



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

VITOR GENARO

**INFLUÊNCIA DO ALENDRONATO SÓDICO, DA TERAPIA FOTODINÂMICA OU
DA ASSOCIAÇÃO DE AMBOS COMO TERAPIAS ADJUNTAS À RASPAGEM E
ALISAMENTO RADICULAR NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL INDUZIDA. ESTUDO HISTOQUÍMICO EM RATOS**

Presidente Prudente - SP
2019

VITOR GENARO

**INFLUÊNCIA DO ALENDRONATO SÓDICO, DA TERAPIA FOTODINÂMICA OU
DA ASSOCIAÇÃO DE AMBOS COMO TERAPIAS ADJUNTAS À RASPAGEM E
ALISAMENTO RADICULAR NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL INDUZIDA. ESTUDO HISTOQUÍMICO EM RATOS**

Dissertação a apresentada 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: Clínica Odontológica.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Carolina dos Santos Santinoni

D64
G324i Genaro, Vitor
Influência do alendronato sódico, da terapia fotodinâmica ou da associação de ambos como terapias adjuntas à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite experimental induzida. Estudo histoquímico em ratos / Vitor Genaro. -- Presidente Prudente, 2019.
60 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.
Bibliografia.
Orientador: Carolina dos Santos Santinoni.

1. Alendronato. 2. Fotoquimioterapia. 3. Periodontite. 4. Histoquímica. 5. Ratos. I. Título.

Catálogo na fonte: Bibliotecaria - Jakeline Margaret de Queiroz Ortega – 8/6246

VITOR GENARO

INFLUÊNCIA DO ALENDRONATO SÓDICO, DA TERAPIA FOTODINÂMICA OU DA ASSOCIAÇÃO DE AMBOS COMO TERAPIAS ADJUNTAS À RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULAR NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL INDUZIDA. ESTUDO HISTOQUÍMICO EM RATOS

Dissertação apresentada a 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: Clínica Odontológica.

Presidente Prudente, 24 de junho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Christine Men Martins
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Eduardo Francisco de Souza Faco
Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP
Lins - SP

DEDICATÓRIA

A minha Família.

Sou grato pela bênção que me foi concedida em ter uma maravilhosa família com quem posso contar com o apoio de cada um, e compartilhar a vida. São essas pessoas que, através de suas presenças, seus sorrisos, seus abraços, suas palavras, compreensão, amor e amizade, dão sentido à minha vida, tornando minha jornada mais fácil e prazerosa. Quero que saibam que reconheço tudo que fizeram por mim, assim como a força que inculcaram no meu pensamento para não desistir, e o conforto de saber que nunca estarei só e serei sempre capaz de tudo por maiores que sejam as dificuldades.

“Para estar junto não é preciso estar perto, e sim do lado de dentro.”

(Leonardo da Vinci)

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Obrigado, meu Deus, por abençoar o meu caminho durante esse trabalho. A fé que tenho em ti alimentou meu foco, minha força e minha disciplina. Sou grato pelas bênçãos que recaíram não só sobre mim, mas também sobre todos os amigos, professores e familiares.

“A melhor maneira que o homem dispõe para se aperfeiçoar, é aproximar-se de Deus.” (Pitágoras);

Aos meus pais, Oscar Genaro e Neide Biniana Sanches Genaro, a quem agradeço por tudo que fizeram e ainda fazem por mim. Obrigado por me ensinarem a caminhar e assim poder seguir meus próprios passos. Pela educação que me deram e por sempre estarem ao meu lado, tanto nas alegrias como nos momentos difíceis. Vocês são meu porto seguro, exemplos de caráter, retidão, e amor aos seus filhos. A luz que sigo em meu caminho vêm de vocês.

Aprendi com vocês a ter coragem, a não desanimar, a saborear a vitória. Obrigado pelas mãos entrelaçadas na minha, dando-me confiança, na certeza de estar indo por caminhos seguros, na certeza de que terei sempre onde me amparar, caso eu tropece. Obrigado por tudo que vocês planejaram e fizeram, por tudo que planejaram e não fizeram e pelo que fizeram sem planejar. Obrigado pelas renúncias... e não foram poucas!

