



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

YARA LOYANNE DE ALMEIDA SILVA LEVI

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO *Bifidobacterium animalis*
subsp. lactis HN019 NA PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL
EM RATOS SUBMETIDOS A QUIMIOTERAPIA**

Presidente Prudente - SP
2019



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

YARA LOYANNE DE ALMEIDA SILVA LEVI

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO *Bifidobacterium animalis*
subsp. lactis HN019 NA PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL
EM RATOS SUBMETIDOS A QUIMIOTERAPIA**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de concentração: Ciências da Saúde: Odontologia.

Orientadora:
Profa. Dra. Luciana Prado Maia Andraus

Presidente Prudente - SP
2019

D61
L664e

Levi, Yara Loyanne de Almeida Silva.
Efeitos da administração de probiótico
Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 na
progressão da periodontite experimental em ratos
submetidos a quimioterapia / Yara Loyanne de Almeida
Silva Levi. -- Presidente Prudente, 2019.
59 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2019.

Orientadora: Luciana Prado Maia

1. *Bifidobacterium animalis*. 2. Neoplasias. 3.
Probióticos. 4. Periodontite. 5. Quimioterapia. I. Título.

YARA LOYANNE DE ALMEIDA SILVA LEVI

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO *Bifidobacterium animalis*
subsp. lactis HN019 NA PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL
EM RATOS SUBMETIDOS A QUIMIOTERAPIA**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia - Área de concentração: Ciências da Saúde: Odontologia.

Presidente Prudente, 27 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciana Prado Maia
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Carolina dos Santos Santinoni
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Priscila Paganini Costa
Universidade Estadual de Londrina – UEL
Londrina - PR

DEDICATÓRIA

A Deus,

Sou grata ao verdadeiro Autor de tudo pela vida que me concedeste, pelas pessoas que fazem parte dela e acima de tudo sou grata por me permitir chegar até aqui.

*“Seja forte e corajoso!
Não se apavore, nem se desanime,
pois o Senhor, o seu Deus, estará com você
por onde você andar”.*
(Josué 1:9)

Aos meus pais Gessenilda e Ivan,

Faltam-me palavras para agradecer tudo que fizeram e o que fazem por mim, vocês foram a melhor escola que Deus me matriculou, foram meus primeiros professores, que me ensinaram tudo sobre a vida. Agradeço a vocês por nunca deixarem de acreditar em mim e por muitas vezes desistirem dos sonhos de vocês para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada por todos os sacrifícios feitos com muito amor. Serei eternamente grata a vocês por tudo o que sempre fizeram por mim. Dedico todas as minhas conquistas a vocês, porque elas são suas também. Muito obrigada!

O meu amor e gratidão por vocês é imensurável...

Aos meus avós Genilda (in memoriam) e João,

Agradeço a minha avó por ter me ensinado a lutar pelos meus sonhos e a não desistir deles no primeiro obstáculo, obrigada por todo carinho e amor que sempre dedicou a mim e a minha irmã. Hoje eu sei que a senhora é meu anjo da guarda. E ao meu avô por me amparar nas dificuldades, por sempre ter uma piada cearense

para alegrar os meus dias e acima de tudo obrigada por sempre estar presente nos momentos bons e ruins da minha vida. Muito obrigada por tudo!

Amo muito vocês!

Aos meus avós Josefa e Azor,

Não tenho palavras para descrever a importância de vocês em minha vida. Parte dessa conquista é de vocês dois também, vocês sabem o quanto me ajudaram e o quanto essa ajuda foi importante para mim. Sempre tive da minha avó a maior força e do meu avô a maior paciência. Sinto amor e gratidão imensos por vocês. Muito obrigada por tudo!

Amo muito vocês!

À minha orientadora Professora Luciana Maia,

Minha gratidão pela oportunidade de realizar este trabalho, por tanta eficiência e paciência para me guiar nessa jornada. Agradeço por toda a sua disponibilidade e flexibilidade para sanar dúvidas a todo momento, e por todos os ensinamentos que permitiram a conclusão deste trabalho. Saiba que você é uma referência de vida para mim. A admiração que tenho por você é enorme.

*“Você que reconhece o professor de verdade,
eu conheço o mestre da verdade
que todo discípulo sonha acompanhar,
ouvir, conhecer, aprender e amar.”*

(Carlos Estrela)

AGRADECIMENTOS

À minha irmã *Maria Eduarda*, agradeço pela verdadeira amizade, que supera até mesmo momentos de discórdia, sempre demonstrando que o laço que temos é o maior de todos: o de sermos irmãs.

*“Ser irmão é ser o quê?
Uma presença a decifrar mais tarde, com saudade?
Com saudade de quê?
De uma pueril vontade de ser irmão futuro, antigo e sempre?”*
(Carlos Drummond de Andrade)

Ao meu namorado *Gustavo*, obrigada por ser essa pessoa maravilhosa, por se fazer presente mesmo estando distante fisicamente. Obrigada por estar sempre disposto a me ouvir, aconselhar e a dizer que vai ficar tudo bem. Eu tenho muito orgulho do homem que você se tornou. Te amo!

À minha prima *Tallyre*, por todos os momentos compartilhados mesmo com as nossas rotinas muitas vezes turbulentas. Obrigada pela amizade e cumplicidade de sempre! Amo você.

Aos meus tios *Graça, Lourdes, Greísy e Marcelo*, obrigada por todo incentivo, apoio e cuidado que sempre tiveram comigo e principalmente nestes últimos anos.

Agradeço também as professoras que colaboraram com o projeto e com a minha orientação:

Professora Carolina Santinoni, excelente profissional e com grande humanidade. Obrigada por toda ajuda, todos os ensinamentos e por toda atenção não só ao trabalho, mas a mim também.

Professora Fabiana Straioto, obrigada por todo o incentivo, palavras de consolo, experiências compartilhadas no laboratório e também pela imensa dedicação ao nosso projeto.

Admiro muito vocês!

Aos professores do mestrado em Odontologia da UNOESTE:

Juliane Marsicano, Rosana Prado, Graziela Mori, Eliane Pízi, Douglas Monteiro, Anderson Catelan e Graziela Galhano, obrigada por todos os conhecimentos transmitidos, por todos ensinamentos passados com ética e competência.

*“Se eu vi mais longe,
foi por estar sobre ombros de gigantes.”
(Isaac Newton)*

Agradeço aos colegas da turma do mestrado:

Taynara, Sheyla, Fátima, Vítor e Éder, obrigada pela troca de experiências, pelo convívio, pelas alegrias e incertezas compartilhadas. Obrigada por todos os momentos.

Agradeço em especial a *Nathália, Bianca e Andressa*, pelos dias no laboratório compartilhando dúvidas, desesperos, anseios e também muita alegria e cumplicidade. Sei que agora nossa amizade ficará distante, mas continuará sendo real. Amo vocês!

Às alunas da graduação:

Luana, Lívia e Jéssica, obrigada por todos os momentos de trabalho e por toda ajuda em todas etapas deste projeto. A ajuda de vocês foi indispensável para a conclusão do trabalho.

A todos os funcionários da UNOESTE:

Em especial à *Talita, Mariana, Alexandre, Edvaldo, Maria e Andréia*, obrigada por toda atenção e disponibilidade, vocês tornaram estes anos mais fáceis.

E ao *Bruno*, obrigada por toda ajuda com as impressões, com os agendamentos e com todos os detalhes do projeto. Você tornou a caminhada até aqui mais amena.

À *Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE*, por toda infraestrutura fornecida e pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

RESUMO

Efeitos da administração de probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 na progressão da periodontite experimental em ratos submetidos a quimioterapia

O quimioterápico aumenta a severidade da periodontite e compromete o resultado do tratamento periodontal. Os probióticos surgiram como alternativa para o tratamento de patologias, podendo modular a resposta imune do hospedeiro e modificar o ambiente bacteriano. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da administração do probiótico (PROB) *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 na progressão da periodontite experimental (EP) em ratos submetidos a quimioterapia (5-fluorouracil – 5-FU). Foram utilizados 80 ratos machos, divididos nos seguintes grupos: controle (C); tratamento somente com 5-FU (5FU) (60 mg/kg no dia da indução da EP e 40 mg/kg 48hs após); tratamento somente com PROB (HN019) (diariamente por 44 dias, iniciando 30 antes da indução da EP); tratamento com 5-FU e PROB (5FU-HN019); somente EP (ligadura nos primeiros molares inferiores, mantida por 14 dias); EP e tratamento com 5-FU (EP-5FU); EP e tratamento com PROB (EP-HN019); e EP e tratamento com 5-FU e PROB (EP-5FU-HN019). Todos os animais foram eutanasiados 44 dias após o início do experimento e as hemi-mandíbulas foram processadas para as análises histomorfométrica, microtomográfica e imunohistoquímica. As análises revelaram maior perda de tecido ósseo e conjuntivo no grupo EP-5FU em relação ao grupo EP-5FU-HN019. E a análise imunohistoquímica mostrou diminuição na imunomarcagem para TRAP e RANKL e aumento para OPG no grupo EP-5FU-HN019, quando comparado ao grupo EP-5FU. O PROB HN019 promoveu efeito protetor contra a perda óssea e de inserção conjuntiva decorrentes da periodontite experimental em animais imunossuprimidos.

Palavras-chave: Antineoplásicos, *Bifidobacterium animalis*, Neoplasias, Periodontite, Probióticos.

ABSTRACT

Effects of probiotic administration *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 in the progression of experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy

Chemotherapy increases the severity of periodontitis and compromises the outcome of periodontal treatment. Probiotics have emerged as an alternative for the treatment of pathologies, modulating the immune response of the host and modifying the bacterial environment. The objective of the present study was to evaluate the effects of probiotic administration (PROB) *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 in the progression of experimental periodontitis (EP) in rats submitted to chemotherapy (5-fluorouracil-5-FU). Eighty male rats were divided into the following groups: control (C); treatment with 5-FU alone (5FU) (60 mg / kg on the day of EP induction and 40 mg / kg 48h after); treatment with PROB alone (HN019) (daily for 44 days, starting 30 before induction of EP); treatment with 5-FU and PROB (5FU-HN019); only EP (ligation in the lower first molars, maintained for 14 days); EP and treatment with 5-FU (EP-5FU); EP and treatment with PROB (EP-HN019); and EP and treatment with 5-FU and PROB (EP-5FU-HN019). All animals were euthanized 44 days after the beginning of the experiment and the hemi-mandibles were processed for histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical analysis. The analyzes revealed greater loss of bone and connective tissue in the EP-5FU group compared to the EP-5FU-HN019 group. And the immunohistochemical analysis showed a decrease in immunoblotting for TRAP and RANKL and increase for OPG in the EP-5FU-HN019 group, when compared to the group EP-5FU. PROB HN019 promoted a protective effect against bone loss and conjunctive insertion resulting from experimental periodontitis in immunosuppressed animals.

