

Paula Lazilha Faleiros

**Influência do hidrocloreto de tetraciclina
associado à terapia fotodinâmica no tratamento
da doença periodontal induzida: estudo
histomorfométrico e imunoistoquímico em
ratos**



Araçatuba - SP

2012

Paula Lazilha Faleiros

**Influência do hidrocloreto de tetraciclina
associado à terapia fotodinâmica no tratamento
da doença periodontal induzida: estudo
histomorfométrico e imunoistoquímico em
ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de Periodontia).

Orientador: Prof. Adjunto Alvaro Francisco Bosco

Coorientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Coorientador: Prof. Titular Valdir Gouveia Garcia

Araçatuba
2012

Dados Curriculares

Paula Lazilha Faleiros

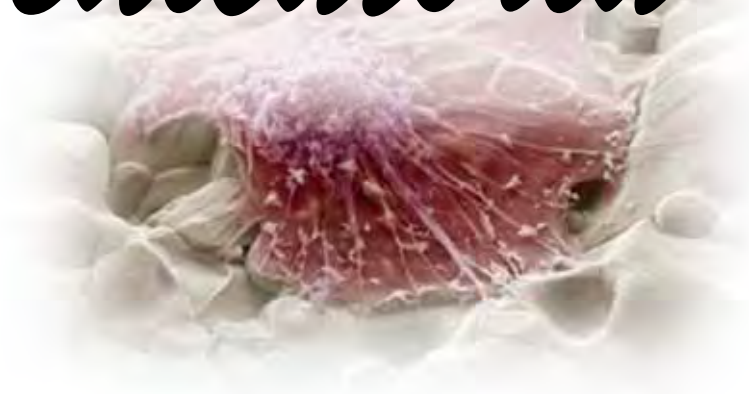
Nascimento: 18.03.1984 Penápolis- SP

Filiação: Francisco Alberto Azanha Faleiros
Neide Lazilha Faleiros

2004- 2009: Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP

2010-2012: 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



Dedico este trabalho...

A *Deus*

Creio que a oração não é tudo, mas tudo deve começar pela oração. Porque a inteligência humana é curta demais; A vontade do homem é fraca demais; Porque as pessoas que agem sem Deus nunca dão o melhor de si mesmas.

À minha Família...

Aqueles que nunca mediram esforços para realizarem meus sonhos, sempre estiveram ao meu lado, são inspiração para tudo o que faço e a razão para minha existência.

Aos meus pais, *Francisco e Neide*,

Pela dedicação, conforto e segurança para que eu pudesse seguir em frente... Pelo apoio e confiança depositados... Pela liberdade que me deram para que eu fizesse minhas próprias escolhas... Pela compreensão nos momentos de ausência...

Por terem me permitido conhecer o amor infinito...

SEM VOCÊS NADA SERIA POSSÍVEL!

*Alguns povos acreditam que, antes de nascermos,
ainda num plano espiritual, escolhemos nossos pais para
cumprirmos nossa missão aqui na Terra. Eu queria dizer que,
tantas vezes eu renascesse, escolheria vocês...*

Ao meu irmão, *Roberto*,

Meu exemplo de superação!

A força e persistência com que encara os obstáculos me são
contagiantes. Eita, “teimosia” que me agrada tanto!

A cada conquista minha... Ele é torcida vibrante! E se mostra orgulhoso!

A cada vitória dele... O prazer é todo meu! Sou irmã coruja!

Hoje, escrevendo nestas folhas, penso que se alguém me
perguntar “Pra que time você torce?” a resposta mais precisa...

“Oras, para o nosso!”.

Te amo!

Ao meu namorado, *Samuel*,

Você apareceu em meio a muita confusão e fez meu coração sossegar! Você preencheu minha vida com muitas piadas e muitas risadas que fizeram dos meus dias mais alegres... E quando assim não eram, você se mostrou sereno e intrépido, pronto pra me acalmar... E, depois de muitas lágrimas, me lembrava de que: o medo era normal, o erro era importante e que tudo podia não ser tão difícil assim como parecia...

Você foi paciente... Foi companheiro... E manteve meus pés no chão durante toda essa caminhada!

Obrigada por dividir esse sonho comigo!

Te amo!

*"Ainda que eu tenha o dom da profecia
e conheça todos os mistérios e toda a ciência,
ainda que eu tenha tão grande fé que transporte montanhas,
se não tiver amor, nada sou."*

(I Coríntios 13 de Apóstolo Paulo)

*Agradecimentos
Especiais*



Ao meu querido orientador *Professor Alvaro Francisco Bosco*

Há semanas tento escrever o meu agradecimento ao senhor... E o que tenho sempre é uma explosão de sentimentos que não se traduzem em palavras... Um misto de carinho, respeito, admiração e orgulho... Meu coração se enche de alegria toda vez que penso que tive a honra de ter sido orientada pelo professor Alvaro Bosco. O professor que ensina, em seu jeito simples de levar a vida, muito mais do que pesquisa, ensina virtudes essenciais como humildade, fraternidade, cordialidade e integridade. Que, como profissional, norteou a formação clínica odontológica de muitos dos colegas que tiveram a chance de vê-lo atender um paciente!

O senhor teve influência, de maneira decisiva, nos principais momentos da minha vida acadêmica. Lembro-me que decidi pela Periodontia no primeiro momento em que o vi fazer uma cirurgia! Deu-me a chance de sonhar com o que querer ser e o que querer fazer! Admiram-me a forma carinhosa com que me conduz e a preocupação para comigo... Com a minha saúde, com meu bem estar, com meus medos e meus anseios...

O Senhor acreditou em mim, professor! E palavras banais de agradecimento nunca expressarão o que isso significa pra mim.

Muito, muito obrigada!

“O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente.”

Aos meus coorientadores:

Professor Valdir Gouveia Garcia

Existe uma frase... *“Toda decisão acertada é proveniente de experiência. E toda experiência é proveniente de uma decisão não acertada”* (Albert Einstein).

Professor Valdir, há muito tempo a Periodontia vem tomando decisões acertadas a partir de suas decisões não acertadas. A sua “experiência diplomática” e habilidade administrativa são fundamentais para o andamento dos nossos trabalhos. O seu conhecimento e competência como pesquisador dão base sólida aos nossos estudos.

Muito obrigada pelas palavras sábias, pelos abraços apertados e olhar cauteloso que nos fazem sentir cuidados... Obrigada pelo carinho, ternura e energia vibrante que estimulam e inspiram...

Um dia eu ouvi o senhor dizer *“Essa é a sua vez! Essa é a sua chance! Faça valer a pena!”*... E desde então estou tentando fazer valer a pena, professor!

Professor Juliano Milanezi de Almeida

Este ano pude presenciar, com felicidade, seu ingresso na Faculdade de Odontologia de Araçatuba. O vi enfrentar com tranquilidade e competência a fase de preparação para o concurso. E mesmo com esse grande impasse, em nenhum momento nos deixou desamparados.

Ficou marcado por sua dedicação, perseverança e vontade de atingir seus objetivos!

Agradeço imensamente por sua responsabilidade para comigo, que muitas vezes ultrapassa os limites da coorientação. Muito obrigada pela orientação em todas as etapas deste trabalho e de outros trabalhos também!

À minha querida *Professora Maria José Hitomi Nagata*

Minha formação terá sempre um toque especial da senhora, que me acolheu com compreensão e carinho... Sua sensibilidade abrandou meus momentos mais difíceis. Sua disponibilidade, atenção e dedicação a tornaram muito especial em minha vida.

Ficará gravada pra sempre!

Meu profundo respeito e minha eterna gratidão e carinho por me fazer encontrar o caminho de volta a mim!

Obrigada por tudo, professora!

“...A vida sobretudo ocorre no intervalo entre os grandes momentos. Grande parte do que precisamos aprender se encontra nos pequenos eventos da vida!” (Elizabeth Kubler-Ross)

À querida *Professora Leticia Helena Theodoro.*

O pouco tempo de convivência foi o suficiente para perceber a grande educadora e pesquisadora que a Faculdade de Odontologia de Araçatuba ganhou!

Exemplo de objetividade, praticidade e competência... Transforma grandes empecilhos em coisas simples!

Muito obrigada por todas as vezes que me recebeu, com atenção e carinho, em sua sala, ou mesmo em sua casa, para sanar as minhas dúvidas... Obrigada pela agradável convivência, pelos valiosos ensinamentos e pelo voto de confiança que permitiu abrir as portas da sua casa para que pudéssemos participar e compartilhar as alegrias da sua vida e da vida do professor Valdir.

Muito obrigada!

Ao meu querido *Professor Edilson Ervolino*, da Disciplina de Histologia e Embriologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

O senhor nos acolheu com tanto carinho em seu laboratório... Hoje, a sua ajuda é de fundamental importância para a realização de todas as reações imunoistoquímicas e análises histológicas do grupo da Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Na etapa final deste trabalho conduziu-me com dedicação e paciência. Os valiosos conhecimentos transmitidos permitiram esclarecer com maior embasamento científico os resultados deste estudo e deram-me confiança para finalizar mais esta etapa da minha vida acadêmica. Muito obrigada pela doação e prontidão, especialmente neste momento tão importante pra mim! Muito obrigada por ajudar a alcançar meu objetivo!

Verdadeiras são as palavras do professor Alvaro... O senhor é realmente “um menino muito bom”!

À *Professora Maria Lúcia Marçal Mazza Sundefeld*, da Disciplina de Bioestatística e Informática do Departamento de Odontologia Infantil e Social da Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

Pelo auxílio e tempo dispensado para a realização da análise estatística deste trabalho.

À *Professora Ana Claudia Nakamune*, da Disciplina de Bioquímica do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

Pela gentileza em ceder o espectrofotômetro no início deste experimento e pela delicadeza e paciência ao me ensinar a utilizá-lo.

Aos meus queridos **amigos da Disciplina de Periodontia**

No início os dias se passavam devagar. Não demorou muito para que as atividades da pós-graduação preenchessem todo o tempo e a nossa convivência se tornou algo inevitável. Logo vieram as fases experimentais, seminários, aulas, clínicas... e tantas arrumações! Foram tantos os dias que passamos juntos, dividindo experiências, dificuldades, sonhos e aflições... Vocês se tornaram minha família em Araçatuba e o Departamento de Periodontia uma extensão da minha casa.

Não existe outra maneira de agradecer tantos esforços e tanta dedicação senão atribuir grande parte do mérito deste trabalho a vocês!

Muito obrigada!

À minha querida amiga *Natália de Campos*

O tamanho do seu coração é sua maior virtude. Continue amando e ajudando as pessoas mesmo que, às vezes, você se sinta meio boba e frágil. É lindo ser assim! A sua integridade e responsabilidade com o que você acha correto atrai as pessoas boas e, tenho certeza, que vão te trazer sucesso em sua vida pessoal e profissional sempre e sempre! Minha amiga a qual o coração trabalha na mesma sintonia do meu... Vou sempre torcer por você!

À minha querida amiga *Natália Pola*

Dona de uma força e fragilidade tão intimamente relacionadas... Quem te vê assim tão escondida atrás dessa personalidade pacífica e calma não conhece o quão forte e determinada você é. Seu autocontrole, sua segurança e seu jogo de cintura me são alvos de aprendizado... Sua doçura e humildade a tornam uma pessoa ainda mais especial... Muito obrigada pelo auxílio constante com meu trabalho e pela nossa amizade intensa... Pelas inúmeras vezes que me consolou, pelas inúmeras vezes que colocou a minha disposição ombro e palavras amigas! Agora que você se prepara para buscar novos caminhos, não abro mão da sua amizade. Vou estar sempre esperando seu retorno e torcendo por você!

Ao querido amigo *Eriuan Clementino Gualberto Júnior*

O qual tem os maiores e mais altos sonhos... Desde os primeiros momentos pude contar com sua ajuda, cheia de “toques e retoques” que tornavam meu trabalho cada vez mais especial. Cada detalhe foi fundamental para o meu crescimento tanto pessoal como profissional... A você confiei os meus caminhos... E pude perceber que torcia demais para que eu os percorresse com força e confiança. Obrigada pela dedicação com meu aprendizado! Nesta sua nova fase, sou eu quem vai estar aqui torcendo por você!

À minha amiga *Carolina Santinoni*

Esta amiga, que possui o dom da funcionalidade, faz tudo com menor perda de tempo e menor gasto de energia... É incrível e eu adoro a forma simples como descomplica a minha vida! E com muita paciência... Rs! Espero sempre retribuir o seu carinho e amizade sincera... Nesta nova etapa, continuaremos essa parceria! Conte comigo para driblar todos os novos desafios que ainda estão por vir!

À querida amiga *Mariellen Longo*

A qual muito admiro por sua conduta firme e disciplinada diante do seu trabalho... Por seu positivismo e amabilidade inerentes à sua pessoa... Muito obrigada pela amizade, pela torcida, pelas risadas de coisas simples e pela alegria contagiante!

À querida amiga *Vivian Cristina Noronha Novaes*

Uma pessoa “mega” especial! Com seu jeitinho “super” diferente, enche de alegria nosso ambiente de trabalho. Mãe e esposa, tem conduzido de forma admirável o curso de pós-graduação. Obrigada pelos momentos de convivência, pelas conversas descontraídas, pelos conselhos e carinho para comigo!

Ao funcionário, amigo e também colega de profissão *Jailson de Barros Lellis*

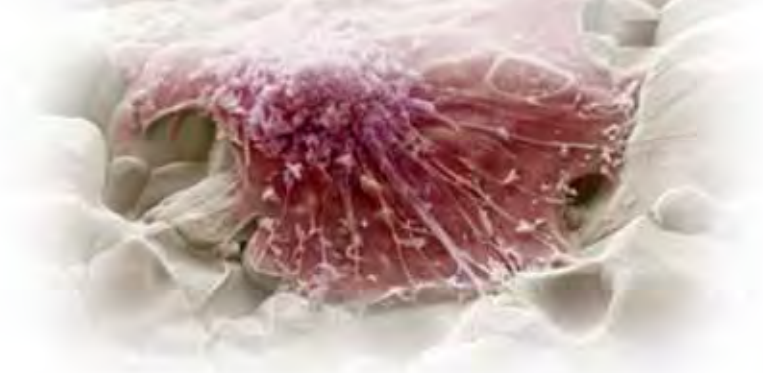
Pela amizade, convívio, disponibilidade e confiança... Você é o exemplo de profissional dedicado! Torço muito para que você conquiste todos seus sonhos!