Quero expressar meu eterno e puro amor, a vocês, razão de minha existência e exemplos a serem seguidos.!

Deus abençoe vocês!

“A medida do amor é amar sem medida.” (Santo Agostinho);

A minha amada esposa, Denise,

Meu amor, sem você jamais conseguiria chegar onde cheguei. Agradeço pelo seu apoio, seu companheirismo em todos os momentos difíceis, ajudando-me a superar cada barreira dessa jornada de minha vida, para chegar até aqui.

Quando caía, era você que estava ao meu lado para me levantar, para me impulsionar e incentivar a nunca desistir. Você é um exemplo de garra e superação, em você me inspiro. Agradeço a cada minuto que passo ao seu lado, pois a cada conquista minha, tem muito de ti. Obrigado pela esposa, pela guerreira, pela mulher, pela zelosa mãe de nossos amados filhos!

Minha eterna namorada, sem você, a vida não teria sentido, meu muito obrigado por estar ao meu lado nessa jornada de nossas vidas!

“O homem ama, porque o amor é a essência da sua alma. Por isso não pode deixar de amar.” (Leon Tolstói);

Aos meus filhos Lucca e Enrico,

Meus amados filhos, que são os maiores presentes que Deus me deu, agradeço a compreensão que tiveram por cada momento de minha ausência em suas vidas, para que eu pudesse dedicar-me a mais esta conquista. Cada degrau a subir, faço por vocês. Minha motivação para que eu siga em frente, superando cada obstáculo e desejando sempre melhorar como pessoa, como profissional e como pai, vem de vocês.

Meu amor infinito e incondicional aos meus filhos, Lucca e Enrico.

“Amor de Família é a coisa mais inexplicável do mundo, nem um pai consegue dizer para um filho o quanto o ama, nem o filho sabe dizer ao pai, então eles simplesmente demonstram...” (Pasini);

Aos meus irmãos Sandra e André,

Por todo o carinho, apoio e incentivo através de palavras e gestos ajudando a superar as minhas dificuldades.

“Pode ser que um dia não mais existamos. Mas, se ainda sobrar amizade, nasceremos de novo um para o outro.” (Albert Einstein);

Aos professores do curso de Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UNOESTE,

Agradeço a todos os professores por proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram, não somente por terem ensinado, mas por terem feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

“Diga-me e eu esquecerei. Ensina-me e eu me lembro. Envolve-me e eu aprendo.” (Benjamin Franklin);

Aos funcionários da UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista,

Agradeço a todos pela dedicação, pelo carinho e prestatividade com que realizam suas funções nesta instituição, fazendo com que a nossa jornada torne-se mais fácil e acolhedora.

“Que o homem seja nobre, prestativo e bom, pois só isso o distingue de todos os outros seres”. (Johann Goethe);

A Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE,

Agradeço a esta casa que me acolheu, e deu a oportunidade de eu poder concretizar meu curso de mestrado. Agradeço ao Professor Agripino Lima (in memoriam); homem visionário, sonhador, vanguardista, que fez sonhos serem materializados em realidade. Sua coragem e determinação contribuíram, e tem contribuído na formação de milhares de profissionais e no enriquecimento de nossa sociedade!

“Apenas o sonhador que busca a realização do seu sonho é protagonista e autor da sua vida.”

(Fernando Dolabela);

Aos meus amigos do curso de mestrado,

A amizade não se conjuga no pretérito, apenas os momentos vividos. Nossas incertezas, angustias, alegrias, aprendizado, nossos passos galgando cada degrau desta jornada, jamais serão esquecidos! Tenho cada um de vocês guardado dentro de meu coração. Torço pelo sucesso de cada um de meus amigos. Pela nossa convivência, tenho certeza que somos os bons frutos da semente que germinou.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.” (Charles Chaplin);

Agradecimentos Especiais:

À minha orientadora, Profa. Dra. Carolina dos Santos Santinoni,

Meu eterno agradecimento a você que, como um farol para guiou-me nesta jornada. Difícil enumerar as qualidades que você como mestre, orientadora e amiga possui; sabedoria, humildade, serenidade, o dom de transmitir seus conhecimentos e de apontar os erros, a grandiosidade em tratar com igualdade aquele que está em busca do aprender.