Keywords: Antineoplastic Agents, *Bifidobacterium animalis*, Neoplasms, Periodontitis, Probiotics.

LISTA DE SIGLAS

μm	– Micrômetro
5-FU	– 5-fluorouracil
<i>B. lactis</i>	– <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>
CEUA	– Comitê de ética em Pesquisa em Animais
COA	– Crista Óssea Alveolar
DP	– Doença Periodontal
EDTA	– Ácido Etilenodiamínio Tetra-acético
EP	– Periodontite Experimental
g	– Gramas
H&E	– Hematoxilina e Eosina
IL	– Interleucina
JCE	– Junção Cimento-esmalte
Kappa	– Coeficiente de Correlação Intraclasse
kg	– Kilograma
Micro-CT	– Análise Microtomográfica
ml	– Mililitro
mm	– Milímetros
PBS	– Tampão Fosfato Salino
PI	– Perda de Inserção
RAR	– Raspagem e Alisamento Radicular
UFC	– Unidades Formadoras de Colônia
VO	– Volume Ósseo
VOI	– Volume de Interesse

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotomicrografia da área interproximal entre primeiro (FM) e segundo molares (SM) inferiores dos grupos C (A), HN019 (B), 5FU (C) e 5FU-HN019 (D), EP (E), EP-HN019 (F), EP-5FU (G) e EP-5FU-HN019 (H). Gráfico da perda de inserção nos grupos EP, EP-HN019, EP-5FU e EP-5FU-HN019. As barras indicam a média \pm desvio padrão das distâncias entre JCE e AE (mm). JCE = junção cimento-esmalte; AE = adesão epitelial. AB = crista óssea. Coloração com H&E..... 22
- Figura 2 - Gráfico contendo a média e desvio padrão do percentual de Volume Ósseo (VO), com comparações intergrupos. Letras minúsculas diferentes (abcd) indicam diferença estatística significativa (ANOVA, Teste de Tukey, $p < 0,05$). Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das secções microtomográficas das hemi-mandíbulas direitas dos animais dos grupos C (A, E), 5FU (B, F), HN019 (C, G), 5FU-HN019 (D, H), EP (I, M), EP-HN019 (J, N), EP-5FU (K, O) e EP-5FU-HN019 (L, P). Vista da superfície vestibular externa (A, B, C, D, I, J, K, L, M). Secção sagital da superfície interna (E, F, G, H, M, N, O, P). Tamanho do *pixel* = 7,96 μ 24
- Figura 3 - Média e desvio padrão da contagem de células que apresentaram imunorreatividade para TRAP. Letras minúsculas diferentes (abc) indicam diferença estatística significativa (ANOVA, Teste de Tukey, $p < 0,05$). Imagens representativas do padrão de imunomarcção para TRAP na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos dos animais. Fotomicrografias representativas dos grupos C (A), 5FU (B), HN019 (C), 5FU-HN019 (D), EP (E), EP-HN019 (F), EP-5FU (G) e EP-5FU-HN019 (H). ab = osso alveolar; setas = células imunomarcadas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris..... 26
- Figura 4 - Gráfico mostrando a distribuição dos escores (expressa em média e desvio padrão) em relação à imunomarcção para RANKL. Letras minúsculas diferentes (abc) indicam diferença estatística significativa (ANOVA, Teste de Tukey, $p < 0,05$). Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para RANKL na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos dos animais. Imagens representativas dos grupos C (A), 5FU (B), HN019 (C), 5FU-HN019 (D), EP (E), EP-HN019 (F), EP-5FU (G) e EP-5FU-HN019 (H). ab = osso alveolar. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris..... 27
- Figura 5 - Gráfico mostrando a distribuição dos escores (expressa em média e desvio padrão) em relação à imunomarcção para OPG. Letras minúsculas diferentes (abc) indicam diferença estatística significativa (ANOVA, Teste de Tukey, $p < 0,05$). Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para OPG na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos dos animais. Imagens representativas dos grupos C (A), 5FU (B), HN019 (C), 5FU-HN019 (D), EP (E), EP-HN019 (F), EP-5FU (G) e EP-5FU-HN019 (H). ab = osso alveolar. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris..... 28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3	RESULTADOS.....	20
4	DISCUSSÃO.....	29
5	CONCLUSÃO.....	32
	REFERÊNCIAS.....	32
	ANEXOS.....	43
	ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	39
	ANEXO B - NORMAS SUBMISSÃO - JOURNAL OF PERIODONTOLOGY..	40

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença ocasionada por uma mudança anormal na fisiologia celular, cujo número de sobreviventes continua a aumentar devido às melhorias na sua detecção e tratamento^{1,2}. A cavidade oral é o sub-local com maior prevalência de ocorrência dos cânceres de cabeça e pescoço³. As modalidades de tratamento mais comuns são: remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, utilizadas isoladamente ou em combinação⁴, sendo a quimioterapia comumente aplicada nos casos em que há metástases à distância¹. A quimioterapia evita a rápida divisão e/ou destrói as células malignas, porém não possui toxicidade seletiva em relação às células neoplásicas, agindo também em células normais^{5,6}. Com isso, pode causar alguns efeitos adversos na cavidade oral, como a mucosite, xerostomia, distúrbios no paladar^{1,5} e aumento da susceptibilidade do hospedeiro a infecções bacterianas, fúngicas e virais. Conseqüentemente, gera alterações na microbiota oral, podendo aumentar a quantidade de patógenos⁷. Estudos clínicos em humanos mostraram que a quimioterapia causa aumento no índice gengival, profundidade de sondagem e moderado aumento no índice de placa⁸, o que afeta a progressão das doenças periodontais (DP)^{7,9}.

Dentre os agentes quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer, o 5-fluorouracil (5-FU) é um antimetabólito análogo de pirimidina fluorado de uracila que compromete a síntese de DNA e RNA, amplamente utilizado no tratamento de tumores⁹⁻¹². Estudos em animais ajudaram a compreender os efeitos desse agente na progressão e no tratamento da DP, e constataram que o 5-FU piora a severidade da EP e compromete a resposta do hospedeiro quando submetido ao tratamento de raspagem e alisamento radicular (RAR)⁹. Além disso a literatura mostra que o 5-FU pode causar osteopenia devido à supressão de células formadores de tecido ósseo (osteoblastos) e recrutamento de células que promovem degradação do tecido ósseo (osteoclastos)¹².

O biofilme bacteriano é o fator etiológico primário para o início da inflamação gengival e subsequente destruição dos tecidos periodontais¹³. Entretanto, a presença

isolada do biofilme responde por uma pequena proporção de variações na expressão da DP¹⁴. De acordo com um novo modelo de patogênese, o principal componente da destruição de tecidos duros e moles na DP é o resultado da ativação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro às agressões bacterianas¹⁵. Fatores de risco adquiridos e ambientais, como diabetes mellitus e fumo, bem como algumas características geneticamente transmitidas, como por exemplo os polimorfismos gênicos para a interleucina (IL)-1, podem acentuar a resposta inflamatória decorrente da agressão bacteriana e, eventualmente, a suscetibilidade à DP¹⁵.

Durante a última década, a identificação de bactérias associadas à saúde e potencialmente benéficas que podem residir no sulco gengival e na cavidade oral tem sido tema de numerosos estudos focados na prevenção e tratamento de doenças¹⁶. Probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios a saúde quando consumidos em quantidades adequadas¹⁷⁻²⁴. Seu consumo pode modificar a microbiota bacteriana e modular a resposta imunológica²⁵. Probióticos podem favorecer a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema autoimune, atuando também no equilíbrio da microbiota intestinal, alívio da constipação, imunomodulação, prevenção do câncer de cólon, prevenção de eczemas atópicos, atividade supressiva contra patógenos gastrintestinais, prevenção de patologias do trato urogenital feminino, desordens intestinais, entre outros, levando a um aumento da resistência contra a infecção²⁶. Esses microrganismos se constituem em fonte de compostos bioativos que apresentam promissores efeitos benéficos no metabolismo ósseo e muscular²⁷. Sua colonização no trato gastrintestinal por meio da competição por sítios de adesão restabelece a microbiota intestinal após danos quimioterápicos²⁸.

Até o presente momento, estudos que investigaram os efeitos dos probióticos sobre DP utilizaram principalmente microrganismos do gênero *Lactobacillus*²⁹⁻³². Contudo, outros potenciais probióticos merecem ser investigados. A *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (*B. lactis*) possui propriedades imunomodulatórias e antimicrobianas³³, geralmente está presente na microbiota intestinal, e apresenta um relacionamento simbiótico com o

hospedeiro³⁴. Alguns estudos demonstraram que a *B. Lactis* pode diminuir o crescimento de *Streptococcus mutans* sem causar efeitos adversos, contribuindo na prevenção da cárie dentária³⁵. Pode também inibir o crescimento de periodontopatógenos na cavidade oral³⁶, reduzir a quantidade de biofilme bacteriano nas superfícies dentárias, bem como o índice de placa e o índice gengival em indivíduos saudáveis³⁷, sendo considerada um probiótico promissor. Um estudo em animais demonstrou que a aplicação tópica da *B. Lactis* HN019 na EP promove efeito protetor contra perda óssea alveolar e perda de inserção do tecido conjuntivo, além de modular parâmetros imunoinflamatórios e microbiológicos³⁸. Outro estudo pré-clínico, verificou que a administração oral de 10 ml/dia contendo 10⁹ UFC de *B. lactis* HN019 reduziu a contagem de bactérias anaeróbias em amostras de biofilme e potencializou os efeitos da RAR³⁹.