Não tinha como não dar certo! A humanidade do Professor Alvaro, a experiência do Professor Valdir, a determinação do Professor Juliano, a ternura da Professora Maria José, a objetividade e praticidade da Professora Letícia e a dedicação dos seus pós-graduandos e funcionários, juntos resultaram em muito trabalho que tem nos dado bons frutos... Tenho muito orgulho de participar desse grupo competente que é a Periodontia. Que quanto mais se conhece, mais se aprecia!

“Somos todos anjos de uma asa só e somente abraçados podemos voar”

(Luciano de Crescenzo)

Agradecimientos



À Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, nas pessoas da sua Diretora Profa. Dra. **Ana Maria Pires Soubhia** e vice-diretor Prof. Dr. **Wilson Roberto Poi**, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, nas pessoas de sua coordenadora Profa. Dra. **Maria José Hitomi Nagata**, por sua dedicação e excelência com que o conduz.

Aos meus avós **Mané** (in memorian), **Thereza** (in memorian), **André** (in memorian), e **Zita** (in memorian)... Aos meus queridos tios e tias, primos e primas...

Por todas as vezes que me viram sair aos domingos em busca dos meus sonhos... E torceram por mim! **Eu os amo eternamente!**

À minhas queridas amigas de infância **Patrícia, Ana Maria, Carina, Rebeca e Carol** e é claro, ao meu querido **Zé...**

A minha história está marcada por essas amizades queridas. Apesar da distância que nos separa, os tenho guardados em meu coração sempre e sempre... **Amo muito todos vocês!**

À minha eterna babá, **Marlene**, e à nossa funcionária, **Marcia...** Pela amizade cultivada, pela torcida de todos os dias, pelo carinho e suporte...

Aos meus sogros **Sr. João e D. Neusa**, por me acolherem docemente em seu lar como uma filha, e ao meu cunhado **Silas**.

Agradeço imensamente o carinho, a atenção e agradável convivência.

Aos meus queridos amigos **Ana Cristina Murakawa, Leandro Araújo Fernandes, Thiago Marques Martins e Ricardo Oliveira de Moraes...**

Por terem me recebido na Periodontia com tanto carinho e acompanharem meus primeiros passos no laboratório... Muito obrigada!

Ao **Professor Dr. Michel Reis Messor**a da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo que, com muita atenção, dispôs de seu tempo para me ajudar com meu Exame Geral de Qualificação. Foi muito importante pra mim e eu o agradeço eternamente!

Aos meus queridos amigos da graduação, em especial **Renata Scatolin, Renata Colturato, Camila, Joyce, Lídia, Raquel...**

Pelo agradável convívio, por todo o apoio e torcida durante todos esses anos!

Aos funcionários da Seção de Graduação e Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Diogo, Marina, Marie, Valéria, Lilian e Cristiane**, pela eficiência e presteza de sempre. Pela “espetacular” paciência!

Obrigada por tudo o que fizeram por mim e pelo professor Alvaro!

À funcionária da Diretoria, **Celinha**, que tanto me ajudou com as questões relacionadas à FAPESP. Sempre sorriu ao invés de dizer... “de novo?!” Obrigada pela paciência!

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, **Cleide, Dirce, Gilmar, Paulo** e ao meu querido amigo **Sr. Odair...** Pelo carinho, dedicação e simpatia com que sempre me atenderam. Pela atenção às minhas aflições!

Obrigado por terem me ensinado tanto!

A todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Ana Claudia Grieger Manzatti, Cláudio Hideo Matsumoto, Cláudio Marciel Júnior, Fernando Fukunishi, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da Silva Freitas, Luzia Anderlini e Maria Cláudia de Castro Benez**, pelo carinho, atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Camilo, Alan e João Batista** que ofereceram suporte para a obtenção dos animais utilizados nesta pesquisa. Ao funcionário do Departamento de Ciências Básicas, **Arnaldo!** Por todo zelo e respeito com nossos animais experimentais.

Vocês são fundamentais para o alicerce dos nossos modelos experimentais!

Aos funcionários da Seção de Manutenção pela disponibilidade em ajudar sempre que surgiu algum imprevisto... Pela alegria contagiante! Vocês são “feras”!

Aos funcionários que se fazem presentes todos os dias na disciplina de Periodontia, **Dona Lúcia e Edson**, mantendo nosso ambiente de trabalho muito mais agradável e prazeroso.

Aos funcionários do Setor de Vigilância, em especial ao **Willian e Sr. Pires**, por todos os sorrisos de bom dia e por todas as vezes que zelaram por meu trabalho noturno. E ao **Sr. Francisco** pelas aulas de astronomia e por ter me mostrado a Lua, Júpiter e Saturno... Inesquecível!

Aos funcionários do SAEPE, **Renato, Samuel, Patrick e Maurício**, pela ajuda prestada com os laboratórios da graduação durante todo o ano letivo.

A todos os funcionários que estiveram presentes nesta etapa da minha vida! Aos que se tornaram grandes amigos! Aos que me ajudaram de alguma maneira a construir a minha história dentro desta Universidade durante os Cursos de Graduação e Pós-graduação. Em especial aos queridos funcionários **Pedro, Marcelinho, Dora, Dulce, Maria, Elizeide...**

Aos meus colegas de turma do curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Pela amizade e torcida.

Aos alunos do Curso de Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo respeito, credibilidade e confiança depositados aos alunos da Pós-graduação.

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

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

À **FAPESP**, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo nº 2010/04483-8) e auxílio (Processo nº 2011/00143-0) para realização deste trabalho.

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

Muita gente passou, muitas ficaram e outras virão... É assim que se escreve uma boa história! Obrigada a todos!

Paula Lazília Faleiros

Επίγραφε



“O Homem que venceu na vida é
aquele que viveu bem, riu muitas vezes e
amou muito. Conquistou o respeito dos
homens inteligentes, preencheu um lugar,
cumpru uma missão e procurou o melhor
nos outros e deu o melhor de si.”

Robert Louis Stevenson

Resumo



Faleiros, P.L. **Influência do hidrocloreto de tetraciclina associado à terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal induzida: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico em ratos** [Dissertação]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2012.

Objetivo: O propósito do presente estudo foi realizar uma avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica do efeito do hidrocloreto de tetraciclina (TTC) e da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), usados isoladamente ou em associação, como adjuvantes à raspagem e alisamento radicular (SRP) no tratamento da doença periodontal (DP) experimental induzida. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 168 ratos, nos quais a DP foi induzida através da adaptação de fio de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. Após 7 dias, a ligadura de todos os animais foi removida e o primeiro molar inferior esquerdo foi submetido à SRP. Os animais foram então divididos randomicamente em 7 grupos experimentais de diferentes tratamentos adjuvantes à SRP: SRP-SS - irrigação com solução salina (SS); SRP-MB - irrigação com azul de metileno (MB); SRP-TTC - irrigação com TTC; SRP-MB/TTC - irrigação com solução de MB e TTC; SRP-aPDT - irrigação com MB e, após 60 s, irradiação com Laser em baixa intensidade (LLLT) (660 nm); SRP-TTC/LLLT – irrigação com TTC e, após 60 s, irradiação com LLLT (660 nm); SRP-TTC/aPDT - irrigação com solução de MB e TTC e, após 60 s, irradiação com LLLT (660 nm). Os animais foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após o tratamento da DP. Foi realizada uma análise histométrica da área de perda óssea (PO) e das características histopatológicas e imunoistoquímicas da região de furca. **Resultados:** Aos 7 dias pós-tratamento, os grupos SRP-TTC, SRP-MB/TTC, SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT e SRP-TTC/aPDT exibiram menor área de PO que os grupos SRP-SS e SRP-MB ($p<0,05$). Aos 15 dias pós-tratamento, os grupos SRP-TTC, SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT e SRP-TTC/aPDT exibiram menor área de PO que o Grupo SRP-SS ($p<0,05$). Os grupos SRP-TTC e SRP-TTC/aPDT exibiram menor

área de PO que o Grupo SRP-aPDT ($p<0,05$). Aos 30 dias pós-tratamento, os todos os grupos tratados exibiram menor área de PO que o Grupo SRP-SS ($p<0,05$). Aos 15 e 30 dias pós-tratamento houve diminuição gradual na quantidade de células TRAP-positivas em todos os grupos, exceto no Grupo SRP-SS. Nos grupos SRP-SS, SRP-MB e SRP-MB/TTC a imunomarcagem para RANKL e OPG foi maior aos 7 dias e 30 dias pós-tratamento, respectivamente, enquanto que nos grupos SRP-TTC, SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT e SRP-TTC/aPDT, houve uma forte tendência a uma diminuição de RANKL, especificamente aos 7 e 15 dias pós-tratamento, e um aumento de OPG aos 15 e 30 dias pós-tratamento. **Conclusão:** O TTC e a aPDT, usados isoladamente ou em associação, em adjunto à SRP foram efetivos no tratamento da DP experimental induzida em ratos. A associação TTC/aPDT não promoveu benefício adicional em relação ao uso isolado de cada terapia.

Palavras-chave: Periodontite crônica; tetraciclina; fotoquimioterapia; lasers; perda óssea alveolar.

Abstract



Faleiros, P.L. **Influence of tetracycline hydrochloride associated with photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontal disease: histomorphometric and immunohistochemical study in rats** [Dissertation]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2012.

Aim: The purpose of the present study was to perform a histomorphometric and immunohistochemical assessment of the effect of tetracycline hydrochloride (TTC) and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), used alone or in combination, as adjunct to scaling and root planing (SRP) in the treatment of experimentally induced periodontal disease (PD). **Materials and methods:** One-hundred-and-sixty-eight rats were used, in which PD was induced by tying cotton thread around the left mandibular first molar. After 7 days, ligatures were removed from all animals, and left first molar was subjected to SRP. The animals were then randomly divided into 7 experimental groups receiving different treatments adjuvant to SRP: SRP-SS - irrigation with saline solution (SS); SRP-MB - irrigation with methylene blue (MB), SRP-TTC - irrigation with TTC; SRP-MB/TTC - irrigation with TTC and MB solution; SRP-aPDT - irrigation with MB and afterwards 60 s irradiation with low-level laser therapy (LLLT) (660 nm); SRP -TTC/LLLT - irrigation with TTC, and afterwards 60 s, LLLT irradiation (660 nm); SRP-TTC/aPDT - irrigation with TTC and MB solution and afterwards 60 s, irradiation with LLLT (660 nm). Animals were euthanized at 7, 15 and 30 days after treatment of PD. Histometric evaluation of bone loss (BL), and of histopathological and immunohistochemical characteristics of the furcation region, was performed. **Results:** At 7 days postoperatively, SRP-TTC, SRP-MB/TTC, SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT and SRP-TTC/aPDT groups exhibited less BL than SRP-SS and SRP-MB groups. At 15 days postoperatively, SRP-TTC, SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT and SRP-TTC/aPDT groups exhibited smaller area of BL than SRP-SS Group. SRP-TTC and SRP-TTC/aPDT groups exhibited smaller area of BL than SRP-aPDT Group. At 30 days post-treatment, all treated

groups showed smaller area of BL than SRP-SS Group. At 15 and 30 days post-treatment, a gradual decrease in the amount of TRAP-positive cells was observed, except in SRP-SS. In SRP-SS, SRP-MB and SRP-MB/TTC groups, immunostaining for RANKL and OPG was higher at 7 and 30 days post-treatment, respectively. SRP-TTC, SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT and SRP-TTC/aPDT groups presented a strong trend towards decrease in RANKL, specifically at 7 and 15 days post-treatment and to increase in OPG at 15 and 30 days post-treatment. **Conclusion:** TTC and aPDT, used alone, or combined as adjunct to SRP were effective in the treatment of experimental periodontal disease induced in rats. The combination TTC/aPDT provided no additional benefit when compared with isolated use of each therapy.

Key words: Chronic periodontitis; tetracycline; photochemotherapy; lasers; alveolar bone loss.

Lista de Tabelas

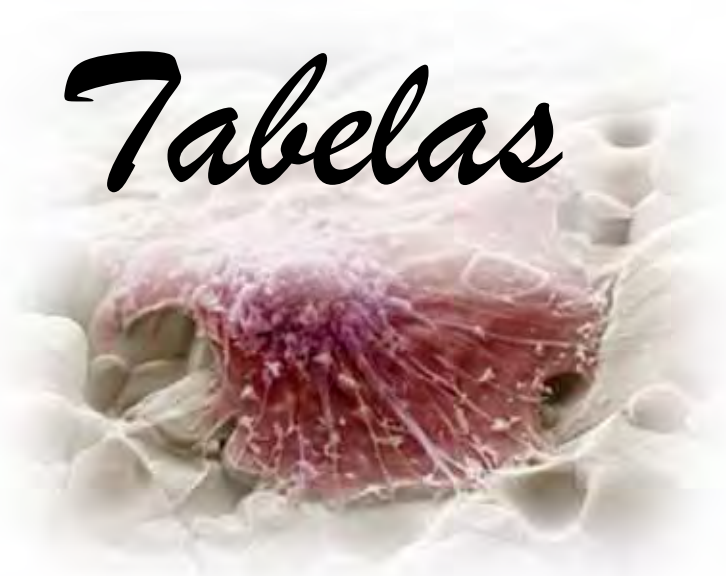


Tabela 1 - Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) dos dados histométricos da área de perda óssea (PO, mm^2) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo com doença periodontal experimental induzida, nas interações entre Grupos e Períodos. 75

Lista de Figuras



- Figura 1 - Fotomicrografias da região de furca do primeiro molar inferior com DP 78
induzida, aos 7 dias pós-tratamento. Magnitude da PO alveolar nos grupos SRP-SS **(a)**, SRP-MB/TTC **(b)**, SRP-TTC/LLLT **(c)**, SRP-TTC **(d)**, SRP-aPDT **(e)** e SRP-TTC/aPDT **(f)**. Abreviações: ab, osso alveolar (coloração TM; aumento original = 40x e barra de escala: **a-f** = 500 μ m).
- Figura 2 - Fotomicrografias da região de furca do primeiro molar inferior com DP 79
induzida, aos 15 dias pós-tratamento. Magnitude da PO alveolar e aspectos histopatológicos apresentadas pelo tecido conjuntivo e ósseo nos grupos SRP-SS **(a-b)**, SRP-TTC **(c-d)**, SRP-aPDT **(e-f)** e SRP-TTC/aPDT **(g-h)**, aos 15 dias pós-tratamento. Abreviações e símbolos: ab, osso alveolar; *, áreas de osso neoformado (coloração H&E; em **a, c, e e g**, aumento original = 40x e barra de escala = 500 μ m; em **b, d, f e h**, aumento original = 160x e barra de escala = 120 μ m).
- Figura 3 - Fotomicrografias de cortes longitudinais da região de furca do primeiro 80
molar inferior com DP induzida, aos 30 dias pós-tratamento. Magnitude da PO alveolar nos grupos SRP-SS **(a)**, SRP-TTC **(b)**, SRP-aPDT **(c)**, SRP-TTC/aPDT **(d)**. Abreviações: ab, osso alveolar (coloração H&E; aumento original = 40x e barra de escala: **a-d** = 500 μ m).