És merecedora dos mais elogiosos e sinceros adjetivos.

Nesse mundo, repleto de pessoas ruins, você me fez acreditar que os bons são a maioria. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, onde busco inspirações para me tornar melhor, como profissional e como pessoa.

Tenho orgulho em dizer que um dia fui seu orientado.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem

desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.” Leonardo da Vinci

A coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UNOESTE,
Profa. Dra. Graziela Garrido Mori Panucci,

Meus sinceros agradecimentos pelo seu empenho, juntamente com sua equipe, em cuidar da terra, plantar a semente, regá-la, adubá-la, ver a árvore crescer, dando flores e agora colhendo os frutos. Sei dos inúmeros desafios que precisou passar, das incertezas que pairaram, mas sua garra, determinação e vontade para que a quimera se transformasse em algo real e concreto, vingou. Somos os frutos desta semente que ajudou a plantar, e agradeço por fazer parte deste sonho que se transformou em realidade!

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”. (Augusto Branco).

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

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Influência do alendronato sódico, da terapia fotodinâmica ou da associação de ambos como terapias adjuntas à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite experimental induzida. Estudo histoquímico em ratos

O propósito deste estudo foi avaliar a influência do alendronato sódico (ALN), da terapia fotodinâmica (aPDT), ou da associação de ambas as terapias adjuntas à raspagem e alisamento radicular (RAR) para o tratamento da periodontite experimental (PE) induzida em ratos. Noventa e seis ratos foram utilizados no estudo. Para indução da PE, o primeiro molar inferior esquerdo de cada animal foi selecionado para receber um fio de algodão na região subgingival. Após 7 dias da indução da PE, a ligadura foi removida. Os animais foram divididos em 4 grupos, cada um com 24 animais: Grupo Raspagem e Alisamento Radicular (RAR): RAR e irrigação da bolsa periodontal com soro fisiológico; Grupo Alendronato (ALN): RAR e irrigação da bolsa periodontal com alendronato sódico (10^{-5} M); Grupo Terapia Fotodinâmica (aPDT): RAR, irrigação da bolsa periodontal com azul de metileno e terapia com laser de baixa potência (LLLT); Grupo Alendronato e terapia fotodinâmica (ALN/aPDT): RAR, irrigação da bolsa periodontal com alendronato sódico associado ao azul de metileno e LLLT. Cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos (n=8) para eutanásia aos 7, 15 ou 30 dias após a realização dos procedimentos. Após o processamento laboratorial de rotina, o molar esquerdo foi incluído em parafina e cortes histológicos semi-seriados de 4 μ m de espessura foram obtidos no sentido méso-distal. Alguns cortes foram submetidos à coloração com o Vermelho Picrosirius e analisados sob microscopia de luz polarizada. Os dados foram analisados estatisticamente ($p < 0,05$). Aos 7 dias, o Grupo ALN apresentou porcentagem de fibras colágenas imaturas significativamente maior que o Grupo ALN/aPDT. Aos 30 dias, o Grupo Controle apresentou porcentagem de fibras colágenas imaturas significativamente maior que o Grupo ALN. Aos 7 dias, o Grupo ALN/aPDT apresentou porcentagem de fibras colágenas maduras significativamente maior que o Grupo ALN. Aos 30 dias, o Grupo ALN apresentou porcentagem de fibras colágenas maduras significativamente maior que o Grupo Controle. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o ALN coadjuvante à RAR, sozinho ou associado à aPDT, aumentou a maturação das fibras colágenas nos estágios iniciais e finais do tratamento da PE induzida em ratos.

Palavras-chave: alendronato; fotoquimioterapia; periodontite; histoquímica; rato.