Recentemente dois ensaios clínicos randomizados, controlados por placebo, reportaram melhoras nos parâmetros periodontais após administração de bactérias do gênero *Bifidobacterium animalis*^{32,40}. O primeiro investigou a administração de um iogurte suplementado com *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* DN-173010, comparados a um iogurte placebo, durante 4 semanas, seguido por um período de 5 dias com abstenção de higiene oral, sobre a gengivite. Os autores concluíram que o probiótico pode ter um efeito positivo no acúmulo de placa e nos parâmetros inflamatórios gengivais, tais como melhora no índice de placa e gengivite, sangramento à sondagem, diminuição do volume de fluido crevicular gengival e quantidade de IL-1 β ³². O segundo estudo avaliou o efeito de pastilhas contendo *B. lactis* HN019, administradas duas vezes ao dia, como adjuvante a RAR em pacientes com periodontite crônica generalizada e os autores concluíram que o *B. lactis* promove benefícios clínicos (redução na profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica), microbiológicos (redução de periodontopatógenos do complexo vermelho e laranja) e imunológicos (redução de citocinas pró-inflamatórias) adicionais no tratamento da periodontite crônica⁴⁰.

A literatura vem sugerindo o uso de probiótico como uma abordagem terapêutica para a mucosite intestinal. Em um projeto anterior, o nosso grupo de pesquisa observou que

a suplementação probiótica reduziu a inflamação decorrente da mucosite oral em ratos imunossuprimidos por quimioterápico (5-FU)⁴¹. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da administração do probiótico *B. lactis* HN019 na progressão da EP em ratos submetidos à quimioterapia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Modelo experimental

Este estudo foi iniciado e executado após a aprovação do Comitê de ética em Pesquisa em Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE (protocolo 3750 – em anexo), e seguiu os protocolos experimentais de acordo com as normas determinadas pelo comitê. Os autores seguiram as diretrizes do ARRIVE*.

O poder do teste foi calculado para determinar o tamanho da amostra. O tamanho da amostra foi determinado para fornecer 80% de poder para reconhecer diferenças significantes entre os grupos com um intervalo de confiança de 95% ($\alpha=0,05$), considerando as médias e desvios padrões do osso alveolar na área de furca (Volume Ósseo – VO) do estudo de Messora *et al*⁴². Uma amostra de oito animais por grupo foi requerida. Considerando o risco de perda animal, uma vez que alguns animais poderiam não desenvolver as características histológicas da doença periodontal, além da possibilidade de não suportarem a administração do quimioterápico e da anestesia, um total de dez animais por grupo foi usado.

Foram utilizados 80 ratos machos[†], pesando 170-250g, provenientes do Biotério do Campus II da UNOESTE. Os animais foram acomodados em gaiolas contendo de 3 a 4 animais cada sob as mesmas condições padronizadas de iluminação (ciclos de 12/12 horas claro-escuro), temperatura controlada de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, ração sólida selecionada e água *ad libitum* durante todo o período do experimento.

Os animais foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos experimentais (n=10): Grupo C (controle); Grupo 5FU (quimioterápico 5-FU); HN019 (probiótico HN019);

5FU-HN019; EP (periodontite experimental); EP-5FU; EP-HN019; EP-5FU-HN019. Todas as análises foram realizadas por um examinador calibrado e cego.

2.2 Administração do Probiótico

Os grupos HN019, EP-HN019, EP-5FU-HN019 e 5FU-HN019 receberam 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL do probiótico[‡] administrado oralmente através da sua adição na água. A suplementação probiótica foi administrada diariamente por 44 dias, iniciando 30 dias antes da indução da EP, para garantir o efeito preventivo dessa terapia, conforme descrito por Messora *et al.*²¹. Os animais dos grupos C, 5FU, EP e EP-5FU receberam água sem suplementação probiótica.

2.3 Indução da Periodontite Experimental (EP) com Ligadura

Nos grupos EP, EP-5FU, EP-HN019 e EP-5FU-HN019, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal, com solução de Cloridrato de Xilazina a 2%[§] e Cloridrato de Ketamina a 10%^{||}. Um fio de sutura seda 4-0[¶] foi colocado ao redor dos primeiros molares inferiores de cada animal, como descrito anteriormente por Messora *et al.*²¹.

2.4 Protocolo Quimioterápico

Nos grupos 5FU, 5FU-HN019, EP-5FU e EP-5FU-HN019, o tratamento com 5-FU[#] foi realizado conforme descrito por Theodoro *et al.*,⁷ consistindo de administração intraperitoneal de 60 mg/kg de 5-FU no dia da colocação da ligadura e 40 mg/kg 48 horas após esse procedimento.

2.5 Eutanásia e Processamento Tecidual

Os animais foram eutanasiados com uma dose de 150mg/kg de peso corpóreo de tiopental sódio^{**} no dia 44 do experimento²¹. As hemi-mandíbulas foram excisadas e fixadas em formaldeído 10% por 48 horas.

2.6 Análise Histológica e Histomorfométrica da Mandíbula

Após processamento laboratorial de rotina²¹ das mandíbulas esquerdas, três cortes representando a porção mais central da área interproximal entre primeiro e segundo molar de cada amostra foram selecionados e analisados sob microscopia de luz^{††}. Para a análise histomorfométrica, fotomicrografias foram capturadas por uma câmera digital conectada ao microscópio de luz. Medições padronizadas foram determinadas com o auxílio de um *software* de análise de imagens^{††} para análise da perda de inserção (PI) - medida pela distância linear entre a JCE e a adesão epitelial (AE) na distal do 1º molar.

2.7 Análise Microtomográfica (Micro-CT)

As hemi-mandíbulas direitas, não desmineralizadas, foram escaneadas por um sistema de micro-CT de feixe cônico^{§§}. O gerador de raios-x foi operado em um potencial de aceleração de 60 kV com uma corrente de feixe de 165 µA e um tempo de exposição de 650 ms por projeção. As imagens foram produzidas com um tamanho de voxel de 6x6x6 µm. As análises volumétricas foram realizadas com o *software* CT-Analyser®^{|||} na região de bifurcação do 1º molar inferior. O parâmetro analisado foi o Volume Ósseo (VO) que corresponde ao percentual do VOI preenchido com tecido ósseo³⁸. Reconstruções renderizadas das secções microtomográficas também foram obtidas para todos os grupos usando um *software* adequado (CT-Analyser).

2.8 Análise Imunohistoquímica

Três cortes histológicos de cada espécime foram submetidos à técnica da imunoperoxidase indireta para detecção de TRAP, OPG, RANKL. Para as reações imunohistoquímicas, foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-TRAP, gerado em coelho^{¶¶}, anti-OPG e anti-RANK-L, gerados em cabras^{¶¶}. Em seguida, foi utilizado o anticorpo secundário biotilado anti-IgG de cabra gerado em suíno^{¶¶}. As reações foram amplificadas pelo Complexo Estreptavidina - HRP®^{¶¶} e, para a revelação, foi utilizada a

Diaminobenzidina^{##} como cromógeno. Ao término das reações imunohistoquímicas, os cortes receberam a contra-coloração pela Hematoxilina de Harris.

Os cortes histológicos foram analisados sob iluminação de campo claro em microscópio óptico^{***} NIKON Labophot, Japan por investigador que desconhecia os grupos analisados. A imunomarcagem foi definida como um precipitado de coloração acastanhada nas células e/ou matriz extracelular. As marcações imunohistoquímicas foram analisadas semi-quantitativamente para os anticorpos primários OPG e RANKL, e quantitativamente para o anticorpo primário TRAP, no tecido ósseo e no ligamento periodontal, na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos, por meio de microscopia de campo claro, seguindo o modelo proposto do Messora et al.²⁵.

2.9 Análise Estatística

Todas as avaliações foram realizadas por examinadores calibrados. Para calibração dos examinadores um terço da amostra foi avaliada em dois períodos de tempo com um intervalo de 48 horas. O coeficiente de correlação intraclassa (Kappa) foi utilizado para determinar a reprodutibilidade dos examinadores nas duas avaliações realizadas. Valores de Kappa maiores que 0.55 foram considerados para assegurar a calibração dos examinadores.

Os dados foram submetidos a verificação de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, respectivamente pelo teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, para verificar as diferenças entre os grupos, considerando um delineamento inteiramente casualizado, foi realizada a análise de variância um fator. Os testes consideraram um nível de significância de 5% e foram realizados no *software* Prism 7.

3. RESULTADOS

Três animais do grupo EP-5FU-HN019 e um do grupo EP-5FU morreram antes do término do experimento, os demais animais toleraram bem os procedimentos experimentais.

3.1 Análise Histológica e Histomorfométrica da Mandíbula

Os tecidos periodontais na área interproximal entre primeiros e segundos molares eram saudáveis e não havia PI nos grupos C, 5FU, HN019 e 5FU-HN019. Os grupos EP, EP-HN019, EP-5FU e EP-5FU-HN019 apresentaram corpos estranhos na superfície do epitélio gengival, perda da papila interdental, migração apical do epitélio juncional, desorganização e rompimento das fibras de colágeno transeptal, presença de inflamação mononuclear de moderada a grave no tecido conjuntivo subepitelial e nas margens do ligamento periodontal, perda de cemento interdental e reabsorção do osso alveolar também foram observados. No geral, os grupos EP-5FU e EP-5FU-HN019 apresentaram mais sinais de inflamação severa e destruição tecidual que os demais grupos (Figura 1).

A Figura 1 mostra a análise histomorfométrica de PI, a qual revelou diferença estatística significativa apenas entre os grupos EP-HN019 e EP-5FU ($p < 0,05$), porém, numericamente foi possível observar menor perda tecidual no grupo EP-HN019 quando comparado ao grupo EP, e para o grupo EP-5FU-HN019 em relação ao grupo EP-5FU.