- Figura 4 - Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcação da TRAP 81
na região de furca do primeiro molar inferior com DP induzida, aos 7 dias pós-tratamento. Osteoclastos TRAP imunorreativos (cabeças de seta pretas) nos grupos SRP-SS **(a)**, SRP-TTC **(b)**, SRP-aPDT **(c)** e SRP-TTC/aPDT **(d)**. Abreviações: ab, osso alveolar (aumento original = 1000x e barra de escala = 20 μ m).
- Figura 5 - Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcação do 82
RANKL e da OPG na região de furca do primeiro molar inferior com DP induzida, aos 15 dias pós-tratamento. Células RANKL imunorreativas (cabeças de seta pretas) e OPG imunorreativas nos grupos SRP-SS **(a;c)** e SRP-TTC/aPDT **(b;d)**. Abreviações: ab, osso alveolar (aumento original = 1000x e barra de escala = 20 μ m).

Lista de Anexos



Anexo A -	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)	84
Anexo B -	Normas para publicação do Periódico “Journal of Clinical Periodontology”	86

Lista de Abreviaturas e Siglas



ANOVA	=	Análise de Variância
aPDT	=	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
AsGaAl	=	Arseneto de Gálio e Alumínio
CEEA	=	Comissão de Ética em Experimentação Animal
cm ²	=	Centímetros quadrados
DNA	=	Ácido Desoxirribonucleico
DP	=	Doença Periodontal
DP	=	Desvio Padrão
EDTA	=	Ácido Etilenodiaminotetracético
FAPESP	=	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FS	=	Fotossensibilizador
g	=	Gramas
GL	=	Gay Lussac
h	=	Horas
H&E	=	Hematoxilina e Eosina
HRP	=	Peroxidase da Raiz Forte
InGaAlP	=	Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo
J	=	Joule
J/cm ²	=	Joule por centímetro quadrado
LLLT	=	Terapia com laser em baixa intensidade
M	=	Média
MB	=	Azul de Metileno
mg/kg	=	Miligramas por quilogramas
mg/ml	=	Miligramas por mililitros
min	=	Minutos
ml	=	Mililitros
mm ²	=	Milímetros quadrados

mRNA	=	Ácido Ribonucleico Mensageiro
mW	=	Milivates
nm	=	Nanometro
OPG	=	Osteoprotegerina
PBS	=	Solução Salina Tamponada
PBS-TX	=	Solução Salina Tamponada com Triton
PO	=	Perda óssea
RANK	=	Receptor ativador de NF Kappa β
RANKL	=	Receptor ativador de NF Kappa β ligante
s	=	Segundos (Unidade de medida de tempo)
SRP	=	Raspagem e alisamento radicular
TM	=	Tricrômico de Masson
TRAP	=	Fosfatase Ácida Tartarato Resistente
TTC	=	Hidrocloreto de tetraciclina
$\mu\text{g/ml}$	=	Micrometros por mililitros
μm	=	Micrometros (Unidade de medida)
$^{\circ}\text{C}$	=	Graus célsius (Unidade de medida de temperatura)

Lista de Símbolos



%	=	Por cento
@	=	Arroba
<	=	Menor
≤	=	Menor ou Igual
=	=	Igual
+	=	Mais
±	=	Mais ou menos
®	=	Marca registrada
β	=	Beta
x	=	Veze
n	=	Tamanho da amostra
<i>p</i>	=	Probabilidade do valor do teste
pH	=	Potencial Hidrogeniônico
n°	=	Número

Sumário

Manuscrito para publicação	43
Página de título	44
Resumo	45
Introdução	47
Materiais e métodos	49
Resultados	55
Discussão	59
Referências	67
Anexos	74

*Manuscrito para Publicação**



* Segundo as normas do Periódico “**Journal of Clinical Periodontology**”
– AnexoB.

Influência do hidrocloreto de tetraciclina associado à terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal induzida: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico em ratos

Autores: Alvaro Francisco Bosco^{ab*}, Paula Lazilha Faleiros^{ab}

^a Univ. Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - Disciplina de Periodontia, Araçatuba, SP, Brasil.

^b GEPLO – Grupo de Estudos e Pesquisas com Lasers em Odontologia, Univ. Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - Disciplina de Periodontia, Araçatuba, SP, Brasil.

Título resumido (“running title”): Efeito da TTC e aPDT na DP

Palavras-chave: Periodontite crônica; tetraciclina; fotoquimioterapia; lasers; perda óssea alveolar

***Autor responsável pela correspondência:**

Alvaro Francisco Bosco. Rua José Bonifácio, 1193. CEP: 16015-000, Araçatuba, SP, Brasil.

Telephone: +55 18 36363239; Fax: +55 18 36363332; e-mail: afbosco@hotmail.com

Conflito de interesse e declaração de fonte de financiamento

Os autores declaram não haver conflito de interesse. O presente estudo foi realizado na Disciplina de Periodontia (Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia Araçatuba - UNESP) e financiado pela organização governamental Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - São Paulo, SP, Brasil (FAPESP – processo nº 2011/00143-0). A aluna Paula L. Faleiros recebeu bolsa de estudo da FAPESP (processo nº 2010/04483-8).

Resumo

Objetivo: O propósito do presente estudo foi realizar uma avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica do efeito do hidrocloreto de tetraciclina (TTC) e da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), usados isoladamente ou em associação, como adjuvantes à raspagem e alisamento radicular (SRP) no tratamento da doença periodontal (DP) experimental induzida. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 168 ratos, nos quais a DP foi induzida através da adaptação de fio de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. Após 7 dias, a ligadura de todos os animais foi removida e o primeiro molar inferior esquerdo foi submetido à SRP. Os animais foram então divididos randomicamente em 7 grupos experimentais de diferentes tratamentos adjuvantes à SRP: SRP-SS - irrigação com solução salina (SS); SRP-MB - irrigação com azul de metileno (MB); SRP-TTC - irrigação com TTC; SRP-MB/TTC - irrigação com solução de MB e TTC; SRP-aPDT - irrigação com MB e, após 60 s, irradiação com Laser em baixa intensidade (LLLT) (660 nm); SRP-TTC/LLLT - irrigação com TTC e, após 60 s, irradiação com LLLT (660 nm); SRP-TTC/aPDT - irrigação com solução de MB e TTC e, após 60 s, irradiação com LLLT (660 nm). Os animais foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após o tratamento da DP. Foi realizada uma análise histométrica da área de perda óssea (PO) e das características histopatológicas e imunoistoquímicas da região de furca. **Resultados:** Aos 7 dias pós-tratamento, os grupos SRP-TTC, SRP-MB/TTC, SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT e SRP-TTC/aPDT exibiram menor área de PO que os grupos SRP-SS e SRP-MB ($p<0,05$). Aos 15 dias pós-tratamento, os grupos SRP-TTC, SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT e SRP-TTC/aPDT exibiram menor área de PO que o Grupo SRP-SS ($p<0,05$). Os grupos SRP-TTC e SRP-TTC/aPDT exibiram menor área de PO que o grupo SRP-aPDT ($p<0,05$). Aos 30 dias pós-tratamento, os todos os grupos tratados exibiram menor área de PO que o Grupo SRP-SS ($p<0,05$). Aos 15 e 30 dias pós-tratamento houve diminuição gradual na quantidade de células TRAP-positivas em todos os

grupos, exceto no Grupo SRP-SS. Nos grupos SRP-SS, SRP-MB e SRP-MB/TTC a imunomarcção para RANKL e OPG foi maior aos 7 dias e 30 dias pós-tratamento, respectivamente, enquanto que nos grupos SRP-TTC, SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT e SRP-TTC/aPDT, houve uma forte tendência a uma diminuição de RANKL, especificamente aos 7 e 15 dias pós-tratamento, e um aumento de OPG aos 15 e 30 dias pós-tratamento. **Conclusão:** O TTC e a aPDT, usados isoladamente ou em associação, em adjunto à SRP foram efetivos no tratamento da DP experimental induzida em ratos. A associação TTC/aPDT não promoveu benefício adicional em relação ao uso isolado de cada terapia.

Relevância Clínica

Razão científica para o estudo: Tem sido demonstrado que o TTC e a aPDT são efetivos no tratamento da DP. Entretanto, não há relatos da comparação dos seus efeitos na literatura. As evidências de que o TTC pode agir como fotossensibilizador (Fs) levam a crer que a associação de ambas as terapias também necessita ser investigada.

Principais achados: O TTC e a aPDT, usados isoladamente ou associados, reduziram a PO alveolar, apresentando efeitos similares com o passar do tempo no tratamento da DP.

Implicações clínicas: O TTC e aPDT têm potencial para serem usados como terapia adjuvante à SRP no tratamento da DP. Contudo a associação TTC/aPDT não leva a benefícios adicionais em relação ao uso isolado de cada terapia.

1.Introdução

A terapia periodontal tem como objetivo interromper a progressão da doença e reestabelecer os níveis de inserção periodontal (Prates et al. 2011) através da eliminação das espécies patogênicas presentes no biofilme supra e subgengival (Teles et al. 2006). Os conceitos atuais da terapia periodontal são baseados na remoção de depósitos bacterianos, cálculos e cimentos contaminados por bactérias e endotoxinas através da Raspagem e Alisamento Radicular (SRP) (Takasaki et al. 2009).

Por outro lado, estudos relatam que a SRP não elimina completamente as bactérias, que podem persistir no cimento radicular, túbulos dentinários ou reservatórios teciduais (Adriaens et al. 1988, Umeda et al. 2004). Além disso, fatores anatômicos como bolsas periodontais profundas, concavidades e áreas de furca podem reduzir a eficácia do tratamento mecânico convencional (Noiri & Ebisu 2000, Umeda et al. 2004). Neste contexto, a administração local de agentes antimicrobianos em bolsas periodontais foi sugerida como alternativa terapêutica adjuvante ao tratamento puramente mecânico (Fernandes et al. 2010).

O hidrocloreto de tetraciclina (TTC) tem sido muito investigado em função de seu potente efeito antimicrobiano aliado a sua propriedade de substantividade (Stabholz et al. 1993). Sua afinidade pela superfície dental permite que ele seja adsorvido pelo esmalte e dentina e gradativamente liberado no fluido crevicular gengival em sua forma ativa, prolongando seu efeito antimicrobiano (Baker et al 1983, Stabholz et al. 1993). O TTC ainda apresenta grande atividade contra a microflora periodontopatogênica (Walker et al. 1981), além de ser capaz de exercer alguns efeitos modulatórios sobre a resposta do hospedeiro (Golub et al. 1984, Gabler & Creamer 1991, Rawal & Rawal 2001, Terranova et al. 1986).

A efetividade da irrigação subgengival do TTC adjuvante à SRP na prevenção da perda óssea (PO) alveolar em ratos com doença periodontal (DP) induzida foi relatada por

Fernandes et al. (2010). Outros autores ainda observaram resultados clínicos satisfatórios no tratamento de pacientes com periodontite crônica após irrigação subgengival com TTC (Christersson et al. 1993, Stabholz et al. 1998, Krishna et al. 2011). Entretanto, a administração local e sistêmica de TTC pode não eliminar por completo os patógenos presentes na bolsa periodontal devido à seleção de cepas bacterianas intrinsecamente resistentes a essa droga (Rodrigues et al. 2004). Com objetivo de evitar a possibilidade de seleção bacteriana, novas terapias antimicrobianas, tais como a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), têm sido propostas para o tratamento da DP. (Hamblin & Hasan et al. 2004, Dai et al. 2009).

A aPDT é definida com uma reação fotoquímica oxigênio-dependente, que ocorre sob ação da luz, mediada pela ativação de um agente fotossensibilizador para gerar espécie de oxigênio altamente reativo e citotóxico, predominantemente oxigênio singlete (Ochsner 1997). Esta ação produz uma cascata de eventos oxidativos que levam à morte bacteriana (Hamblin 2012). A irradiação com Laser em baixa intensidade (LLLT) também apresenta efeitos bioestimuladores (Almeida-Lopez et al. 2001), favorecendo a cicatrização dos tecidos periodontais e reduzindo a inflamação local (Aoki et al. 2004).

Dentre as principais vantagens da aPDT está sua especificidade bacteriana sem promover a seleção de cepas resistentes (Dai et al. 2009). No entanto, sua efetiva atividade antimicrobiana ocorre exclusivamente durante a presença da luz, sem que haja um efeito prolongado (Dai et al. 2009). Evidências sugerem que as tetraciclinas são fotossensibilizadores (FS) efetivos na produção de oxigênio singlete (Miskoski et al. 1998, Rajesh et al. 2012). Essa característica, aliada a sua propriedade de substantividade, levam a crer que a utilização do TTC como FS na aPDT poderia ser capaz de garantir um potente e prolongado efeito antimicrobiano. A associação entre TTC e aPDT poderia resultar em efeito

sinérgico e benéfico no tratamento da DP, o que justificaria sua investigação. Além disso, a comparação entre os efeitos de ambas as terapias no tratamento da DP ainda não foi descrito na literatura.

Com base no exposto, o propósito deste estudo foi realizar uma avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica do efeito do TTC e da aPDT, usados isoladamente ou em associação, como adjuvantes à SRP no tratamento da DP experimental induzida em ratos.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, (protocolo nº 002451-2010). Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento. Foram utilizados 168 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 350 a 400 g (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – SP). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ração e água *ad libitum*.

2.2. Protocolo Experimental

2.2.1. Protocolo da indução da doença periodontal e grupos experimentais

Para todos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de 70 mg/Kg de peso corporal de cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge

Iowa – EUA) associado a 6 mg/Kg de peso corporal de cloridrato de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil).