ABSTRACT

Influence of alendronate, photodynamic therapy or their combination as adjuncts to scaling and root planing for the treatment of experimental periodontitis. Histochemical study in rats

The purpose of this study was to evaluate the influence of topical sodium alendronate (ALN), photodynamic therapy (aPDT) or a combination thereof as adjuvant to scaling and root planing (SRP) in the treatment of experimental periodontitis (EP) induced in rats. EP was induced in 96 rats with a ligature around the mandibular left first molar. After 7 days of induction, the ligature was removed, and the animals were treated according to the following experimental groups (n = 8): control - SRP plus saline solution; ALN - SRP plus ALN; aPDT - SRP plus methylene blue irrigation, followed by low-level laser therapy (LLLT); and ALN/aPDT - SRP plus ALN and methylene blue irrigation followed by LLLT. The animals were euthanized at 7, 15 and 30 days after the treatments. After the routine laboratory processing, the left molar was embedded in paraffin and 4 µm thick semi-serial sections were obtained in the mesio-distal direction. Some sections were subjected to histochemical reactions for picro Sirius red staining and analyzed under polarized light microscopy. Collagen maturation was evaluated, and data were analyzed statistically ($p < 0.05$). At 7 days, Group ALN presented higher percentage of immature collagen fibers than Group ALN/aPDT. At 30 days, Group Control presented higher percentage of immature collagen fibers than Group ALN. At 7 days, Group ALN/aPDT presented higher percentage of mature collagen fibers than Group ALN. At 30 days, Group ALN presented higher percentage of mature collagen fibers than Group Control. Within the limits of this study, it can be concluded that ALN coadjutant to SRP, alone or combined with aPDT, increased collagen fibers maturation in the initial and final stages of induced PE treatment in rats.

Keywords: alendronate; photochemistry; periodontitis; immunohistochemistry; rats.

LISTA DE SIGLAS

ad libitum	- A vontade
ALN	- Alendronato sódico
ALN/aPDT	- Alendronato e terapia fotodinâmica
AM	- Azul de metileno
aPDT	- Terapia fotodinâmica
BF	- Bifosfanato
BFs	- Bisfosfonatos
C	- Celsius
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
cm ²	- Centímetro quadrado
DP	- Doença periodontal
Dr.	- Doutor
Dra.	- Doutora
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
<i>et al.</i>	- <i>et alii</i>
FC	- Fatores de crescimento
FO/UFPel	- Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas
G	- Grama
GaAIs	- Arseneto de gálio e alumínio
IGF	- Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	- Interleucina-1
J	- Joules
J/cm ²	- Joules por centímetro quadrado
kg	Kilograma
LLLT	- Terapia com laser de baixa potência
LTDA	- Limitada
M	- Molar
mg	- Miligrama
mg/kg	- Miligrama por kilograma
mg/ml	- Miligrama por mililitro
MMP-13	- Metaloproteinase de matriz-13

MMP-3	- Metaloproteinase de matriz-3
MMP-8	- Metaloproteinase de matriz-8
MMPs	- Metaloproteinases
mW	- Miliwatts
Nm	- Nanômetros
PE	- Periodontite experimental
PRF	- Fibrina rica em plaquetas
Prof.	- Professor
Profa.	- Professora
RAR	- Raspagem e alisamento radicular
SP	- Estado de São Paulo
TNF	- Fator de necrose tumoral
UFPeI	- Universidade Federal de Pelotas
UNOESTE	- Universidade do Oeste Paulista
µm	- Micrometro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Área delimitando a região de interesse, região de furca do primeiro molar..... 49
- Figura 2 - Nível de maturação das fibras colágenas. Fotomicrografias ilustrando os estágios de maturação das fibras nos grupos Controle (A-C), aPDT (D-F), ALN (G-I), e ALN/aPDT (J-L), aos 07, 15 e 30 dias pós tratamento. Coloração com vermelho Picrosirius visualizado em microscopia de luz polarizada; 200x. Símbolos e siglas: ALN, alendronato sódico; ALNaPDT, alendronato sódico e terapia fotodinâmica; aPDT, terapia fotodinâmica..... 50
- Figura 3 - Proporção de fibras colágenas imaturas e maduras. Gráfico mostrando as médias e desvios-padrão das porcentagens de fibras colágenas imaturas, com comparações intergrupos aos 07, 15 e 30 dias pós-tratamento (A). Gráfico mostrando as médias e desviospadrão das porcentagens de fibras colágenas imaturas, com comparações inter-grupos aos 07, 15 e 30 dias pós-tratamento (B). Símbolos e siglas: *, $p < 0.05$; ALN, alendronato sódico; ALN/aPDT, alendronato sódico e terapia fotodinâmica; aPDT, terapia fotodinâmica..... 51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivo específico	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Apreciação ética	20
3.2	Modelo experimental	21
3.3	Indução da periodontite e tratamentos.....	21
3.4	Protocolo de aplicação da LLLT.....	22
3.5	Processamento tecidual.....	23
3.6	Análise histoquímica	24
3.7	Análise estatística	24
4	RESULTADOS	24
4.1	Análise histoquímica.....	24
4.1.1	Fibras colágenas imaturas.....	25
4.1.2	Fibras colágenas maduras.....	25
5	DISCUSSÃO	26
6	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS	36
	FIGURAS.....	49
	ANEXO A – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS - UFPEL ..	52
	ANEXO B – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO - JOURNAL OF PERIODONTOLOGY.....	53