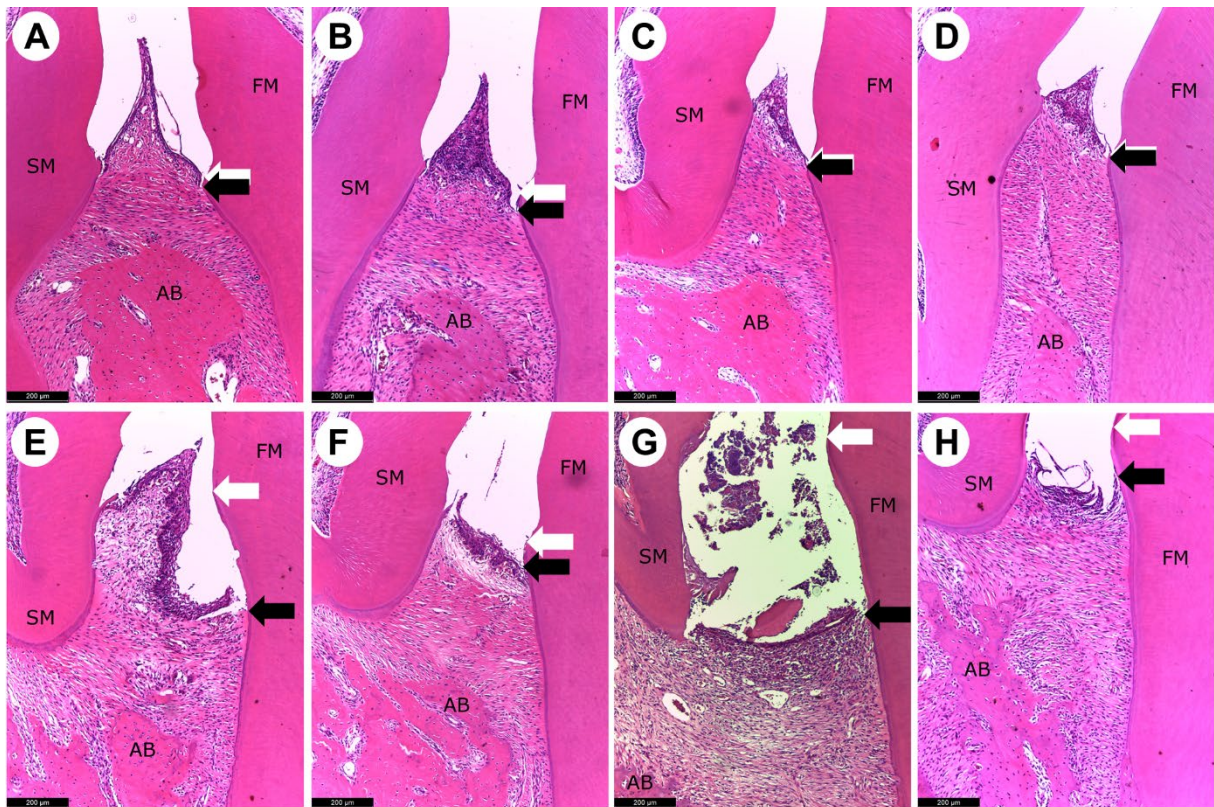


Figura 1. Fotomicrografia da área interproximal entre primeiro (FM) e segundo molares (SM) inferiores dos grupos C (A), HN019 (B), 5FU (C) e 5FU-HN019 (D), EP (E), EP-HN019 (F), EP-5FU (G) e EP-5FU-HN019 (H). Gráfico da perda de inserção nos grupos EP, EP-HN019, EP-5FU e EP-5FU-HN019. As barras indicam a média \pm desvio padrão das distâncias entre JCE e AE (mm). JCE = junção cimento-esmalte; AE = adesão epitelial. AB = crista óssea. Coloração com H&E.

3.2 Análise Microtomográfica (Micro-CT)

O grupo EP-5FU-HN019 apresentou valores significativamente maiores nos percentuais de VO quando comparado ao grupo EP-5FU ($p < 0,05$), sendo que este apresentou os menores percentuais quando comparado a todos os outros grupos experimentais (Figura 2). Foi observado também valores maiores para o grupo EP-HN019 quando comparado ao grupo EP ($p < 0,05$). Além disso, a análise de VO revelou percentuais estatisticamente semelhantes entre os grupos C, 5FU, HN019, 5FU-HN019 e EP-HN019 ($p < 0,05$).

Na Figura 2, podem ser observadas reconstruções tridimensionais renderizadas elaboradas a partir das secções microtomográficas representativas de cada grupo experimental.

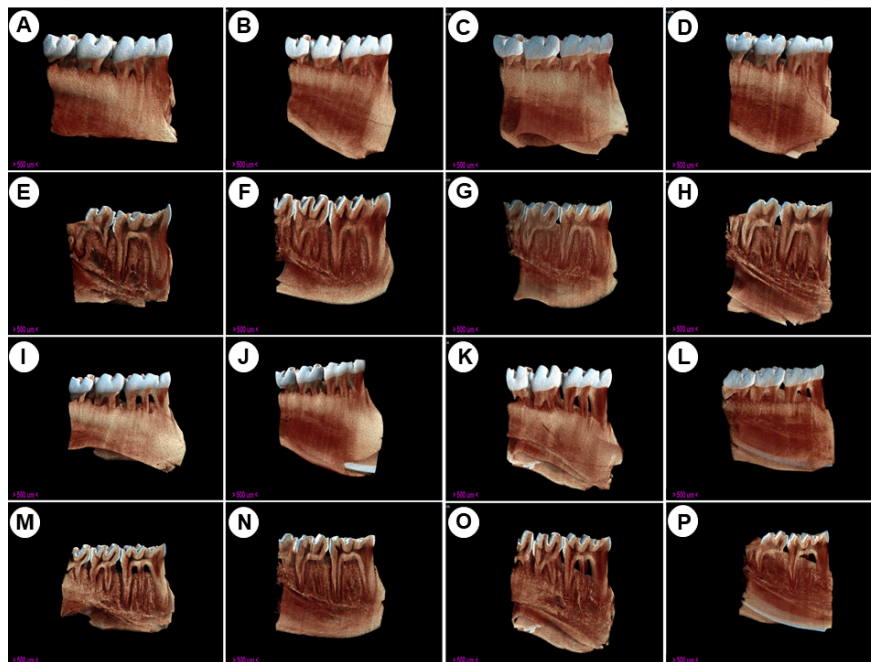
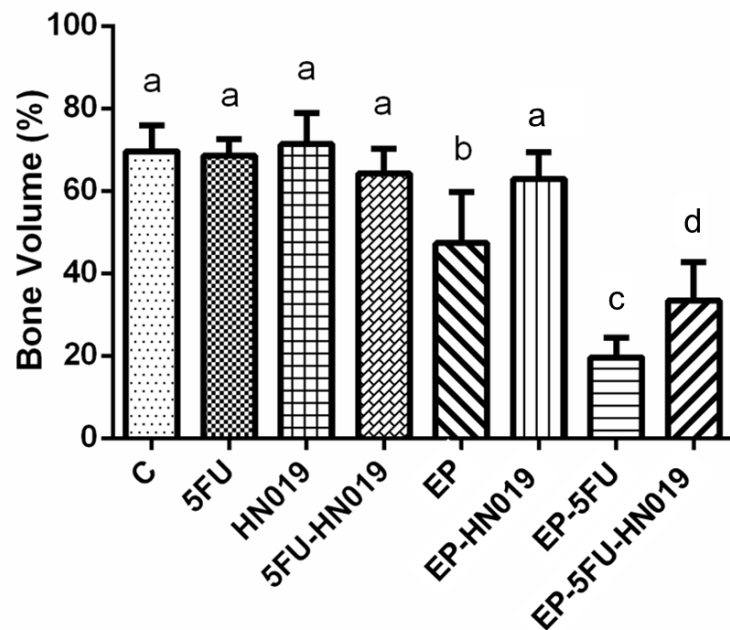


Figura 2. Gráfico contendo a média e desvio padrão do percentual de Volume Ósseo (VO), com comparações intergrupos. Letras minúsculas diferentes (abcd) indicam diferença estatística significativa (ANOVA, Teste de Tukey, $p < 0,05$). Imagens representativas das reconstruções tridimensionais renderizadas das secções microtomográficas das hemimandíbulas direitas dos animais dos grupos C (A, E), 5FU (B, F), HN019 (C, G), 5FU-HN019 (D, H), EP (I, M), EP-HN019 (J, N), EP-5FU (K, O) e EP-5FU-HN019 (L, P). Vista da superfície vestibular externa (A, B, C, D, I, J, K, L, M). Secção sagital da superfície interna (E, F, G, H, M, N, O, P). Tamanho do *pixel* = 7,96 μ .

3.4 Análise Imunohistoquímica

Os resultados para TRAP são mostrados na Figura 3. A imunomarcação para TRAP ocorreu predominantemente em osteoclastos (Figura 3). Ao comparar numericamente os grupos experimentais, o grupo EP-5FU-HN019 apresentou menor quantidade de células TRAP quando comparado ao grupo EP-5FU, sendo que o mesmo foi observado para o grupo EP-HN019 em relação ao grupo EP, porém sem diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). Os grupos C, 5FU, HN019 e 5FU-HN019 apresentaram números menores de células TRAP.

Os resultados para RANKL e OPG são mostrados nas Figuras 4 e 5, respectivamente. A coloração para RANKL (Figura 4) e OPG (Figura 5) foi limitada em sua grande maioria aos osteoblastos, no entanto alguns fibroblastos exibiram imunorreatividade no osso e tecido conjuntivo da região de furca.

Na Figura 4, pode ser observado o padrão de imunomarcação para RANKL na região de furca do primeiro molar inferior para os grupos C, 5FU, HN019, 5FU-HN019, EP, EP-HN019, EP-5FU e EP-5FU-HN019. O Grupo EP-5FU-HN019 apresentou padrão de imunomarcação significativamente menor que o grupo EP-5FU e similar ao grupo EP. Enquanto que o grupo EP-HN019 apresentou imunomarcação estatisticamente semelhante aos grupos C, 5FU, HN019 e 5FU-HN019 (Figura 4). Na imunomarcação para OPG o grupo EP-5FU-HN019 apresentou imunorreatividade maior quando comparado ao grupo EP-5FU, e as células do grupo EP-HN019 apresentaram imunorreatividade semelhante à dos grupos C, 5FU e HN019 (Figura 5).