A DP experimental foi induzida nos primeiros molares inferiores esquerdos pela adaptação de um fio de algodão (Corrente Algodão nº 24; Coats Corrente, SP, Brasil) em posição subgingival (Johnson 1975). Após 7 dias da indução da DP, a ligadura de todos os animais foi removida e o primeiro molar inferior esquerdo foi submetido à SRP. Os animais foram então divididos randomicamente em 7 grupos experimentais (n=24) de diferentes tratamentos adjuvantes à SRP: **Grupo SRP-SS** - irrigação com 1 ml de solução salina (SS); **Grupo SRP-MB** - irrigação com 1 ml de solução de azul de metileno (MB) (100 µg/ml); **Grupo SRP-TTC** - irrigação com 1 ml de solução de TTC (100 mg/ml); **Grupo SRP-MB/TTC** - irrigação com 1 ml de solução contendo 50% de MB (100 µg/ml) e 50% de TTC (100 mg/ml); **Grupo SRP-aPDT** - irrigação com 1 ml de solução de MB (100 µg/ml) e, após 60 s, irradiação da bolsa periodontal com LLLT (660 nm); **Grupo SRP-TTC/LLLT** – irrigação com 1 ml de solução de TTC (100 mg/ml) e, após 60 s, irradiação da bolsa periodontal com LLLT (660 nm); **Grupo SRP-TTC/aPDT** - irrigação com 1 ml da solução contendo 50% de MB (100 µg/ml) e 50% de TTC (100 mg/ml) e, após 60 s, irradiação da bolsa periodontal com LLLT (660 nm).

2.2.2. Raspagem e alisamento radicular

No primeiro molar inferior esquerdo de todos os animais foi realizada SRP com curetas manuais “mini-five” nº 1-2 (Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, EUA), através de 10 movimentos de tração disto-mesial nas faces vestibular e lingual. As áreas interproximais e de furca foram raspadas com as mesmas curetas através de movimentos de tração cérvico-oclusais. Os procedimentos de SRP foram realizados por um mesmo operador experiente (Almeida et al 2008).

2.2.3. Protocolo de dissolução do hidrocloreto de tetraciclina

A solução na concentração de 100mg/ml de TTC foi preparada no momento da sua utilização pela dissolução de cápsula contendo 500mg de TTC em 5 ml de SS (Wikesjö et al. 1986).

2.2.4. Aplicação das soluções na bolsa periodontal

Todas as soluções foram depositadas, lentamente, no interior da bolsa periodontal com o auxílio de seringa e agulha de insulina sem bisel. A irrigação foi realizada circunferencialmente expondo toda a superfície radicular ao tratamento.

2.2.5. Protocolo de aplicação do LLLT

O Laser utilizado no presente estudo foi o TheraLase® (DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, São Paulo, Brasil - **Auxílio FAPESP – Processo 2008/00297-5**) que possui as seguintes características: Emissores de InGaAlP 660 ~ 685 nm (visível) e AsGaAl 808 ~ 830 nm (infra-vermelho) de comprimento de onda, potência útil do emissor de 35 mW e 100 mW, potência máxima 10 a 100 J/cm², emissão contínua e pulsada e fibra ótica de 600 µm de diâmetro.

O Laser foi irradiado nos grupos SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT e SRP-TTC/aPDT, após 60 s da irrigação das bolsas periodontais com respectivas soluções. A luz foi direcionada ao interior da bolsa periodontal em 3 pontos equidistantes na superfície vestibular e 3 pontos equidistantes na superfície lingual seguindo o seguinte protocolo de tratamento: Comprimento de onda: 660 nm (laser visível); Potência: 35 mW; Modo de aplicação: Laser contato – pontual; Modo de operação: Laser contínuo; Energia: 0,105 J; Energia total: 0,63 J; Área do

spot: 0,0283 cm²; Densidade de energia: 1,23W/cm², Dose de energia: 3,71 J/cm²/ponto; Tempo de exposição por ponto: 3 s; Tempo de exposição total: 18 s.

2.2.6. *Períodos experimentais*

Oito animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia aos 7, 15 ou 30 dias após a realização dos tratamentos locais da DP através de dose excessiva de Tiopental (150 mg/kg de peso corporal) (Cristália, Ltda., Itapira, SP, Brasil). A hemi mandíbula esquerda de cada animal foi removida e fixada em formaldeído tamponado a 4% por um período de 48 h.

2.3. **Processamento Laboratorial**

2.3.1. *Processamento Histológico*

Após fixação, os espécimes foram descalcificados em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%. Após inclusão em parafina, cortes semi-seriados (4 µm) foram obtidos no sentido mésio-distal. Alguns cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) ou tricrômico de Masson (TM).

2.3.2. *Processamento Imunoistoquímico*

Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato, pH 6,0, em câmara pressurizada *Decloaking Chamber*® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 20 min. Após lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4, as lâminas histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio, por 1 h, para o bloqueio da peroxidase endógena. Em prosseguimento, depois de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram tratados com 3% de soro albumina bovino por 12 h, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Lâminas

histológicas contendo amostras de todos os grupos experimentais foram divididas em três lotes, e cada lote foi submetido à incubação com um dos seguintes anticorpos primários: anti-TRAP do rato gerado em cabra (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-RANKL do rato gerado em cabra (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-OPG do rato gerado em cabra (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 h, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes empregou-se o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotinilado, durante 2 h, lavadas, e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 h. Depois de três lavagens em PBS-TX procedeu-se a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram contracorados com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

2.4. Análise histomorfométrica

Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca foi evidente, cinco cortes equidistantes de cada espécime corados por H&E foram selecionados para análise histomorfométrica. Esta seleção foi realizada por um examinador treinado e cego ao tratamento efetuado. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por uma câmera digital conectada a um microscópio de luz com aumento original de 50x. O software Axiovision 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany) foi utilizado para análise histomorfométrica da área de PO na região de furca, realizada por outro examinador calibrado e cego ao tratamento. A área de PO de cada espécime foi medida três

vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados (Almeida et al. 2008).

As características histológicas do ligamento periodontal e fibras colágenas na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos foram analisadas nos cortes corados pela técnica de TM.

2.5. Análise Imunoistoquímica

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico por um investigador cego aos tratamentos efetuados. Em cada animal foi analisada toda a extensão da porção mais coronária da região de furca dos primeiros molares com DP experimental induzida com um aumento de 400x.

Para RANKL e OPG foi efetuada uma análise semi-quantitativa utilizando-se de três secções histológicas de cada animal e ao padrão de imunomarcção foi atribuído um escore. O critério para o estabelecimento dos escores foi adotado de uma modificação daqueles estabelecidos por Faria et al. (2008), onde: 0 = ausência de imunomarcção; 1 = baixo padrão de imunomarcção; 2 = moderado padrão de imunomarcção; 3 = alto padrão de imunomarcção.

Para TRAP foi efetuada uma análise descritiva onde se avaliou as células apresentando três ou mais núcleos e imunorreativas à TRAP em uma secção histológica de cada animal.

2.6. Análise Estatística dos Dados Histométricos

Após análise de normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk, Kolmogorov - Smirnov e Cramer - von Mises, foi realizada análise de variância a dois critérios “ANOVA”, com nível de significância a 5% ($p < 0,05$). Foi aplicado o teste de Tukey para comparação dos

grupos como também comparação dos períodos. Quando detectado diferença estatisticamente significativa nas interações, foi feita a decomposição das interações pelo teste t de Student, ajustado pelos mínimos quadrados médios (lsmeans). Todas as análises foram realizadas através do software SAS, versão 9.2.

3. Resultados

3.1. Análise Histológica Qualitativa

Nos grupos SRP-SS e SRP-MB as características histopatológicas se mostraram muito similares. Aos 7 dias pós-tratamento, um tecido conjuntivo com intenso infiltrado inflamatório, composto principalmente por polimorfonucleares neutrófilos, predominava na região da furca. Nas imediações do septo interradicular pode-se observar uma margem de tecido conjuntivo menos inflamado, composto por uma grande quantidade de fibroblastos e vasos sanguíneos, entremeados em uma delicada rede de fibras colágenas. O tecido ósseo do septo interradicular se mostrava constituído por trabéculas ósseas de contorno externo bastante irregular, em função da presença de inúmeras lacunas de reabsorção e osteoclastos em franca atividade. Alguns dos espécimes apresentaram espículas de osso necrosado envoltas por células inflamatórias na região da furca (Figura 1a). Aos 15 dias pós-tratamento as características histopatológicas se mantiveram similares às descritas anteriormente, no entanto, houve uma redução do volume ocupado pelo infiltrado inflamatório (Figura 2a,b). Aos 30 dias pós-tratamento o infiltrado inflamatório apresentou alterações quantitativas e qualitativas. Houve uma redução ainda maior do volume ocupado pelas células inflamatórias, especialmente no Grupo SRP-MB, e neste período, além de neutrófilos, havia uma grande quantidade de linfócitos e macrófagos. O tecido conjuntivo situado nas adjacências do osso do septo interradicular exibiu uma quantidade moderada de fibroblastos e fibras colágenas. O

tecido ósseo ainda se mostrava composto por trabéculas ósseas delicadas, no entanto, com o contorno da superfície menos irregular (Figura 3a). O efeito benéfico do MB adjuvante à SRP sobre os tecidos periodontais foi melhor evidenciado em períodos mais longos do tratamento. As observações das características histológicas da área de furca justificam os resultados obtidos pela análise histométrica onde se constatou uma menor área de PO em relação ao Grupo SRP-SS aos 30 dias pós-tratamento ($p<0,001$).

Houve muita semelhança entre as características estruturais apresentadas pelos grupos SRP-TTC, SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT e SRP-TTC/aPDT. Nestes grupos aos 7 dias pós-tratamento, o infiltrado inflamatório, composto principalmente por neutrófilos, se mostrou discreto. O tecido conjuntivo nas adjacências do septo interradicular exibiu uma moderada quantidade de fibroblastos, raras células inflamatórias e grande quantidade de fibras colágenas e vasos sanguíneos. Além de apresentarem uma PO alveolar menos acentuada que aquela apresentada pelo Grupo SRP-SS ($p<0,05$), o osso do septo interradicular exibiu trabéculas ósseas de contorno superficial externo bastante regular, repletas de osteoblastos em franca atividade de síntese de matriz óssea e com menos áreas de reabsorção óssea ativa (Figura 1c-f). Aos 15 dias pós-tratamento, observou-se um infiltrado inflamatório ainda mais discreto e uma nítida organização do tecido conjuntivo, que passou a exibir maior quantidade de fibras colágenas e moderada quantidade de fibroblastos. Foi evidente neste período, na maioria das amostras, a presença de áreas que exibiram neoformação óssea no septo interradicular (Figura 2c-h). Aos 30 dias o infiltrado inflamatório se restringia a alguns focos isolados no tecido conjuntivo denso, constituído de grande quantidade de fibras colágenas e poucos fibroblastos. O septo interradicular se mostrou constituído, em parte, por osso neoformado, cuja superfície se apresentou recoberta por osteoblastos em franca atividade de síntese de matriz óssea (Figura 3b-d).

No Grupo SRP-MB/TTC, aos 7 dias pós-tratamento, a extensão do processo inflamatório, composto principalmente por polimorfonucleares neutrófilos, foi menor que aquele observado no Grupo SRP-SS. O tecido conjuntivo adjacente ao septo interradicular exibiu uma moderada quantidade de fibroblastos e fibras colágenas, muitos vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias (Figura 1b). A área de PO alveolar se mostrou menor que aquela apresentada pelo Grupo SRP-SS ($p<0,001$). Aos 15 dias pós-tratamento, houve uma redução mais acentuada do processo inflamatório e nítida organização do tecido conjuntivo, embora a PO não tenha apresentado diferença estatística com os grupos SRP-SS e SRP-MB. Aos 30 dias pós-tratamento foram observados focos de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo denso das imediações do septo interradicular. O osso do septo interradicular se mostrou constituído por trabéculas compostas, em parte, por osso neoformado.

3.2. Análise histométrica

Aos 7 dias pós-tratamento, com exceção do SRP-MB, todos os grupos de tratamentos adjuvantes à SRP apresentaram menor área de PO quando comparados com o grupo SRP-SS ($p<0,05$). Neste mesmo período experimental, o Grupo SRP-TTC mostrou menor área de PO quando comparado com o Grupo SRP-MB/TTC ($p<0,05$) (Tabela 1). Aos 15 dias pós-tratamento, apenas os grupos SRP-TTC, SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT e SRP-TTC/aPDT exibiram menor área de PO quando comparados com o Grupo SRP-SS ($p<0,05$). Também pôde ser observado que os grupos SRP-TTC e SRP-TTC/LLLT apresentaram menor área de PO quando comparados com o Grupo SRP-MB/TTC ($p<0,05$). Os animais dos grupos SRP-TTC e SRP-TTC/aPDT exibiram menor área de PO quando comparados com os animais dos grupos SRP-MB e SRP-aPDT ($p<0,05$) (Tabela 1). Aos 30 dias pós-tratamento, todos os

grupos de tratamento adjuvantes à SRP exibiram menor área de PO quando comparados com o Grupo SRP-SS ($p<0,05$). (Tabela 1).

Na comparação entre os períodos no mesmo grupo, apenas o Grupo SRP-MB aos 15 e 30 dias pós-tratamento apresentou redução na PO na região de furca quando comparado com 7 dias pós-tratamento ($p<0,001$) (Tabela 1).

3.3. Análise imunoistoquímica

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de RANKL, OPG e TRAP mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação imunoistoquímica. As imunomarcações se apresentaram com coloração acastanhada, confinadas ao compartimento citosólico das células imunorreativas.

As células TRAP-positivas estavam situadas predominantemente na superfície do osso do septo interradicular, se mostrando com três ou mais núcleos e nas proximidades de lacunas de reabsorção. Em todos os grupos experimentais a maior quantidade de células imunomarcadas com TRAP foi detectada aos 7 dias pós-tratamento, especialmente no Grupo SRP-MB. Aos 15 e 30 dias pós-tratamento houve diminuição gradual na quantidade de células TRAP-positivas em todos os grupos, exceto no Grupo SRP-SS, onde esta se manteve constante em todos os intervalos de tempo (Figura 4). A menor imunomarkação para TRAP ocorreu no Grupo SRP-TTC.

A RANKL e OPG foram detectadas predominantemente em osteoblastos e fibroblastos. Nos grupos SRP-SS, SRP-MB e SRP-MB/TTC a imunomarkação para RANKL e OPG foi maior aos 7 dias pós-tratamento e 30 dias pós-tratamento, respectivamente, enquanto que nos grupos SRP-TTC, SRP-aPDT, SRP-TTC/LLLT e SRP-TTC/aPDT, houve

uma forte tendência a uma diminuição de RANKL, especificamente aos 7 e 15 dias pós-tratamento, e um aumento de OPG aos 15 e 30 dias pós-tratamento (Figura 5).

