located at the top of the page in ScholarOne Manuscripts. Authors should prepare manuscripts in accordance with the instructions below. Failure to do so may result in delays or manuscript unsubmission.

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

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

ORIGINAL ARTICLES

These are papers that report significant clinical or basic research on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the different forms of periodontal

disease. Papers dealing with design, testing, and other features of dental implants are also included.

Format

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

Abstract

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

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

Introduction

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

Materials and Methods

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

Results

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

Discussion

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

Publication of Accepted Original Articles

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

REVIEW ARTICLES

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

COMMENTARIES

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

Introduction

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

Body

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

Summary

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

Acknowledgment(s)

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

CASE SERIES

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

Case Series report a sufficient number of consecutive or randomized cases to make a persuasive argument for or against the procedure, technique, or concept under discussion. Cases should be relatively homogeneous so that a systematic evaluation of one type of disease, lesion, or condition is made for the procedure under consideration. Also, treatment and documentation should be consistent and standardized for all cases. It is recognized that definitive evidence for the safety and efficacy of any procedure, drug, or device comes primarily from well-

designed, randomized, controlled trials. However, well-executed Case Series may lead to hypotheses about the usefulness of new and innovative procedures, drugs, or devices and may therefore be of value to the progress of clinical science.

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

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

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

Requirement for Ethics Board Approval

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

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

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

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

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

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

Privacy in Case Series

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

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

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

Format

Case Series must be limited to 2,000 to 3,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50

references, and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

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

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

Introduction

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

Case Description and Results

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

Discussion

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

GUEST EDITORIALS

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

LETTERS TO THE EDITOR

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

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

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

Citations should be handled as standard references.

GENERAL FORMAT

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

Materials should appear in the following order:

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

Figures should not be embedded in the manuscript. Please see the Journal of Periodontology [Digital Art Guidelines](#) for more information on submitting figures.

Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

TITLE PAGE

The title page should contain:

1. a concise but informative title;
2. first name, middle initial, and last name of each author, with the highest academic degree and the current institutional affiliation, including

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

KEY WORDS

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

ACKNOWLEDGMENT(S) AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgment(s)

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

Conflicts of Interest

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

Authors are required to submit:

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

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

Example of Conflict of Interest Statement

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

REFERENCES

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. A journal, magazine, or newspaper article should be given only one

number; a book should be given a different number each time it is mentioned, if different page numbers are cited.

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

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

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, et al. Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res* 2008;87:51-55.
2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report no. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.

3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.
4. Non-English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of peri-implant disease (in German). *Z Zahnärztl Implantol* 1996;12:152-157.

Books and Other Monographs

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

Electronic Citations

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

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

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

TABLES

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

FIGURES

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

Figure Legends

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

FOOTNOTES

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

SUPPLEMENTARY MATERIAL

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

Supplementary Figures and Tables

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

Supplementary Videos

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

STYLE

Please follow the guidelines below when preparing a manuscript:

- Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- Do not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, e.g., or i.e.
- Use a block style; do not tabulate or indent material.

- Refer to the newest edition of the Glossary of Periodontal Terms published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.
- Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the Annals of Periodontology, volume 4 (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).
- Create equations as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.
- Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal/National) numbering system.
- Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

AUTHORSHIP

Individuals identified as authors must meet all of the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition, analysis, or interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual

content; 3) final approval of the version to be published; and 4) agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

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

Conflict of Interest and Financial Disclosure Forms

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

CLINICAL TRIALS

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

All clinical trials must be registered prior to submission to the Journal of Periodontology at one of the registration sites listed below. The registration number and date of registration should be included in the Materials and Methods section. Starting **January 1, 2016, all clinical trials must be registered prior to initiation (i.e., recruitment) of the trial.**

Please see <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/about-studies/learn#WhatIs> for more information regarding clinical trials.

- U.S. National Institutes of Health Clinical Trials Registry - <http://www.clinicaltrials.gov>
- EU Clinical Trials Register - <https://www.clinicaltrialsregister.eu>

- WHO International Clinical Trials Registry Platform
<http://www.who.int/ictrp/en>

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

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

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

PRODUCT IDENTIFICATION

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

REVISED MANUSCRIPTS

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

1. A detailed response to each reviewer comment for the original manuscript should be included. This response should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews.
2. Only the most recent version of each file should be uploaded. You may have to delete older files from the Author Center.

3. **Please upload a version of the manuscript with changes highlighted or track changes enabled. This should be uploaded as a supplemental file.**
4. Figures and tables should be resubmitted with revised manuscripts, even if they were not revised.

REVIEW PROCESS

Peer Review

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

Checking the Status of a Manuscript

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

MANUSCRIPT ACCEPTANCE

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

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

acceptance. Authors will be notified about a final publication date by the Editorial Office.

Reprints

Corresponding authors may purchase reprints at the time pages are received for proofreading. Reprints can be purchased in 4-color or black and white. Electronic reprints are also available.

Online-Only Publication

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

Funding Agency Requirements

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

QUESTIONS

Inquiries regarding current submissions should be sent to: Editorial Specialist, Journal of Periodontology, 737 North Michigan Avenue, Suite 800, Chicago, IL 60611-6660. Telephone: 312/573-3255; e-mail: jerry@perio.org.

ANEXO B: CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).



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 "Terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da periodontite em ratos tratados com dose oncológica de zoledronato", Processo FOA nº 00534-2016, sob responsabilidade de Edilson Ervolino apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Setembro de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Outubro de 2018.

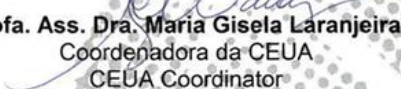
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Novembro de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of periodontitis os ratd under oncological dosa", Protocol FOA nº 00534-2016, under the supervision of Edilson Ervolino presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 02, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 01, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 01, 2018.


Prof. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora 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