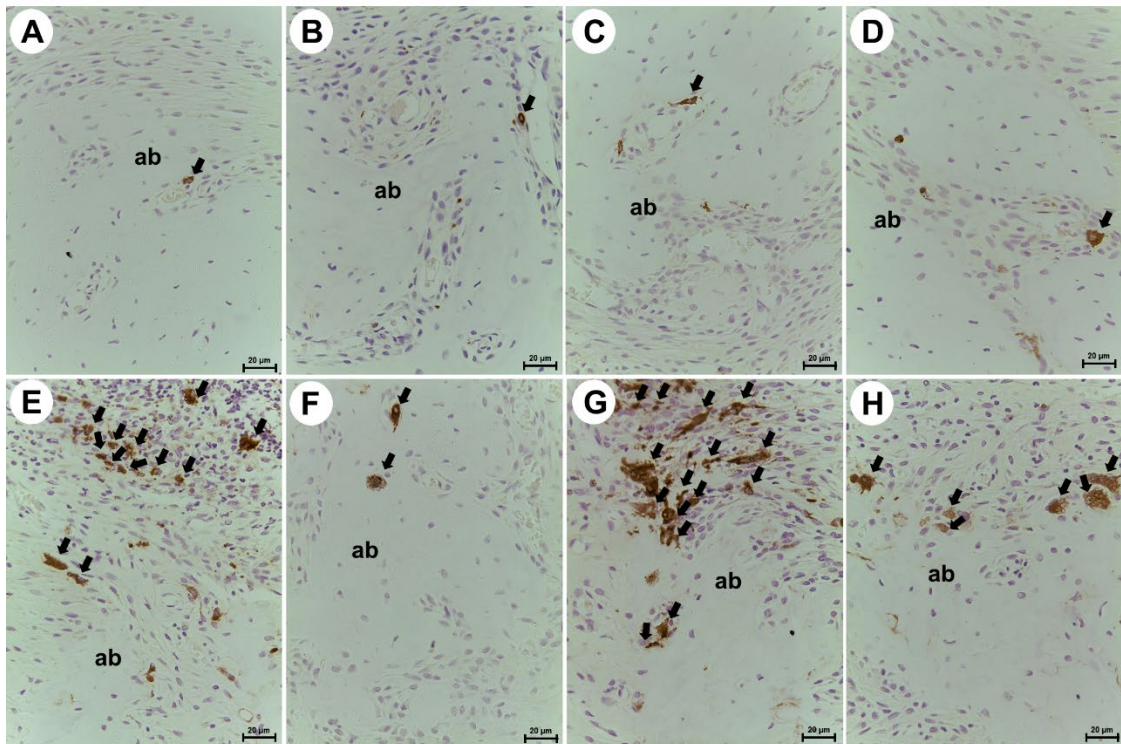
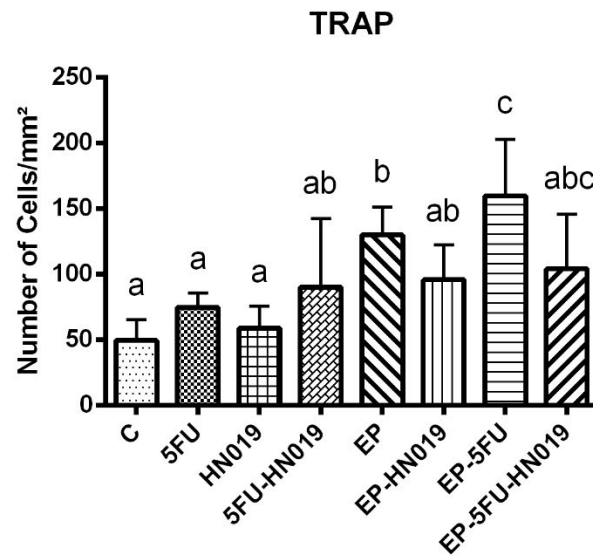


Figura 3. Média e desvio padrão da contagem de células que apresentaram imunorreatividade para TRAP. Letras minúsculas diferentes (abc) indicam diferença estatística significativa (ANOVA, Teste de Tukey, $p < 0,05$). Imagens representativas do padrão de imunomarcção para TRAP na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos dos animais. Fotomicrografias representativas dos grupos C (A), 5FU (B), HN019 (C), 5FU-HN019 (D), EP (E), EP-HN019 (F), EP-5FU (G) e EP-5FU-HN019 (H). ab = osso alveolar; setas = células imunomarcadas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

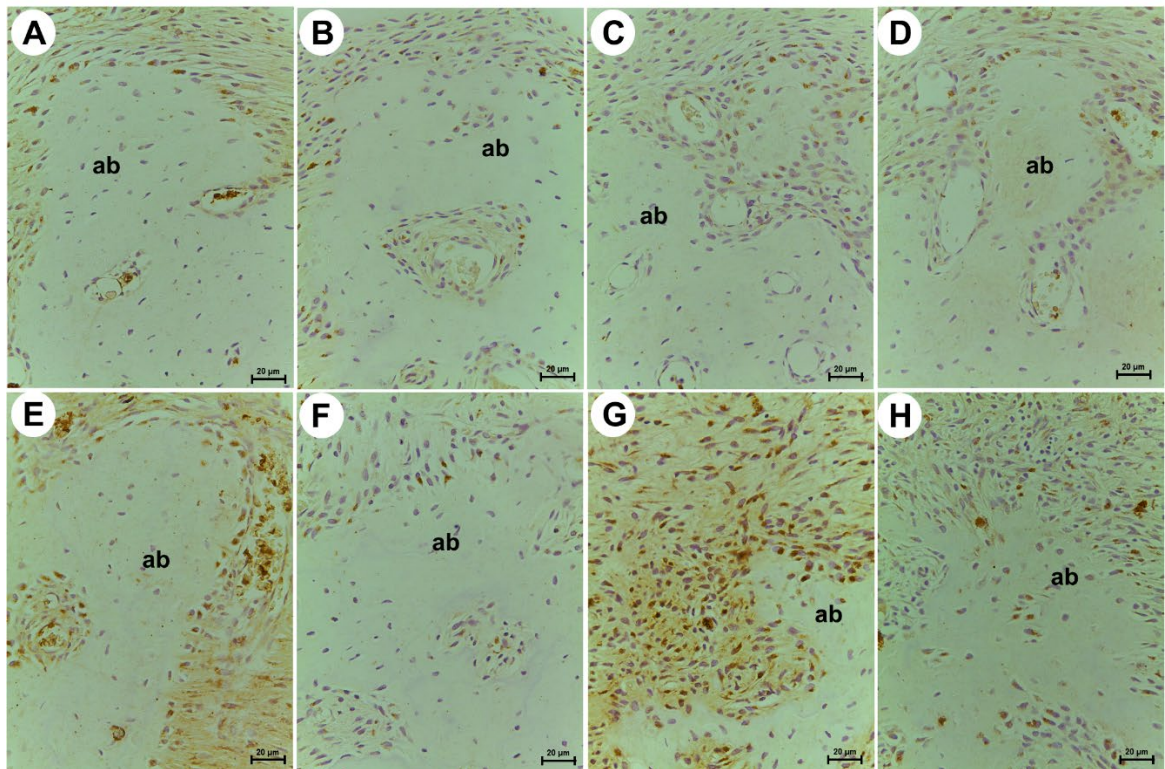
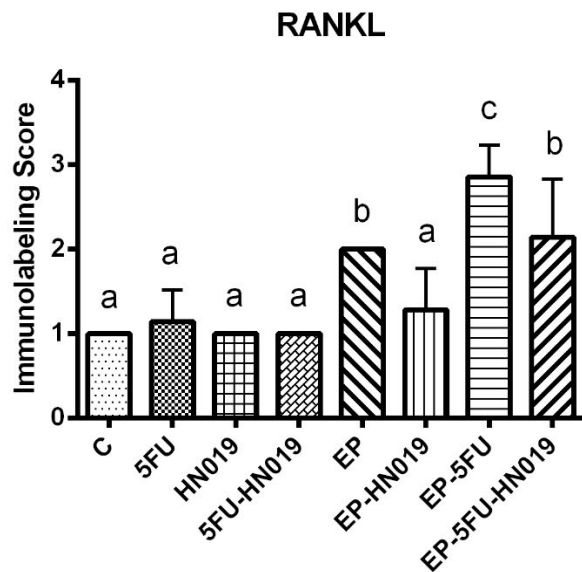


Figura 4. Gráfico mostrando a distribuição dos escores (expressa em média e desvio padrão) em relação à imunomarcagem para RANKL. Letras minúsculas diferentes (abc) indicam diferença estatística significativa (ANOVA, Teste de Tukey, $p < 0,05$). Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcagem para RANKL na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos dos animais. Imagens representativas dos grupos C (A), 5FU (B), HN019 (C), 5FU-HN019 (D), EP (E), EP-HN019 (F), EP-5FU (G) e EP-5FU-HN019 (H). ab = osso alveolar. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

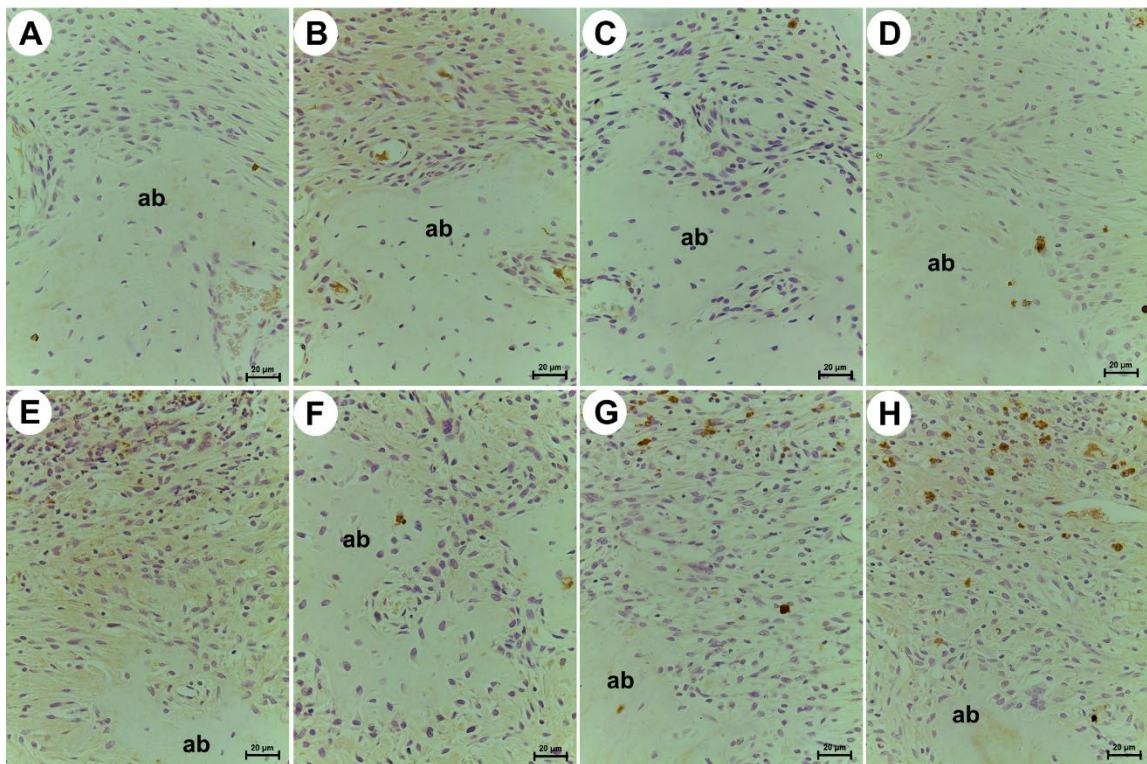
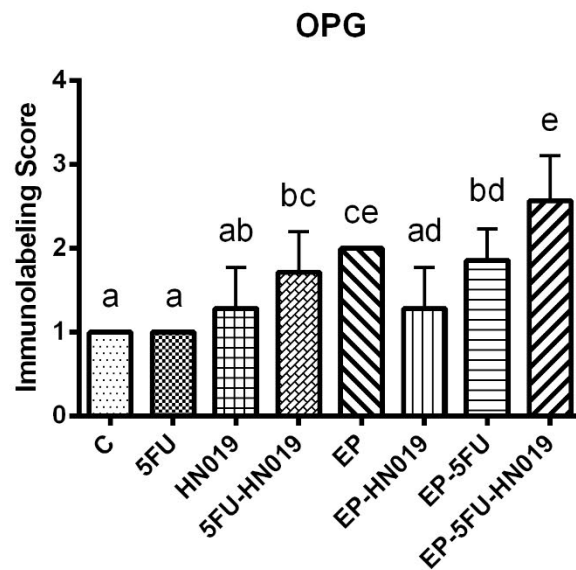