4. Discussão

Este estudo realizou uma avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica do efeito do TTC e da aPDT, usados isoladamente ou em associação, como adjuvantes à SRP no tratamento de DP experimental induzida em ratos.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os animais do Grupo SRP-TTC exibiram menor inflamação local e redução na área de PO ($p < 0,001$) quando comparados com os animais do Grupo SRP-SS, em todos os períodos experimentais estudados, corroborando com os resultados obtidos por Fernandes et al. (2010). O tratamento com TTC promoveu alteração tanto na imunomarcagem de moléculas que regulam o metabolismo ósseo local, RANKL e OPG, quanto na quantidade de osteoclastos ativos. A RANKL atua em pré-osteoclastos e osteoclastos, via receptor ativador nuclear fator kappa β (RANK), e desencadeia aumento na osteoclastogênese, ativação de osteoclastos maduros e inibição da apoptose em osteoclastos ativos. (Lacey et al. 1998, Yasuda et al. 1998, Fuller et al. 1998). A OPG é capaz de interagir com RANKL, impedindo sua interação com RANK em pré-osteoclastos e osteoclastos, diminuindo a atividade reabsortiva desempenhada por estas células (Lacey et al. 1998, Yasuda et al. 1998, Fuller et al. 1998). Tem sido relatado que a severidade da DP está estreitamente relacionada a um aumento local na razão entre RANKL/OPG (Liu et al. 2002, Crotti et al. 2003, Garlet et al. 2006]. Os resultados do presente estudo demonstram que no Grupo SRP-TTC houve uma antecipação na diminuição da imunomarcagem para RANKL e um aumento na imunomarcagem de OPG, aos 7 e 15 dias pós-tratamento, respectivamente, desencadeando menor reabsorção óssea. Tais dados

corroboram com a menor área de PO ($p<0,001$) constatada na análise histométrica e com a menor quantidade de osteoclastos TRAP imunorreativos observados na região de furca em comparação com o Grupo SRP-SS.

A diminuição na reabsorção óssea nos animais tratados pelo TTC pode ser explicada não só por sua propriedade antimicrobiana (Rodrigues et al 2004), mas também por sua capacidade de exercer alguns efeitos modulatórios sobre a resposta do hospedeiro. Estudos têm mostrado que o TTC é capaz de suprimir a atividade de leucócitos polimorfonucleares (Gabler & Creamer 1991) e inibir a atividade de algumas metaloproteinases da matriz extracelular (Rawal & Rawal 2001). Algumas metaloproteinases, as quais podem ser produzidas por neutrófilos em um infiltrado inflamatório, promovem a destruição dos tecidos via degradação de peptídeos associados à membrana plasmática e proteínas da matriz extracelular, tais como o colágeno (Preshaw et al. 2004). Além disso, tais enzimas também são capazes de potencializar a atividade reabsortiva osteoclástica (Preshaw et al. 2004). Conseqüentemente, a modulação da atividade de certas metaloproteinases interfere significativamente na destruição de tecidos moles e na perda de osso alveolar na DP (Preshaw et al. 2004). Outros estudos têm mostrado que a TTC ainda é capaz de inibir a atividade osteoclástica e estimular a síntese de matriz óssea nos osteoblastos (Rawal & Rawal 2001), bem como aumentar a adesão de fibroblastos à estrutura dental (Terranova et al. 1986).

Os animais tratados com aPDT também mostraram redução da inflamação e área de PO quando comparados aos animais tratados somente com SRP, em todos os períodos experimentais estudados ($p<0,001$). Estes resultados corroboram com os de estudos prévios que relataram a efetividade da aPDT no tratamento da DP, utilizando-se como FS o MB (Almeida et al. 2007, Almeida et al. 2008).

Os efeitos benéficos da aPDT como terapia adjunta ao tratamento mecânico da DP é mais provavelmente explicado pela atividade antimicrobiana, resultado da reação fotoquímica

mediada pelo agente FS (Garcia et al. 2012). Foi demonstrado que a fotossensibilização, letal aos microorganismos, é mediada pelo oxigênio singlete e radicais livres, promovendo danos irreversíveis a moléculas intracelulares essenciais tais como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Maisch 2007). Adicionalmente, a aPDT é capaz de agir sobre os diversos fatores de virulência das bactérias gram-negativas, tais como as enzimas proteolíticas de *P. gingivalis*, as quais exercem importante papel na patogênese da periodontite (Kömerik et al. 2000, Packer et al.2000).

Há relatos na literatura que estudaram o efeito antimicrobiano do MB sobre bactérias periodontopatogênicas, no entanto, os resultados se mostram controversos. No presente estudo, os animais tratados somente com MB não apresentaram redução da inflamação e área de PO alveolar quando comparados aos animais tratados somente pela SRP, aos 7 e 15 dias pós-tratamento. Houve similaridade na quantidade de osteoclastos TRAP-positivos nos grupos SRP-SS e SRP-MB, o que justificaria essa semelhança na área de PO. Estes resultados podem ser explicados por estudo *in vitro* onde o uso isolado do MB não apresentou efeito letal significativo sobre bactérias periodontopatogênicas Chan & Lai (2003). Em um estudo clínico e microbiológico em humanos o uso do MB se mostrou eficaz na redução de microorganismos periodontopatogênicos, contudo não promoveu alterações nos índices de sangramento à sondagem e na profundidade de bolsa periodontal Wilson et al. 1992.

Além da atividade antimicrobiana, outra provável explicação para o efeito benéfico da aPDT está no efeito bioestimulador do LLLT (Almeida-Lopes et al. 2001). Os eventos celulares e moleculares responsáveis pela ação do laser no tecido ósseo ainda não estão totalmente elucidados. Uma das explicações é a ação LLLT na regulação da expressão gênica de moléculas que regulam os metabolismo ósseo, especialmente nos osteoblastos (Xu et al. 2009). No presente estudo, pôde-se observar uma antecipação na diminuição na

imunomarcção de RANKL e no aumento na imunomarcção de OPG e uma diminuição na quantidade de osteoclastos TRAP imunorreativos observados na região de furca nos animais tratados por aPDT quando comparados com aqueles tratados somente pela SRP. Estes resultados estão de acordo com estudo que reportou um aumento no mRNA para OPG e uma redução no mRNA para RANKL em osteoblastos tratados com LLLT, concluindo que a alteração na razão RANKL:OPG indiretamente ocasionaria a inibição da diferenciação e ativação dos osteoclastos (Xu et al. 2009).

Em estudos prévios, animais tratados localmente pela associação do LLLT à SRP mostraram redução da PO quando comparados com animais tratados somente pela terapia mecânica convencional (Almeida et al. 2008, Garcia et al. 2011, Garcia et al. 2012). Levando-se em consideração os resultados destes estudos, o presente estudo também objetivou verificar se a associação da LLLT com o TTC, como terapia adjuvante a SRP, traria benefícios adicionais no tratamento da DP. Além disso, existem evidências do efeito FS das tetraciclinas na produção de oxigênio singlete (Miskoski et al. 1998), sugerindo que o TTC poderia ser utilizado na realização da aPDT (Rajesh et al. 2011). Neste estudo, o Grupo SRP-TTC/LLLT não apresentou redução da PO alveolar quando comparado ao Grupo SRP-TTC em todos os períodos experimentais estudados, demonstrando que a combinação TTC/LLLT não mostrou benefício adicional em relação ao uso isolado de cada terapia. Este resultado poderia ser explicado pelo trabalho de Miskoski et al. (1998) que, ao avaliarem a foto-oxidação da molécula de TTC, observaram que esta reação é acompanhada por perda parcial do seu poder antimicrobiano. Vale salientar que o laser utilizado no estudo de Miskoski et al. (1998) foi o Nd:YAG, o mesmo utilizado no estudo de Noguchi et al. (2005), os quais observaram que a irradiação com laser após a aplicação tópica de minociclina em bolsas periodontais levou à diminuição das bactérias periodontopatogênicas, profundidade de sondagem e perda de inserção clínica quando comparado à irradiação com laser isoladamente. As discrepâncias de

resultados e ausência de estudos destinados à avaliação da foto-oxidação da TTC pela ação do laser em baixa intensidade tornam importante a realização de novos estudos para se determinar os verdadeiros efeitos desta luz sobre a molécula de TTC e os efeitos antimicrobianos dos seus subprodutos.

A combinação TTC/aPDT adjuvante à RAR no tratamento da DP foi sugerida como uma opção terapêutica na tentativa de se produzir efeito sinérgico das suas propriedades antimicrobianas, aliando a capacidade de substantividade do TTC à capacidade de não causar seleção de cepas bacterianas resistentes da aPDT. Ainda, não há relatos na literatura avaliando essa associação no tratamento da DP. Neste estudo, o Grupo SRP-TTC/aPDT apresentou PO reduzida em relação ao Grupo SRP-SS ($p<0,001$), e similar aos grupos SRP-TTC, SRP-TTC/LLLT e SRP-aPDT, aos 7 e 30 dias pós-tratamento. Portanto, a associação do TTC à aPDT não resultou em nenhum efeito adicional na redução da PO alveolar. Uma hipótese para explicar estes resultados poderia ser a redução do efeito do TTC pela sua diluição ao MB (solução com 50% de TTC e 50% de MB). A diminuição do efeito do TTC na combinação MB/TTC pôde ser evidenciada pela menor área de PO no Grupo SRP-TTC quando comparado ao Grupo SRP-MB/TTC aos 7 e 15 dias pós-tratamento ($p<0,05$). No Grupo SRP-TTC/aPDT o volume de TTC e MB foi reduzido para a metade do aplicado nos grupos SRP-MB, SRP-TTC e SRP-aPDT, o que poderia influenciar o resultado do tratamento avaliado. Talvez, se o protocolo de aplicação da droga fosse baseado na utilização de uma terapia seguida da outra para posterior irradiação com LLLT, melhores resultados poderiam ter sido encontrados. Somente aos 15 dias pós-tratamento, o Grupo SRP-TTC/aPDT apresentou PO reduzida em relação aos grupos SRP-SS e SRP-aPDT ($p<0,05$), e similar aos grupos SRP-TTC e TTC/LLLT. Esses resultados podem ser explicados pela manutenção da atividade antimicrobiana pelo TTC na bolsa periodontal, dado por sua propriedade de substantividade, que pode variar em torno de 15 dias (Stabholz et al. 1993).

Melhores resultados aos 15 dias pós-tratamento também foram observados nos animais tratados com TTC quando comparados aos animais tratados com aPDT. Neste período, o Grupo SRP-TTC apresentou menor área de PO quando comparado ao Grupo SRP-aPDT ($p<0,001$). Aos 7 e 30 dias pós-tratamento, ambas as terapias não apresentaram diferenças significativas em relação à área de PO na região de furca. Stabholz et al. (1998), ao estudar o efeito do TTC sobre o tratamento de DP, verificou melhora significativa dos resultados clínicos em função do tempo e efeito antimicrobiano contínuo, os quais eram dependentes da substantividade e da concentração da droga. Outra provável explicação para esses resultados pode ser a atuação do LLLT e aPDT como agentes adjuvantes bioestimuladores predominantemente nos primeiros estágios da cicatrização. Sugere-se que diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento pode não ter sido encontrada aos 30 dias pós-tratamento devido às terapias terem se equiparado com o tempo, uma vez que seus efeitos são relatados nos períodos iniciais de cicatrização.

O uso de agentes antimicrobianos como adjuvantes ao tratamento periodontal é assunto contraditório. Primeiro, porque a ocorrência de resistência bacteriana ao antimicrobiano poderia se tornar um problema com o uso frequente de antibióticos. Segundo, porque os antibióticos de amplo espectro têm capacidade de modificar a microbiota da cavidade oral e trato gastrointestinal, permitindo o desenvolvimento de patógenos oportunistas (Wilson 1994). O uso da aPDT em DP induzida com envolvimento de furca mostra algumas vantagens sobre o uso de antimicrobianos, tais como não promover seleção de cepas bacterianas resistentes e levar a poucos efeitos colaterais (Wilson 1994). Contudo, não há relatos na literatura da comparação dos seus efeitos sobre o tratamento da DP.

Os resultados do presente estudo mostram que tanto o TTC como a aPDT têm potencial para serem usados como terapia adjuvante à SRP no tratamento da DP. Embora o

TTC tenha apresentado melhores resultados aos 15 dias pós-tratamento, ambas terapias se equiparam com o tempo, uma vez que seus efeitos são relatados em períodos iniciais de cicatrização. Assim, cabe ao cirurgião dentista conhecer todas as vantagens e desvantagens de cada técnica para poder fazer a escolha adequada à situação de seu paciente. Fatores intrínsecos tais como hipersensibilidade dentinária ou reações alérgicas ao FS/antimicrobiano, devem ser considerados na escolha da terapia a ser aplicada. Vale salientar que, o uso das tetraciclina em adjunto à SRP deve ser considerado cuidadosamente, e restrito a pacientes que não responderam ao tratamento mecânico convencional e apresentam áreas de bolsas periodontais recorrentes ou DP agressiva (Etienne 2003, Rodrigues et al. 2004). Os resultados do presente estudo demonstrou que em casos onde o uso de TTC não é indicado o uso da aPDT pode ser considerado com uma alternativa terapêutica no tratamento da DP.

A literatura apresenta muitos resultados controversos tanto no uso da aPDT quando do TTC. Os estudos disponíveis atualmente apresentam uma série de limitações que dificultam a comparação entre si. O tipo e concentração do FS, tempo de permanência do FS na bolsa periodontal previamente à irradiação, laser utilizado, comprimento de onda, potência e tempo de irradiação têm variado entre os trabalhos que avaliam a efetividade da aPDT. A concentração das drogas e tempo de exposição radicular, também poderia interferir na efetividade do TTC (Pavia et al 2003). Assim, futuros trabalhos são necessários para padronizar a forma de aplicação que atinja melhor efetividade tanto para o TTC quanto para a aPDT, que guiarão o clínico na escolha do melhor tratamento.

Assim, dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que tanto o TTC quanto a aPDT, usados isoladamente ou combinados, em adjunto à SRP foram efetivos no tratamento da DP experimental induzida em ratos. Contudo, a combinação TTC/aPDT não promoveu benefício adicional em relação ao uso isolado de cada terapia.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de bolsa de mestrado (Processo nº 2010/12570-8) à pós-graduanda Paula Lazilha Faleiros e auxílio regular à pesquisa (Processo nº 2011/00143-0) ao prof. Alvaro Francisco Bosco, que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa. Ao prof. Edilson Ervolino, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela assistência prestada na análise histológica e imunoistoquímica e à profª. Maria Lucia M. M. Sundefeld, pela assessoria na análise estatística.

Referências

- Adriaens, P. A., De Boever, J. A. & Loesche, W. J. (1988) Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontology* **59**, 222-230.
- Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Oshiiwa, M. & Garcia V.G. (2007) Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontology* **78**, 566-575.
- Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Oshiiwa, M. & Garcia, V. G. (2008) In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *Journal of Periodontology* **79**, 1081-1088.
- Almeida, J. M., Theodoro, L.H., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Bonfante, S. & Garcia, V. G. (2008) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *Journal of Periodontology* **79**, 2156-2165
- Almeida-Lopes, L., Rigau, J., Zângaro, R. A., Guidugli-Neto, J. & Jaeger, M. M. (2001) Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers in Surgery and Medicine* **29**, 179-184.
- Aoki, A., Sasaki, K. M., Watanabe, H. & Ishikawa, I. (2004) Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontology 2000* **36**, 59-97.
- Baker, P. J., Evans, R. T., Coburn, R. A. & Genco, R. J. (1983) Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. *Journal of Periodontology* **54**, 580-585.

- Chan, Y. & Lai, C. H. (2003) Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science* **18**, 51-55.
- Christersson, L. A., Norderyd, O. M. & Puchalsky, C. S. (1993) Topical application of tetracycline-HCl in human periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **20**, 88-95.
- Crotti, T., Smith, M. D., Hirsch, R., Soukoulis, S., Weedon, H., Capone, M., Ahern, M. J. & Haynes, D. (2003) Receptor activator NF kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **38**, 380-387.
- Dai, T., Huang, Y. Y. & Hamblin, M. R. (2009) Photodynamic therapy for localized infections-state of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **6**, 170-188.
- Etienne, D. (2003) Locally delivered antimicrobials for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Diseases* **9**, 45-50.
- Faria, P. E., Okamoto, R., Bonilha-Neto, R. M., Xavier, S. P., Santos, A. C. & Salata, L. A. (2008) Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clinical Oral Implants Research* **19**, 393-401
- Fernandes, L. A., Martins, T. M., Almeida, J. M., Nagata, M. J., Theodoro, L. H., Garcia, V. G. & Bosco, A. F. (2010) Experimental periodontal disease treatment by subgingival irrigation with tetracycline hydrochloride in rats. *Journal of Applied Oral Science* **18**, 635-640.
- Fuller, K., Wong, B., Fox, S., Choi, Y. & Chambers, T. J. (1998) TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *The Journal of Experimental Medicine* **188**, 997-1001.

Gabler, W. L. & Creamer, H. R. (1991) Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines. *Journal of Periodontal Research* **26**, 52-58.

Garcia, V. G., Fernandes, L. A., Macarini, V. C., de Almeida, J. M., Martins, T. M., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Cirelli, J. A. & Theodoro, L. H. (2011) Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 1106-1114.

Garcia, V. G., Gualberto Júnior, E. C., Fernandes, L. A., Bosco, A. F., Hitomi Nagata, M. J., Casatti, C. A., Ervolino, E. & Theodoro, L. H. (2012) Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in ovariectomized rats. *Journal of Periodontology* doi: 10.1902/jop.2012.120163

Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Silva, T. A., Ferreira, B. R., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q. & Silva, J. S. (2006) Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiology and Immunology* **21**, 12–20.

Golub, L. M., Ramamurthy, N., McNamara, T. F., Gomes, B., Wolff, M., Casino, A., Kapoor, A., Zambon, J., Ciancio, S., Schneir, M., et al. (1984) Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* **19**, 651-655.

Hamblin, M. R. & Hasan, T. (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemistry & Photobiology Sciences* **3**, 436-450.

Hamblin, M. R. (2012) Antimicrobial photodynamic therapy and photodynamic inactivation, or killing bugs with dyes and light--a symposium-in-print. *Photochemistry and Photobiology* **88**, 496-498.

- Johnson, I. H. (1975) Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research* **10**, 332-345.
- Kömerik, N., Wilson, M & Poole, S. (2000) The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochemistry and Photobiology* **72**, 676-680.
- Krishna, M. K., Ravindran, S. K., Vivekanandan, G., Navasivayam, A., Thiagarajan, R. & Mohan, R. (2011) Effects of a single episode of subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine: A clinical and microbiological study. *Journal of Indian Society of Periodontology* **15**, 245-249.
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., Boyle, W. J. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165-176.
- Liu, D., Xu, J. K., Figliomeni, L., Pavlos, N. J., Rogers, M., Tan, A., Price, P. & Zheng, M. H. (2002) Expression of RANKL and OPGmRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *International Journal of Molecular Medicine* **11**, 17-22.
- Maisch, T. (2007) Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers in Medical Science* **22**, 83-91.
- Miskoski, S., Sánchez, E., Garavano, M., López, M., Soltermann, A. T. & Garcia, N. A. (1998) Singlet molecular oxygen-mediated photo-oxidation of tetracyclines: kinetics, mechanism and microbiological implications. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* **15**, 164-171.

- Noguchi, T., Sanaoka, A., Fukuda, M., Suzuki, S. & Aoki, T. (2005) Combined effects of Nd:YAG laser irradiation with local antibiotic application into periodontal pockets. *Journal of the International Academy of Periodontology* **7**, 8-15.
- Noiri, Y. & Ebisu, S. (2000) Identification of periodontal disease-associated bacteria in the "plaque-free zone". *Journal of Periodontology* **71**, 1319-1326.
- Ochsner, M. (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* **39**, 1-18.
- Packer, S., Bhatti, M., Burns, T. & Wilson, M. (2000) Inactivation of proteolytic enzymes from *Porphyromonas gingivalis* using light-activated agents. *Lasers in Medical Science* **15**, 24-30.
- Pavia, M., Nobile, C. G. & Angelillo, I. F. (2003) Meta-analysis of local tetracycline in treating chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **74**, 916-932.
- Prates, R. A., Yamada, A. M., Suzuki, L. C., França, C. M., Cai, S., Mayer, M. P., Ribeiro, A. C. & Ribeiro, M. S. (2011) Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photomedicine and Laser Surgery* **29**, 835-844.
- Preshaw, P. M., Hefti, A. F., Jepsen, S., Etienne, D., Walker, C. & Bradshaw, M. H. (2004) Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 697-707.
- Rajesh, S., Koshi, E., Philip, K. & Mohan, A. (2011) Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *Journal of Indian Society of Periodontology* **15**, 323-327.

- Rawal, S.Y. & Rawal, Y. B. (2001) Non-antimicrobial properties of tetracyclines--dental and medical implications. *The West Indian Medical Journal* **50**, 105-108.
- Rodrigues, R. M., Gonçalves, C., Souto, R., Feres-Filho, E.J., Uzeda, M. & Colombo, A.P. (2004) Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracyclinetherapy. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 420-427.
- Stabholz, A., Kettering, J., Aprecio, R., Zimmerman, G., Baker, P. J. & Wikesjö, U. M. (1993) Antimicrobial properties of human dentin impregnated with tetracycline HCl or chlorhexidine. An in vitro study. *Journal of Clinical Periodontology* **20**, 557-562.
- Stabholz, A., Nicholas, A. A., Zimmerman, G. J. & Wikesjö, U. M. (1998) Clinical and antimicrobial effects of a single episode of subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine in deep periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 794-800.
- Takasaki, A. A., Aoki, A., Mizutani, K., Schwarz, F., Sculean, A., Wang, C. Y., Koshy, G., Romanos, G., Ishikawa, I. & Izumi, Y. (2009) Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontology 2000* **51**, 109-140.
- Teles, R. P., Haffajee, A. D., Socransky, S. S. (2006) Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontology 2000* **42**, 180-218.
- Terranova, V. P., Franzetti, L. C., Hic, S., DiFlorio, R. M., Lyall, R. M., Wikesjö, U. M., Baker, P. J., Christersson, L. A. & Genco, R. J. (1986) A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *Journal of Periodontal Research* **21**, 330-337.
- Umeda, M., Takeuchi, Y., Noguchi, K., Huang, Y., Koshy, G. & Ishikawa, I. (2004) Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontology 2000* **36**, 98-120.

Walker, C. B., Gordon, J. M., McQuilkin, S. J., Niebloom, T. A. & Socransky, S. S. (1981) Tetracycline: levels of achievable in gingival crevice fluid and in vitro effect on subgingival organisms. Part II. Susceptibilities of periodontal bacteria. *Journal of Periodontology* **52**, 613-616.

Wikesjö, U. M., Baker, P. J., Christersson, L. A., Genco, R. J., Lyall, R. M., Hic, S., DiFlorio, R. M. & Terranova, V. P. (1986) A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *Journal Periodontal Research* **21**, 322-329.

Wilson, M. (1994) Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *International Dental Journal* **44**, 181-189.

Wilson, M., Gibson, M., Strahan, D. & Harvey, W. (1992) A preliminary evaluation of the use of a redox agent in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **27**, 522-527.

Xu, M., Deng, T., Mo, F., Deng, B., Lam, W., Deng, P., Zhang, X. & Liu, S. (2009) Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. *Photomedicine and Laser Surgery* **27**, 309-315.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Suda, T. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3597-3602.

Tabela



Tabela: Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) dos dados histométricos da área de perda óssea (PO, mm^2) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo com doença periodontal experimental induzida, nas interações entre Grupos e Períodos.

Tratamentos	Períodos			
	N	7 dias	15 dias	30 dias
SRP-SS	24	$2,5220 \pm 0,3854$	$1,7667 \pm 0,4889$	$2,0600 \pm 0,6314$
SRP-MB	24	$2,4600 \pm 0,6658$	$1,3640 \pm 0,5011^{\&}$	$1,1550 \pm 0,8036^{*\&}$
SRP-TTC	24	$0,7443 \pm 0,2421^{*\dagger\dagger}$	$0,3550 \pm 0,2479^{*\dagger\dagger\$}$	$0,7386 \pm 0,3074^*$
SRP-MB/TTC	24	$1,2800 \pm 0,3943^{*\dagger}$	$1,3850 \pm 0,3862$	$1,0300 \pm 0,2729^*$
SRP-aPDT	24	$0,9167 \pm 0,6227^{*\dagger}$	$1,0425 \pm 0,4475^*$	$1,0350 \pm 0,5458^*$
SRP-TTC/LLLT	24	$1,1888 \pm 0,5813^{*\dagger}$	$0,7371 \pm 0,3584^{*\dagger}$	$0,7343 \pm 0,3173^*$
SRP-TTC/aPDT	24	$0,8371 \pm 0,4785^{*\dagger}$	$0,4913 \pm 0,1980^{*\dagger\$}$	$0,7371 \pm 0,2049^*$
N	168	56	56	56

Comparação intergrupos no mesmo período:

* Diferença significativa com o Grupo SRP-SS. ANOVA e teste t de Student ($p < 0,05$).

† Diferença significativa com o Grupo SRP-MB. ANOVA e teste t de Student ($p < 0,05$).

‡ Diferença significativa com o Grupo SRP-MB/TTC. ANOVA e teste t de Student ($p < 0,05$).

§ Diferença significativa com o Grupo SRP-aPDT. ANOVA e teste t de Student ($p < 0,05$).

Comparação entre os períodos no mesmo grupo:

& Diferença significativa com 7 dias pós-tratamento. ANOVA e teste t de Student ($p < 0,001$).

Figuras



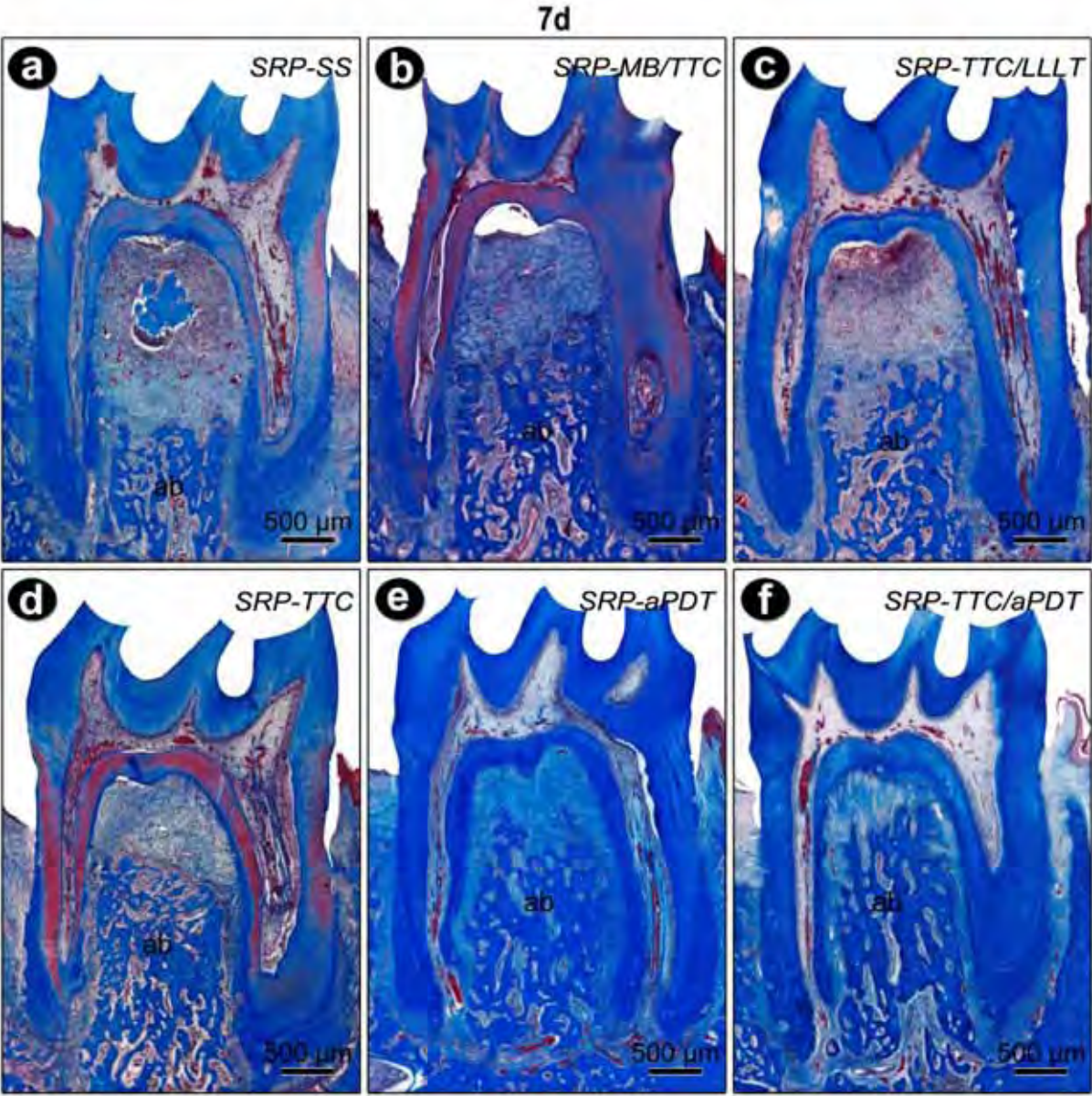
Figura 1. Fotomicrografias da região de furca do primeiro molar inferior com DP induzida, aos 7 dias pós-tratamento. Magnitude da PO alveolar nos grupos SRP-SS **(a)**, SRP-MB/TTC **(b)**, SRP-TTC/LLLT **(c)**, SRP-TTC **(d)**, SRP-aPDT **(e)** e SRP-TTC/aPDT **(f)**. Abreviações: ab, osso alveolar (coloração TM; aumento original = 40x e barra de escala: **a-f** = 500 µm).