Figura 5. Gráfico mostrando a distribuição dos escores (expressa em média e desvio padrão) em relação à imunomarcagem para OPG. Letras minúsculas diferentes (abc) indicam diferença estatística significativa (ANOVA, Teste de Tukey, $p < 0,05$). Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcagem para OPG na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos dos animais. Imagens representativas dos grupos C (A), 5FU (B), HN019 (C), 5FU-HN019 (D), EP (E), EP-HN019 (F), EP-5FU (G) e EP-5FU-HN019 (H). ab = osso alveolar. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

4. DISCUSSÃO

Os achados do presente estudo mostram que a administração do quimioterápico 5-FU em ratos aumenta a sua severidade da DP, quando induzida. Além disso, os resultados também revelaram que a administração sistêmica do PROB HN019 foi capaz de reduzir a destruição dos tecidos periodontais. Os resultados encontrados em animais imunossuprimidos com EP estão de acordo com outros achados literários que utilizaram protocolo de administração similar^{7,43-46}. Em relação a administração do PROB HN019 a literatura mostra que é uma bactéria capaz de promover efeito protetor contra os danos decorrentes da DP em animais saudáveis^{38,39}, mas até o presente momento este é o primeiro estudo a avaliar a administração da *B. lactis* HN019 em animais imunossuprimidos.

O grupo EP-5FU apresentou destruição e desorganização severa dos tecidos periodontais, caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório intenso, aumento significativo de perda óssea e tecido conjuntivo, com consequente redução do volume ósseo, demonstrado por meio das análises histológica, histomorfométrica e microtomográfica. Estudos anteriores verificaram que o 5-FU aumenta a severidade da EP em animais por induzir uma condição inflamatória no tecido ósseo, causando aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias que podem ser responsáveis por estimular a reabsorção óssea osteoclástica e assim promover a reabsorção óssea^{7,12}. Um estudo realizado em ratas jovens demonstrou que uma única administração de 150mg/kg de 5-FU causa redução no volume ósseo trabecular, redução de osteoblastos e aumento de osteoclastos¹². Sabe-se que um fornecimento constante de osteoblastos é necessário para a formação e homeostase óssea, e qualquer redução significativa na quantidade e na atividade dos osteoblastos podem resultar em redução da formação óssea e levar à osteoporose¹².

Neste estudo, a atividade de reabsorção óssea foi avaliada por meio de reação imunohistoquímica para detecção de proteínas ósseas RANKL, OPG e quantificação de células positivas para TRAP (osteoclastos maduros). Nos animais do grupo EP-5FU houve maior imunomarcagem de RANKL e maior contagem para células TRAP, quando comparado ao grupo EP. A grande destruição óssea encontrada no grupo EP-5FU reflete a quantidade

de RANKL presente nos sítios com EP de animais imunossuprimidos. Esta proteína, quando ligada ao RANK, estimula a osteoclastogênese, inibe a apoptose de osteoclastos e aumenta a capacidade reabsortiva de osteoclastos maduros^{9,47}. A ação de RANKL pode ser bloqueada por seu receptor OPG, que é um dos membros de receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF), com estrutura semelhante a RANK⁴⁷. Em relação à OPG, o grupo EP-5FU apresentou padrão de imunomarcagem numericamente semelhante ao grupo EP, indicando que houve um desequilíbrio na relação RANKL/OPG, visto que ambos precisam ter a mesma proporção para que haja homeostase óssea⁴⁷.

Considerando a administração sistêmica da *B. lactis* HN019, os resultados mostram que houve um efeito protetor contra a perda óssea em animais saudáveis, demonstrado por meio do percentual de volume ósseo analisado por micro-CT, que foi estatisticamente semelhante aos grupos sem doença. O mesmo foi observado em relação à perda de inserção conjuntiva, demonstrada por meio de histometria. Os grupos EP-PROB e EP-5FU-PROB apresentaram aumento no percentual de volume ósseo quando comparados aos grupos EP e EP-5FU, respectivamente. Sendo assim, pode-se inferir que o PROB HN019 promove redução nos danos teciduais gerados pela EP, tanto individualmente quanto associada a imunossupressão com 5-FU. Em um estudo anterior o nosso grupo de pesquisa verificou que a administração de probiótico em animais com mucosite induzida e imunossuprimidos por 5-FU reduziu a inflamação oral e intestinal⁴¹. Os efeitos das bactérias probióticas no tecido ósseo envolve muitos componentes bacterianos e afetam diferentes vias do hospedeiro, tais como a inibição da diferenciação de macrófagos e monocíticos em osteoclastos, sugerindo que os probióticos liberam uma substância antiosteoclastogênica que modula a osteoclastogênese⁴⁸.

Um estudo em animais demonstrou que a administração de PROB aumenta a densidade mineral óssea devido à um aumento nos parâmetros séricos de osteocalcina, osteoblastos e formação óssea, ao mesmo tempo em que promove diminuição dos osteoclastos e parâmetros de reabsorção óssea⁴⁹. Bactérias probióticas do gênero *Bifidobacterium* produzem ácidos graxos de cadeia curta que podem diminuir o pH do trato

gastrointestinal, que conseqüentemente aumenta a absorção de minerais⁵⁰. Além disso, podem sintetizar vitaminas e enzimas que são necessárias para a formação da matriz e crescimento ósseo, como as vitaminas D, K, C e folato⁴⁸. Hipóteses que possivelmente explicam o aumento do percentual de volume ósseo nos animais que receberam administração sistêmica de PROB HN019 no presente estudo.

Foi demonstrado ainda que bactérias probióticas do gênero *B. lactis* HN019 podem modular a expressão de RANKL e OPG, promovendo redução na atividade osteoclástica³⁸. No presente estudo a imunomarcagem para RANKL e células positivas para TRAP reduziram numericamente nos grupos EP-HN019 e no EP-5FU-HN019, quando comparados aos grupos EP e EP-5FU, respectivamente. Porém, não houve diferença estatística significativa entre os grupos para a análise de TRAP, o que provavelmente se deve a um tamanho da amostra pequeno, visto que três animais do grupo EP-5FU-PROB morreram antes do término do experimento e foram excluídos das análises. Em relação a imunomarcagem para OPG, nos grupos de animais saudáveis houve equilíbrio entre a relação RANKL/OPG, pois os escores para ambas imunomarcagens foram similares. Todavia, no grupo EP-5FU-PROB houve aumento de OPG, enquanto que no grupo EP-5FU houve redução. Um estudo pré-clínico realizado em ratas ovariectomizadas demonstrou que a administração de PROB do gênero *Bifidobacterium longum* pode aumentar a quantidade de OPG e diminuir a expressão de RANKL, preservando a integridade óssea⁴⁹. Dessa forma, pode-se inferir que a administração sistêmica de *B. lactis* HN019 previne a intensa destruição óssea causada pela DP em animais imunossuprimidos.

Os resultados do presente estudo permitem o desenvolvimento potencial de novas intervenções terapêuticas envolvendo a administração de probióticos para prevenir e/ou amenizar os efeitos decorrentes da presença de DP associada a imunossupressão. Entretanto, estudos adicionais são necessários para compreender completamente a ação do 5-FU associado a *B. lactis* HN019 no periodonto comprometido, principalmente no que diz respeito às vias metabólicas que conferem tais efeitos. É importante ressaltar que existe uma grande diferença na literatura quanto as doses e as espécies probióticas utilizadas, que

podem ser administradas isoladamente ou em combinação com outras espécies, além disso diferenças no tempo e na via de administração são parâmetros que ainda precisam ser investigados e estabelecidos.

5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o quimioterápico 5-FU aumenta de modo significativo a severidade da periodontite experimental e que a administração sistêmica do probiótico *B. lactis* HN019 promove efeito protetor contra a perda óssea e de inserção conjuntiva decorrentes da periodontite experimental em animais imunossuprimidos.