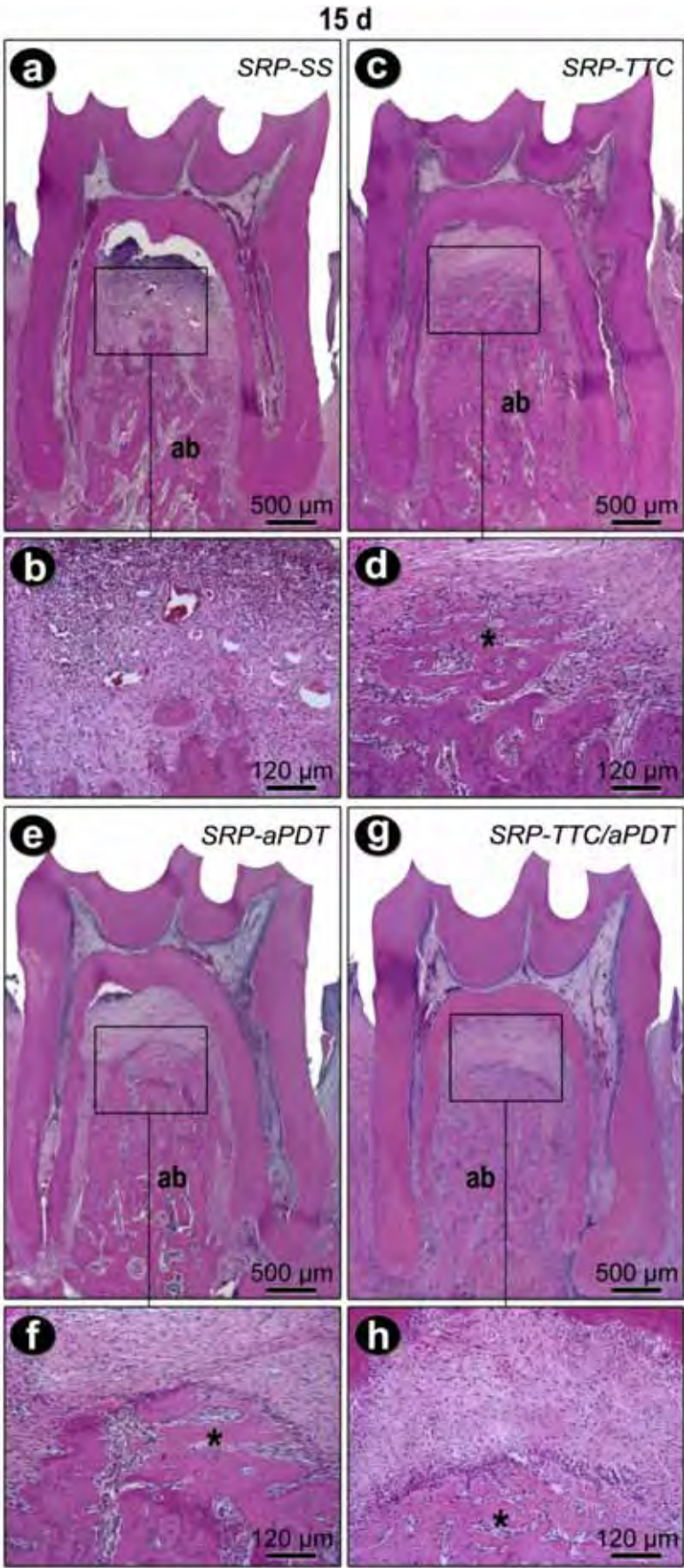
Figura 2. Fotomicrografias da região de furca do primeiro molar inferior com DP induzida, aos 15 dias pós-tratamento. Magnitude da PO alveolar e aspectos histopatológicos apresentadas pelo tecido conjuntivo e ósseo nos grupos SRP-SS **(a-b)**, SRP-TTC **(c-d)**, SRP-aPDT **(e-f)** e SRP-TTC/aPDT **(g-h)**, aos 15 dias pós-tratamento. Abreviações e símbolos: ab, osso alveolar; *, áreas de osso neoformado (coloração H&E; em **a, c, e e g**, aumento original = 40x e barra de escala = 500 µm; em **b, d, f e h**, aumento original = 160x e barra de escala = 120 µm).

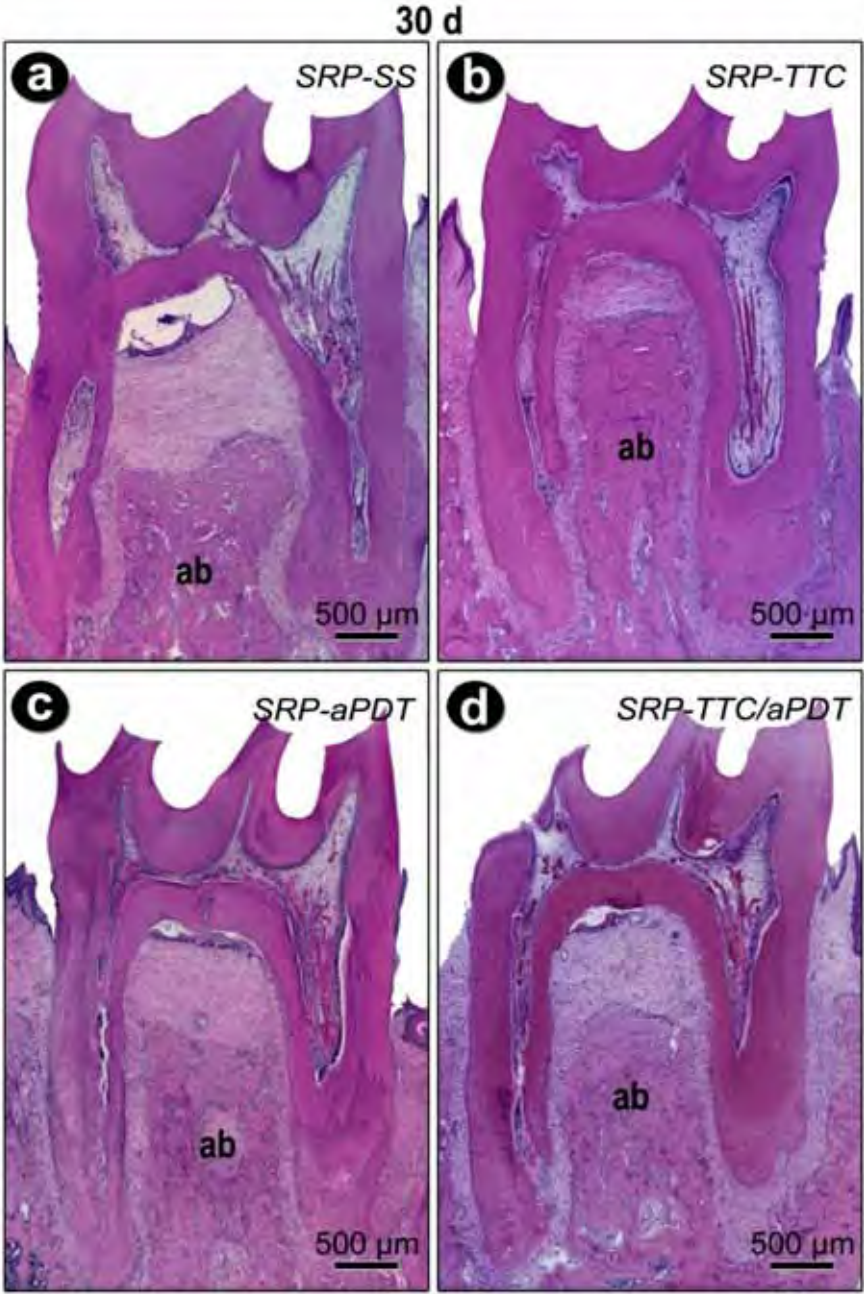
Figura 3. Fotomicrografias de cortes longitudinais da região de furca do primeiro molar inferior com DP induzida, aos 30 dias pós-tratamento. Magnitude da PO alveolar nos grupos SRP-SS **(a)**, SRP-TTC **(b)**, SRP-aPDT **(c)**, SRP-TTC/aPDT **(d)**. Abreviações: ab, osso alveolar (coloração H&E; aumento original = 40x e barra de escala: **a-d** = 500 µm).

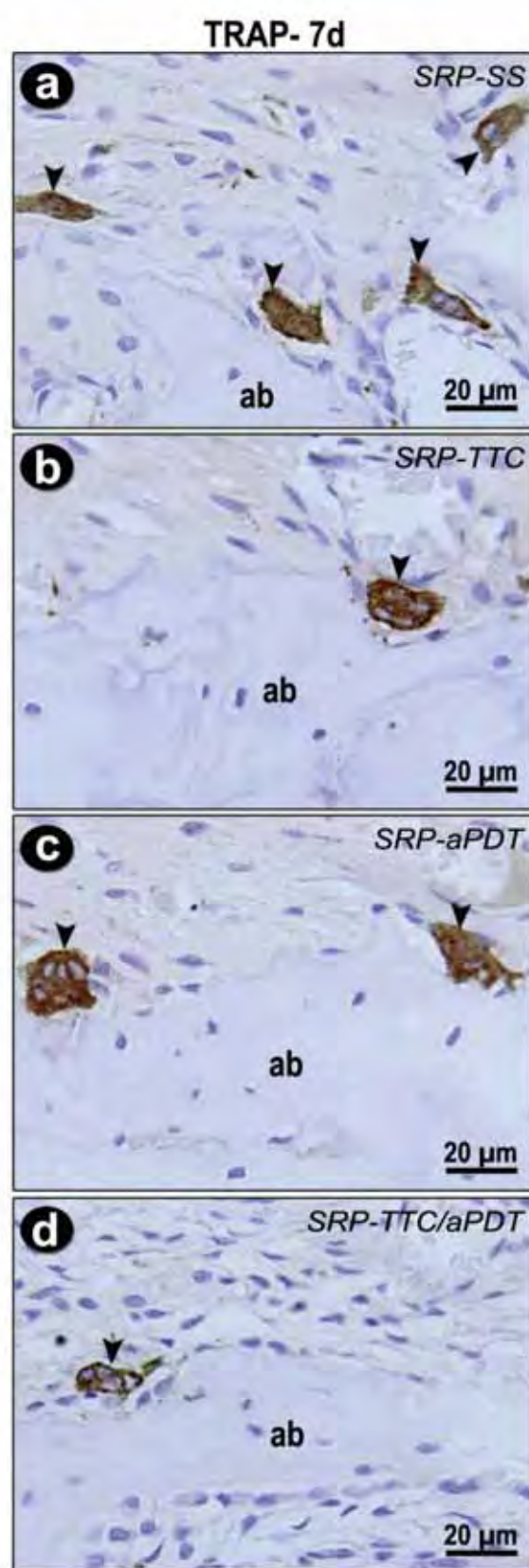
Figura 4. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão da TRAP na região de furca do primeiro molar inferior com DP induzida, aos 7 dias pós-tratamento. Osteoclastos TRAP imunorreativos (cabeças de seta pretas) nos grupos SRP-SS **(a)**, SRP-TTC **(b)**, SRP-aPDT **(c)** e SRP-TTC/aPDT **(d)**. Abreviações: ab, osso alveolar (aumento original = 1000x e barra de escala = 20 µm).

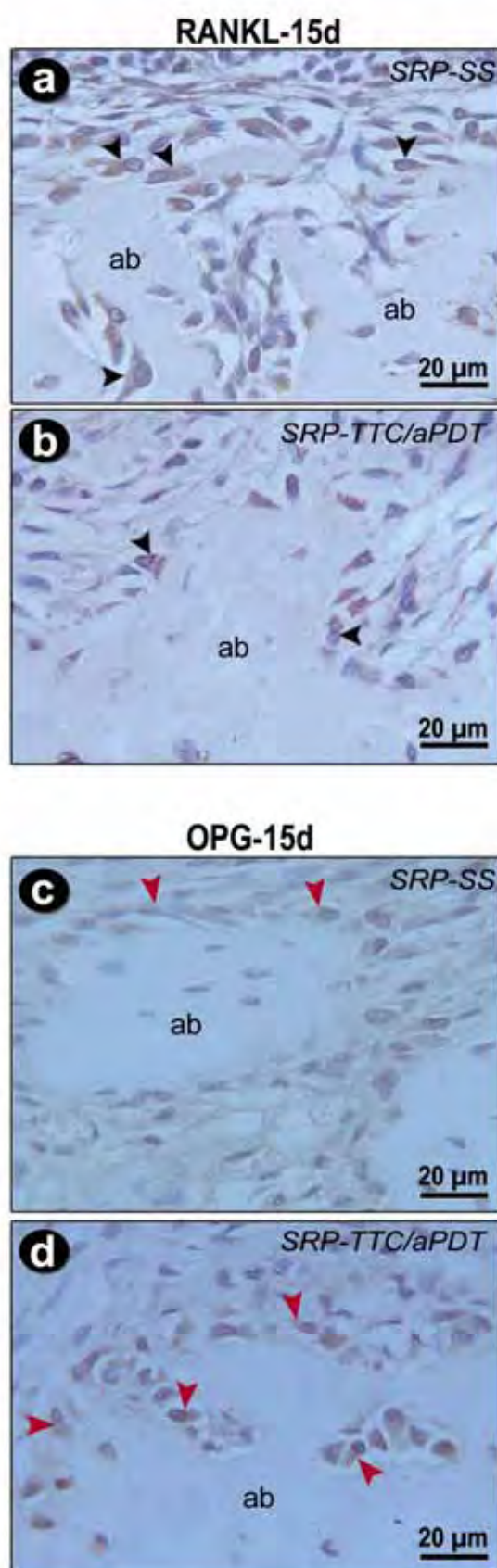
Figura 5. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão do RANKL e da OPG na região de furca do primeiro molar inferior com DP induzida, aos 15 dias pós-tratamento. Células RANKL imunorreativas (cabeças de seta pretas) e OPG imunorreativas nos grupos SRP-SS **(a;c)** e SRP-TTC/aPDT **(b;d)**. Abreviações: ab, osso alveolar (aumento original = 1000x e barra de escala = 20 µm).