6 REFERÊNCIAS

1. Haddad R, Annino D, Tishler RB. Multidisciplinary Approach to Cancer Treatment: Focus on Head and Neck Cancer. *Dent Clin North Am* 2008;52(1):1–17.
2. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66(4):271–89.
3. Europe E. Contemporary clinical management of oral squamous cell carcinoma. *Periodontol 2000* 2011;57(49):89–101.
4. Hong CHL, Napeñas JJ, Hodgson BD, Stokman MA, Mathers-Stauffer V, Elting LS, et al. A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. *Support Care Cancer* 2010;18(8):1007–21.
5. Vozza I, Caldarazzo V, Polimeni A, Ottolenghi L. Periodontal disease and cancer patients undergoing chemotherapy. *Int Dent J* 2015;65(1):45–8.
6. Michelet M. Caries and periodontal disease in cancer survivors. *Evid Based Dent* 2012;13(3):70–3.
7. Theodoro LH, Longo M, Ervolino E, Duque C, Ferro-Alves ML, Assem NZ, et al. Effect of low-level laser therapy as an adjuvant in the treatment of periodontitis induced in rats subjected to 5-fluorouracil chemotherapy. *J Periodontal Res* 2016;51(5):669–80.
8. Djuric M, Cakic S, Hadzi-Mihailovic M, Petrovic D, Jankovic L. Oral status in patients

- receiving 5-fluorouracil for colorectal cancer. *J BUON* 2010;15(3):475–9.
9. Garcia VG, Novaes VCN, de Almeida JM, Longo M, Ervolino E, Bomfim SRM, et al. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Support Care Cancer* 2015;23(7):2007–17.
 10. Von Bültzingslöwen I, Jontell M, Hurst P, Nannmark U, Kardos T. 5-Fluorouracil induces autophagic degeneration in rat oral keratinocytes. *Oral Oncol* 2001;37(6):537–44.
 11. Mazzeo MA, Linares JA, Campos ML, Busamia BE, Dubersarsky C, Lavarda M, et al. Oral signs of intravenous chemotherapy with 5- fluorouracil and leucovorin calcium in colon cancer treatment. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009;14(3):1–6.
 12. Nadhanan RR, Abimosleh SM, Su Y-W, Scherer MA, Howarth GS, Xian CJ. Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302(11):E1440-9.
 13. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5(1):78–111.
 15. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994;65(3):260–7.
 16. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2005;32 Suppl 6:108-29.
 17. Haytac MC, Kunin AA, Belenova IA. Probiotics and oral-periodontal health. *EPMA J* 2014;5(Suppl 1):A125.
 18. Cutting SM. Bacillus probiotics. *Food Microbiol* 2011;28(2):214–20.
 19. Hallström H, Lindgren S, Widén C, Renvert S, Twetman S. Acta Odontologica Scandinavica Probiotic supplements and debridement of peri- implant mucositis: A randomized controlled trial Probiotic supplements and debridement of peri-implant

- mucositis: A randomized controlled trial. *Acta Odontol Scand Early Online* 2015;(November 2014):1–7.
20. Lawande S. Probiotics for Management of Periodontal Disease: A Novel Therapeutic Strategy? *IOSR J Pharm* 2012;2(4):41–6.
 21. Raff A, Hunt LC. Probiotics for Periodontal Health: A Review of the Literature. *J Dent Hyg* 2012;86(2):71–81.
 22. Messori MR, Oliveira LFF, Foureaux RC, Taba M, Zangerônimo MG, Furlaneto F a C, et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol* 2013;84(12):1818–26.
 23. Weichert S, Schroten H, Adam R. The Role of Prebiotics and Probiotics in Prevention and Treatment of Childhood Infectious Diseases. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31(8):856–62.
 24. Twetman L, Larsen U, Fiehn NE, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: an in vitro study. *Acta Odontol Scand* 2009;67(5):284–8.
 25. Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol* 2011;38(SUPPL. 11):159–77.
 26. Messori MR, Pereira LJ, Foureaux R, Oliveira LFF, Sordi CG, Alves AJN, et al. Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2016;66:108–19.
 27. Aljewicz M, Cichosz G. The effect of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on the invitro availability of minerals from cheeses and cheese-like products. *LWT - Food Sci Technol* 2015;60(2):841–7.
 28. Ranadheera RDCS, Baines SK, Adams MC. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res Int* 2010;43(1):1–7.
 29. Whitford EJ, Cummins AG, Butler RN, Prisciandaro LD, Fauser JK, Yazbeck R, et al. Effects of *Streptococcus thermophilus* TH-4 on intestinal mucositis induced by the

- chemotherapeutic agent 5-Fluorouracil (5-FU). *Cancer Biol Ther* 2009;8(6):505–11.
30. Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: A randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2013;40(11):1025–35.
31. Bron P a., van Baarlen P, Kleerebezem M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nat Rev Microbiol* 2011;10(1):66–78.
32. Tekce M, Ince G, Gursoy H, Dirikan Ipci S, Cakar G, Kadir T, et al. Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: A 1-year follow-up study. *J Clin Periodontol* 2015;42(4):363–72.
33. Eren Kuru B, Laleman I, Yalnızoğlu T, Kuru L, Teughels W. The Influence of a *Bifidobacterium Animalis* Probiotic on Gingival Health: a Randomized Controlled *Clinical Trial*. *J Periodontol* 2017;1–14.
34. Wibowo N, Bardosono S, Irwinda R. Effects of *Bifidobacterium animalis lactis* HN019 (DR10TM), inulin, and micronutrient fortified milk on faecal DR10TM, immune markers, and maternal micronutrients among Indonesian pregnant women. *Asia Pac J Clin Nutr* 2016;25(Suppl 1):S102–10.
35. Hojo K, Mizoguchi C, Taketomo N, Ohshima T, Gomi K, Arai T, et al. Distribution of salivary *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in periodontal health and disease. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71(1):152–7.
36. Lee DK, Park SY, An HM, Kim JR, Kim MJ, Lee SW, et al. Antimicrobial activity of *Bifidobacterium* spp. isolated from healthy adult Koreans against cariogenic microflora. *Arch Oral Biol* 2011;56(10):1047–54.
38. Jäsberg H, Söderling E, Endo A, Beighton D, Haukioja A. *Bifidobacteria* inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro biofilm model. *Eur J Oral Sci* 2016;124(3):251–8.
38. Toiviainen A, Jalasvuori H, Lahti E, Gursoy U, Salminen S, Fontana M, et al. Impact of

- orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clin Oral Investig* 2015;19(1):77–83.
39. Oliveira LFF, Salvador SL, Silva PHF, Furlaneto FAC, Figueiredo L, Casarin R, et al. Benefits of *Bifidobacterium Animalis* Subsp *Lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *J Periodontol* 2017;88(2):197–208.
 40. Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, Teixeira GC, Pischiotini JP, Moreira ALG, et al. Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS One* 2017;12(6):1–15.
 41. Invernici MM, Salvador SL, Silva PHF, Soares MSM, Casarin R, Palioto DB, et al. Effects of *Bifidobacterium* probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2018;0–2.
 42. Gerhard D, Sousa FJDSS, Andraus RAC, Pardo PE, Nai GA, Neto HB, Messoria MR ML. Probiotic therapy reduces inflammation and improves intestinal morphology in rats with induced oral mucositis. *Braz Oral Res* 2017;31:e71.
 43. Garcia VG, Gualberto EC, Ervolino E, Nagata MJH, de Almeida JM, Theodoro LH. aPDT for periodontitis treatment in ovariectomized rats under systemic nicotine. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018;22:70–8.
 44. Garcia VG, Knoll LR, Longo M, Novaes VCN, Assem NZ, Ervolino E, et al. Effect of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2016;51(1):26–37.
 45. Longo M, Gouveia Garcia V, Ervolino E, Ferro Alves ML, Duque C, Wainwright M, et al. Multiple aPDT sessions on periodontitis in rats treated with chemotherapy: histomorphometrical, immunohistochemical, immunological and microbiological analyses. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2019;25:92–102.
 46. Theodoro LH, Longo M, Novaes VCN, Miessi DMJ, Ferro-Alves ML, Ervolino E, et al.

- Low-level laser and antimicrobial photodynamic therapy on experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy by 5-fluorouracil. *Support Care Cancer* 2017;25(10):3261–71.
47. Belibasakis GN and Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol* 2012;39:239–48.
48. Collins FL, Rios-arce ND, Schepper JD, Parameswaran N, McCabe LR. The Potential of Probiotics as a Therapy for Osteoporosis. *Bugs as Drugs* 2017;213–33.
49. Parvaneh K, Ebrahimi M, Sabran MR, Karimi G, Hwei ANM, Abdul-Majeed S, et al. Probiotics (*Bifidobacterium longum*) increase bone mass density and upregulate Sparc and Bmp-2 genes in rats with bone loss resulting from ovariectomy. *Biomed Res Int* 2015;2015:897639.
50. Pompe E, Bartstra J, Verhaar HJ, Koning HJ De, Aalst CM Van Der, Oudkerk M, et al. Bone density loss on computed tomography at 3-year follow-up in current compared to former male smokers. *Eur J Radiol* 2017;89:177–81.

Notas de Rodapé:

* Animal Research: Reporting of *in vivo* Experiments

† *Rattus norvegicus, albinus, Wistar*

‡ *B. lactis* HN019; HOWARUTM Bifido, E. I. Dupont® de Nemours and Company, Wilmington, DE, EUA

§ Rompum - Bayer Saúde Animal; de 10 mg/Kg de peso corpóreo

|| Dopalen - Agribands - Brasil Ltda; 75 mg/Kg de peso corpóreo

¶ Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil,

50 mg/mL; Eurofarma Laboratorios, São Paulo, SP, Brazil

** Thiopentax, Cristalia Produtos Quimicos Farmaceuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil

†† Leica ICC50 HD, Leica Microsystems, Switzerland

‡‡ LAS v4.2.0

§§ Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Bélgica

||| Versão 1.13.5.1+, Bruker, Kontich, Belgium

¶¶ LSAB + System-HRP®, Dako North America Inc., CA, EUA

DAB – Cromógeno K 3468, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, EUA

*** NIKON Labophot, Japan

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICO NA PROGRESSÃO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS SUBMETIDOS A QUIMIOTERAPIA.", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 3750 e tendo como participante(s) **EDER DA SILVA DOLENS (discente)**, **YARA LOYANNE DE ALMEIDA SILVA LEVI (discente)**, **LUANA CARLA WONS (discente)**, **LIVIA PIZZO PITTELI (discente)**, **JESSICA GOULART DE CASTRO (discente)**, **RODRIGO ANTONIO CARVALHO ANDRAUS (participante externo)**, **FABIANA GOUVEIA STRAIOTO (docente)**, **CAROLINA DOS SANTOS SANTINONI (docente)**, **LUCIANA PRADO MAIA ANDRAUS (orientador responsável)**, foi avaliado e **APROVADO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)** e **COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido **APROVADO** em reunião realizada em 20/06/2017.

Vigência do projeto: 08/2017 a 07/2019.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
ratos Wistar	85	200 gramas	60 dias	M	Biotério Central da UNOESTE

Presidente Prudente, 3 de Julho de 2017.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI

Prof. Ms. Adriana Falcão de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

ANEXO B – Author Guidelines – Journal of Periodontology

***Journal of Periodontology* Author Instructions**

Manuscript Categories

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

The *Journal of Periodontology* accepts manuscript submissions online at [ScholarOne Manuscripts](#). To start a new submission, enter the Author Center and click "Start New Submission" in the left menu box. Details regarding each submission step are located at the top of the page in ScholarOne Manuscripts. Authors should prepare manuscripts in accordance with the instructions below. Failure to do so may result in delays or manuscript unsubmission.