Anexo A



*Certificado da Comissão de Ética na
Experimentação Animal (CEEAA)*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"INFLUÊNCIA DO HIDROCLORETO DE TRETACICLINA ASSOCIADO À TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA: ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO EM RATOS"** sob responsabilidade do **Prof. Dr. Álvaro Francisco Bosco** e colaboração de **Paula Lazilha Faleiros** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA número de protocolo número 002451-2010.

Araçatuba, 31 de Março de 2010

Prof.ª Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636- 1350 Fax (18) 3636- 1352 E-mail: dapoa@fomva.unesp.br



Anexo B

Normas para publicação do Periódico
"Journal of Clinical Periodontology"

Journal of Clinical Periodontology

The official publication of the European Federation of Periodontology

Edited by: Maurizio Tonetti Editor Emeritus: Jan Lindhe

Print ISSN: 0303-6979

Online ISSN: 1600-051X

Frequency: Monthly

Current Volume: 39 / 2012

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2010: Dentistry, Oral Surgery & Medicine: 1 / 74

Impact Factor: 2.996

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Manuscript Submission Procedure](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#)

Relevant Documents: [Sample Manuscript](#), [Copyright Transfer Agreement](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles published in Journal of Clinical Periodontology](#), [Author Services](#), [Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

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

1. GENERAL

Journal of Clinical Periodontology publishes original contributions of high scientific merit in the fields of periodontology and implant dentistry. Its scope encompasses the physiology and pathology of the periodontium, the tissue integration of dental implants, the biology and the modulation of periodontal and alveolar bone healing and regeneration, diagnosis, epidemiology, prevention and therapy of periodontal disease, the clinical aspects of tooth replacement with dental implants, and the comprehensive rehabilitation of the periodontal patient. Review articles by experts on new developments in basic and applied periodontal science and associated dental disciplines, advances in periodontal or implant techniques and procedures, and case reports which illustrate important new information are also welcome.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Journal of Clinical Periodontology*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell's Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Clinical Periodontology adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

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

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

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

Please note that it is a requirement to include email addresses for all co-authors at submission. If any of the email-addresses supplied are incorrect the corresponding author will be contacted by the journal administrator.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

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

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. [A CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material.

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

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest and Sources of Funding

Authors are required to disclose all sources of institutional, private and corporate financial support for their study. Suppliers of materials (for free or at a discount from current rates) should be named in the source of funding and their location (town, state/county, country) included. Other suppliers will be identified in the text. If no funding has been available other than that of the author's institution, this should be specified upon submission. Authors are also required to disclose any potential conflict of interest. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee,) or provision of study materials by their manufacturer for free or at a discount from current rates. Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) and the sources of funding for the research will be published under a separate heading entitled "Conflict of Interest and Sources of Funding Statement". See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's [Editorial on Conflict of Interest and Sources of Funding](#) and www.icmje.org/#conflicts for generally accepted definitions.

2.6 Appeal of Decision

Under exception circumstances, authors may appeal the editorial decision. Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by e-mailing the editorial office at cpeedoffice@wiley.com with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.7 Permissions

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

2.8 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Wiley-Blackwell if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the exclusive licence to publish their paper to Wiley-Blackwell. Assignment of the exclusive licence is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless licence has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form

still has to be signed). A completed [Copyright Transfer Agreement](#) (CTA) must be sent to the Editorial Office before any manuscript can be published. Authors must send the completed CTA upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the CTA at submission.

The CTA should be sent to:

Journal of Clinical Periodontology Editorial Office
Wiley-Blackwell
John Wiley & Sons Ltd
9600 Garsington Road
Oxford
OX4 2DQ
UK

Or by email to: cpeedoffice@wiley.com

For questions concerning copyright, please visit [Wiley-Blackwell's Copyright FAQ](#).

2.9 OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see

http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Journal Admin, Rosie Ledger, at cpeedoffice@wiley.com.

3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>

- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.

- If you are registering as a new user.
- After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
- Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
- Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will automatically send you your user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Corresponding Author Center'.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Corresponding Author Center', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
- Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
- Upload your manuscript main document complete with title page, statement concerning source(s) of funding and conflict(s) of interest, abstract, clinical relevance section, references, tables and figure legends as "main document". Upload figures as 'figures'. For clinical trials a Consort Checklist will be required, and it should be uploaded as "supplementary file for review". If any unpublished papers are referenced in the reference list, a digital version of the referenced paper should also be uploaded as "supplementary file for review".
- Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
- When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format). Notice that all documents uploaded as supplementary files for review will not be viewable in the HTML and PDF format. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, clinical reference, main text, references, acknowledgement, statement of source of funding and any potential conflict of interest, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference any figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Journal of Clinical Periodontology* will be reviewed by two or more experts in the field. Papers that do not conform to the general aims and scope of the journal will, however, be returned immediately without review. *Journal of Clinical Periodontology* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suggest a Reviewer

Journal of Clinical Periodontology attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the name and current email address of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the editor will choose one or two reviewers as well.

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

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

3.7. E-mail Confirmation of Submission

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

3.8. Manuscript Status

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

3.9. Submission of Revised Manuscripts

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

3.10 Resubmissions

If your manuscript was given the decision of reject and resubmit, you might choose to submit an amended version of your manuscript. This should be submitted as a new submission following the guidelines above under 3.2. In addition you should upload comments to the previous review as "supplementary files for review".

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Journal of Clinical Periodontology publishes original research articles, reviews, clinical innovation reports and case reports. The latter will be published only if they provide new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician. It is expected that any manuscript submitted represents unpublished original research.

Original Research Articles must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

Clinical Innovation Reports are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

Case Reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/englishlanguage.asp>. Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: *Journal of Clinical Periodontology* adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used.

5.2. Structure

All articles submitted to *Journal of Clinical Periodontology* should include Title Page, Abstract, and References. In addition, *Journal of Clinical Periodontology* requires that all articles include a section

on Clinical Relevance and disclose Source of Funding and Conflict of Interests. Figures, Figure Legends and Tables should be included where appropriate. All manuscripts should emphasize clarity and brevity. Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and be clearly explained where its use is unavoidable.

Title Page: The title must be concise and contain no more than 100 characters including spaces. The title page should include a running title of no more than 40 characters; 5-10 key words, complete names of institutions for each author, and the name, address, telephone number, fax number and e-mail address for the corresponding author.

Conflict of Interest and Source of Funding: Authors are required to disclose all sources of institutional, private and corporate financial support for their study. Suppliers of materials (for free or at a discount from current rates) should be named in the source of funding and their location (town, state/county, country) included. Other suppliers will be identified in the text. If no funding has been available other than that of the author's institution, this should be specified upon submission. Authors are also required to disclose any potential conflict of interest. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee,) or provision of study materials by their manufacturer for free or at a discount from current rates. Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) and the sources of funding for the research will be published under a separate heading entitled "Conflict of Interest and Source of Funding Statement". See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's [Editorial on Conflict of Interest and Source of Funding](#) and www.icmje.org/#conflicts for generally accepted definitions.

Abstract: is limited to 200 words in length and should not contain abbreviations or references. The abstract should be organized according to the content of the paper. For Original Research Articles the abstract should be organized with aim, materials and methods, results and conclusions. For clinical trials, it is encouraged that the abstract finish with the clinical trial registration number on a free public database such as clinicaltrials.gov.

Clinical Relevance: This section is aimed at giving clinicians a reading light to put the present research in perspective. It should be no more than 100 words and should not be a repetition of the abstract. It should provide a clear and concise explanation of the rationale for the study, of what was known before and of how the present results advance knowledge of this field. If appropriate, it may also contain suggestions for clinical practice. It should be structured with the following headings: scientific rationale for study, principal findings, and practical implications. Authors should pay particular attention to this text as it will be published in a highlighted box within their manuscript; ideally, reading this section should leave clinicians wishing to learn more about the topic and encourage them to read the full article.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

5.3. Original Research Articles

These must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

The word limit for original research articles is 3500 words, and up to 7 items (figures and tables) may be included. Additional items can be included as supplementary files online (please see 5.9 below).

Main Text of Original Research Articles should be organized with Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Please see Sample Manuscript.

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation.

Material and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves.

(a) Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material. If your study is a randomized clinical trial, you will need to fill in all sections of the CONSORT Checklist. If your study is not a randomized trial, not all sections of the checklist might apply to your manuscript, in which case you simply fill in N/A.

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

(c) (b) Statistical Analysis: As papers frequently provide insufficient detail as to the performed statistical analyses, please describe with adequate detail. For clinical trials intention to treat analyses are encouraged (the reasons for choosing other types of analysis should be highlighted in the submission letter and clarified in the manuscript).

(d) (c) DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations: Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(e) (d) Experimental Subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

(f) When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable.

Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations.

Discussion: may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The discussion section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

The discussion may usefully be structured with the following points in mind (modified from the proposal by [Richard Horton \(2002\), The Hidden Research Paper, The Journal of the American Medical Association, 287, 2775-2778](#)). Not all points will apply to all studies and its use is optional, but we believe it will improve the discussion section to keep these points in mind.

Summary of key finding

- * Primary outcome measure(s)
- * Secondary outcome measure(s)
- * Results as they relate to a prior hypothesis

Strengths and Limitations of the Study

- * Study Question
- * Study Design
- * Data Collection
- * Analysis
- * Interpretation
- * Possible effects of bias on outcomes

Interpretation and Implications in the Context of the Totality of Evidence

- * Is there a systematic review to refer to?
- * If not, could one be reasonably done here and now?
- * What this study adds to the available evidence
- * Effects on patient care and health policy
- * Possible mechanisms

Controversies Raised by This Study Future Research Directions

- * For this particular research collaboration
- * Underlying mechanisms
- * Clinical research

5.4. Clinical Innovation Reports

These are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

The word limit for clinical innovation reports is 3000 words, and up to 12 items (figures and tables) may be included. Additional items can be included as supplementary files online (please see 5.9 below).

The main text of Clinical Innovation Reports should be organized with Introduction, Clinical Innovation Report, Discussion and Conclusion.

5.5. Case Reports

Case reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

The main text of Case Reports should be organized with Introduction, Case report, Discussion and Conclusion.

5.6. Reviews

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

The word limit for reviews is 4000 words.

The main text of Reviews should be organized with Introduction, Review of Current Literature, Discussion and Conclusion.

5.7. References

It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Please note that all unpublished papers (submitted or in press) included in the reference list should be provided in a digital version at submission. The unpublished paper should be uploaded as a supplementary file for review.

Reference style (Harvard):

References in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Brown & Smith 1966). Three or more authors should always be referred to as, for example, Brown et al. 1966. A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors, (1975), p. 36. London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by first author's surname.

b) The order of the items in each reference should be:

(i) for journal references: name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.

(ii) for book references: name(s) of author(s), year, chapter title, title of book in italics, edition, volume, page number(s), town of publication, publisher.

c) Authors' names should be arranged thus: Smith, A. B., Jones, D. E. & Robinson, F. C. Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Authors' names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1967).

e) The title of the paper should be included without quotation marks.

f) The journal title should be written in full, italicised (single underlining in typescript), and followed by volume number in bold type (double underlining on typescript) and page numbers.

Examples: Botticelli, D., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2004) Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *Journal of Clinical Periodontology* 10, 820-828. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00565.x

Lindhe, J., Lang, N.P. & Karring, K. (2003) *Periodontology and Implant Dentistry*. 4th edition, p. 1014, Oxford. Blackwell Munksgaard.

Bodansky, O. (1960) Enzymes in tumour growth with special reference to serum enzymes in cancer. In *Enzymes in Health and Disease*, eds. Greenberg, D. & Harper, H. A., pp. 269-278. Springfield: Thomas.

URL: Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text. Example: Smith A. (1999) Select Committee Report into Social Care in the Community [WWW document]. URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report0394498.html> [accessed on 7 November 2003]

5.8. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title.

Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Each copy should be marked with the figure number and the corresponding author's name. Reduction to the scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible.

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum

acceptable printed size. Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by thin spaces (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

Preparation of Electronic Figures for Publication

Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Detailed information on our digital illustration standards can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

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

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

Figure Legends: should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods.

5.9. Supplementary Material

Supplementary material, such as data sets or additional figures or tables that will not be published in the print edition of the Journal but which will be viewable in the online edition, can be uploaded as. Supporting information for review and online publication only. Please see <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp> for further information on the submission of Supplementary Materials.

6. AFTER ACCEPTANCE

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

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the

following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

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

6.3 Production Tracking

Online production tracking is available for your article once it is accepted by registering with [Wiley-Blackwell's Author Services](#).

6.4 Accepted Articles

'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only (without the accompanying full-text HTML) and are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked. The DOI remains unique to a given article in perpetuity. More information about DOIs can be found online at <http://www.doi.org/faq.html>. Given that Accepted Articles are not considered to be final, please note that changes will be made to an article after Accepted Article online publication, which may lead to differences between this version and the Version of Record. The Accepted Articles service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance. Given that copyright licensing is a condition of publication, a completed copyright form is required before a manuscript can be processed as an Accepted Article.

Accepted articles will be indexed by PubMed; therefore the submitting author must carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript, as it will not be possible to alter these once a paper is made available online in Accepted Article format. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear either as Early View articles in a matter of weeks or in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

7 ONLINEOPEN

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon

publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpenTerms>

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.