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

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

ORIGINAL ARTICLES

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

Format

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

Abstract

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

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

Introduction

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

Materials and Methods

This section lists the methods used in the study in sufficient detail so that other investigators would be able to reproduce the research. When established methods are used, the author need only refer to previously published reports; however, the authors should

provide brief descriptions of methods that are not well known or that have been modified. Identify all drugs and chemicals used, including both generic and, if necessary, proprietary names and doses. The populations for research involving humans should be clearly defined and enrollment dates provided.

Results

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

Discussion

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

REVIEW ARTICLES

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

COMMENTARIES

The purpose of these papers is to provide a forum for discussion of controversies and other issues as they relate to the practice of periodontics and implant dentistry. Full and balanced discussion of controversies on important issues is encouraged. This may result in several authors each presenting a relevant viewpoint. Commentaries should be concise

(2,000 to 3,000 words) with no more than 50 references; however, they should be complete and balanced, which may require that the issue or controversy addressed be highly focused.

Introduction

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

Body

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

Summary

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

Acknowledgment(s)

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

CASE SERIES

The *Journal of Periodontology* no longer publishes Case Reports. Authors are encouraged to submit Case Reports to [*Clinical Advances in Periodontics*](#). The Journal of Periodontology publishes selected Case Series that describe unusual case presentations, complex diagnoses, and novel approaches to treatment within the scope of practice of

periodontology. These Case Series provide valuable information for clinicians and teachers in the field.

Case Series report a sufficient number of consecutive or randomized cases to make a persuasive argument for or against the procedure, technique, or concept under discussion. Cases should be relatively homogeneous so that a systematic evaluation of one type of disease, lesion, or condition is made for the procedure under consideration. Also, treatment and documentation should be consistent and standardized for all cases. It is recognized that definitive evidence for the safety and efficacy of any procedure, drug, or device comes primarily from well-designed, randomized, controlled trials. However, well-executed Case Series may lead to hypotheses about the usefulness of new and innovative procedures, drugs, or devices and may therefore be of value to the progress of clinical science. The requirements for patient consent, privacy, and institutional approval are well defined for manuscripts describing research on human subjects. These basic requirements are described by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) in their Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (available at: www.icmje.org) and are interpreted in the instructions to authors of all peer-reviewed biomedical journals, including the *Journal of Periodontology*.

Due to the changing ethical and legal environment around the use of patient information, the editorial team has received multiple questions about the need for subject consent from patients described in Case Series submitted for publication. The following applies to most Case Series. It should be noted that the Editors will determine whether specific Case Series require additional approvals beyond what is described below.

Requirement for Ethics Board Approval

Most Case Series are a retrospective description of clinical findings in cases or an observed course of events that document a new aspect of patient management during the normal course of clinical treatment. Since there is no hypothesis testing, no systematic data collection beyond that which is part of routine clinical practice, no data analysis, and the work

has already been done, Case Series do not usually qualify as "research" requiring approval from ethical boards designed to protect humans involved in clinical research. (U.S. Fed. definition: "RESEARCH is any systematic investigation, including research development, testing and evaluation, designed to develop or contribute to generalizable knowledge.")

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

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

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

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

Privacy in Case Series

No patient identifiers should be included in Case Series. If the authors choose to include any subject identifiers, the authors must include the patient's informed written consent to publish the information. Our policy conforms to the Uniform Requirements, which states: "Patients have a right to privacy that should not be violated without informed consent. Identifying information, including names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, or pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that an identifiable patient be shown the manuscript to be published. Authors should disclose to these patients whether any potential identifiable material might be available via the Internet as well as in print after publication."

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

Format

Case Series must be limited to 2,000 to 3,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

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

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

Introduction

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

Case Description and Results

This section describes the cases, including all relevant data. For ease of presentation, tables describing longitudinal data in a chronological form may be useful.

Carefully selected, high-quality clinical photographs in full color, as well as radiographs, are encouraged.

Discussion

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

GUEST EDITORIALS

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

LETTERS TO THE EDITOR

Letters may comment on articles published in the *Journal of Periodontology* and should offer constructive criticism. If a letter comments on a published article, the author(s) will be provided 30 days to respond to the observations. Letters to the Editor may also address any aspect of the profession, including education and training, new modes of practice, and concepts of disease and its management. Letters should be brief (<1,000 words), focused on one or a few specific points or concerns, and can be signed by no more than five individuals. Citations should be handled as standard references.

GENERAL FORMAT

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

- Title Page
- Abstract (or Introduction) and Key Words

- Text
- Footnotes
- Acknowledgment(s)
- References
- Figure Legends
- Tables

Figures should not be embedded in the manuscript. Please see the *Journal of Periodontology* [Digital Art Guidelines](#) for more information on submitting figures. Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

TITLE PAGE

The title page should contain:

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

KEY WORDS

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

ACKNOWLEDGMENT(S) AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgment(s)

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

Conflicts of Interest

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

Authors are required to submit:

1. A statement in the acknowledgments section of the manuscript that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author. If an author has no commercial relationships to declare, a statement to that effect should be included. This statement should include financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include financial support for research (salaries, equipment, supplies, travel reimbursement); employment or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper; and personal financial interests such as shares in or ownership of companies affected by publication of the research, patents or patent applications whose value may be affected

by this publication, and consulting fees or royalties from organizations which may profit or lose as a result of publication. An example is shown below.

2. A conflict of interest and financial disclosure form for each author. A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission.

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

Example of Conflict of Interest Statement

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

REFERENCES

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. A journal, magazine, or newspaper article should be given only one number; a book should be given a different number each time it is mentioned, if different page numbers are cited.

All references are identified, whether they appear in the text, tables, or legends, by Arabic numbers in superscript. Journal title abbreviations should be those used by the U.S. National Library of Medicine. If you are uncertain about the correct abbreviation for a journal title, please search for the journal at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>. The use of abstracts as references is strongly discouraged. Manuscripts accepted for publication may be cited and should include the manuscript's DOI, if known. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as "unpublished observations." Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references. Please provide the

date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual and his/her affiliation. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the *Journal of Periodontology's* preferred reference style.

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, et al. Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res* 2008;87:51-55.
2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report no. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.
3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.
4. Non-English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of peri-implant disease (in German). *Z Zahnärztl Implantol* 1996;12:152-157.

Books and Other Monographs

5. Personal author(s). Tullman JJ, Redding SW. *Systemic Disease in Dental Treatment*. St. Louis: The CV Mosby Company; 1983:1-5.

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

Electronic Citations

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

9. Online-only article. Rasperini G, Acunzo R, Limiroli E. Decision making in gingival recession treatment: Scientific evidence and clinical experience. *Clin Adv Periodontics* 2011;1:41-52. doi:10.1902/cap.2011.100002.
10. Ahead of print. McGuire MK, Scheyer ET, Nevins M, et al. Living cellular construct for increasing the width of keratinized gingiva. Results from a randomized, within-patient, controlled trial [published online ahead of print March 29, 2011]. *J Periodontol*; doi:10.1902/jop.2011.100671.
11. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Periodontal Disease. Available at: http://www.cdc.gov/OralHealth/topics/periodontal_disease.htm. Accessed September 29, 2010.

TABLES

Tables should be numbered consecutively in Arabic numbers in the order of their appearance in the text. A brief descriptive title should be supplied for each. Explanations, including abbreviations, should be listed as footnotes, not in the heading. Every column should have a heading. Statistical measures of variations such as standard deviation or

standard error of the mean should be included as appropriate in the footnotes. Do not use internal horizontal or vertical rules. The submission system will easily read tables created with Word's table utility or when inserted into Word from Excel.

FIGURES

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

FOOTNOTES

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

SUPPORTING INFORMATION

The *Journal of Periodontology* includes supplementary/supporting information in the online Journal. All supplementary material should be called out in the text.

Supplementary Figures and Tables

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

Supplementary Videos

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

Authors can create video abstracts for their articles through Wiley's partnership with Research Square. Visit the [Wiley](#) and [Research Square](#) websites for more information about this video option. Authors are also welcome to create and submit their own videos.

STYLE

Please follow the guidelines below when preparing a manuscript:

- Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- Do not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, e.g., or i.e.
- Use a block style; do not tabulate or indent material.
- Refer to the newest edition of the [Glossary of Periodontal Terms](#) published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.
- Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the [Annals of Periodontology, volume 4](#) (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).
- Create equations as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.
- Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and

blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal) numbering system.

- Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

AUTHORSHIP

Individuals identified as authors must meet all of the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition, analysis, or interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published; and 4) agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Once the *Journal of Periodontology* has received a manuscript, any changes in authorship must be e-mailed to jerry@perio.org and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (see below).

Conflict of Interest and Financial Disclosure Form

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

CLINICAL TRIALS

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

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

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

- U.S. National Institutes of Health Clinical Trials Registry - <http://www.clinicaltrials.gov>
- EU Clinical Trials Register - <https://www.clinicaltrialsregister.eu>
- WHO International Clinical Trials Registry Platform - <http://www.who.int/ictrp/en>

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

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

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

PRODUCT IDENTIFICATION

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

REVISED MANUSCRIPTS

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

1. A detailed response to each reviewer comment for the original manuscript should be included. This response should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews.
2. Only the most recent version of each file should be uploaded. You may have to delete older files from the Author Center.
3. **Please Any modified or added text must be highlighted in yellow in the revised manuscript.**
4. Figures and tables should be resubmitted with revised manuscripts, even if they were not revised.

REVIEW PROCESS

Peer Review

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

MANUSCRIPT ACCEPTANCE

All manuscripts accepted for publication become the property of the American Academy of Periodontology. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to log in to Author Services where, via the Wiley Author Licensing Service (WALS), they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper. Once all forms are received by the editorial office, an unedited version of the accepted manuscript will appear online ahead of print on the journal's website. Once a manuscript is online ahead of print, it is fully citable based on the Digital Object Identifier (DOI) assigned to the manuscript. Manuscripts will be copyedited, published online, and printed in an issue of the *Journal of Periodontology* approximately 4 to 6 months after acceptance.

Copyright Transfer Agreement (CTA)

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

OnlineOpen

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

- Creative Commons Attribution Non-Commercial License

- Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License

Research Councils UK (RCUK) and Wellcome Trust authors will use the Creative Commons Attribution License

Please visit the terms and conditions of these open access agreements [here](#).

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

Reprints

Corresponding authors may purchase reprints at the time pages are received for proofreading.

Funding Agency Requirements

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

Authors are responsible for complying with all funding agency requirements.

QUESTIONS

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