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é uma patologia crônica inflamatória caracterizada pela perda das estruturas de suporte do dente por meio da destruição do osso alveolar e da inserção conjuntiva^{1,2}.

Patógenos presentes no biofilme bacteriano se alojam em áreas subgingivais e produzem lipopolissacarídeos e proteases². Nesse momento, o sistema imunológico do hospedeiro promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias diretamente relacionadas à degradação tecidual. Metaloproteinase de matriz-8 (MMP-8) aparecem em quantidade aumentada no fluido gengival crevicular de pacientes com DP - evidenciando sua possível coparticipação no processo inflamatório de degradação tecidual ocorrido com a instalação da doença³⁻⁵.

A técnica de coloração pelo Vermelho Picrosirius é muito empregada por ser específica para o estudo de fibras colágenas^{6,7}. As fibras colágenas coradas com a técnica do Vermelho Picrosirius e analisadas em microscopia de luz polarizada reportaram que todas as variações de cor são decorrentes do nível de maturação e espessamento progressivos das fibras colágenas do tipo I, onde as fibras verdes/amarelas são as imaturas, enquanto que as fibras vermelhas são as mais maduras^{8,9}.

O tratamento convencional da DP é fundamentado na redução da microbiota periodontopatogênica por meio do procedimento de raspagem e alisamento radicular (RAR)^{10,11}. Entretanto, a terapia mecânica pode ser falha na eliminação de bactérias localizadas em áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais¹². Em casos desse tipo, a realização do tratamento químico coadjuvante à terapia mecânica pode ser indicada^{13,14}.

A modulação da resposta imune auxilia o hospedeiro na luta contra agentes infecciosos ao suplementar os mecanismos de defesa naturais e/ou modificar o curso do processo inflamatório, diminuindo seus efeitos indesejados, apresenta, potencialmente, menos efeitos colaterais, pouca invasibilidade e métodos de aplicação não complicados¹⁵⁻¹⁷.

Três categorias principais de agentes moduladores da resposta do hospedeiro são, atualmente, consideradas: (1) antiproteinases, com o objetivo de inibir MMPs, representadas pelas tetraciclinas; (2) drogas anti-inflamatórias, para inibição de citocinas pró-inflamatórias; e (3) drogas inibidoras da reabsorção óssea, representadas pelos bisfosfonatos (BFs)¹⁸.

Os BFs, por apresentarem grande afinidade pelo íon cálcio, a matriz óssea mineral é o destino natural da droga¹⁹. A administração dos BFs promove, principalmente, a inibição do recrutamento e da atividade osteoclásticas, além disso, alguns estudos relatam a capacidade dos BFs em diminuir diversas MMPs envolvidas na destruição dos tecidos periodontais^{20,21}. O alendronato sódico (ALN) é um aminobisfosfonato que atua como potente inibidor da reabsorção óssea. Sua administração sistêmica possui efeitos positivos na proliferação e maturação osteoblásticas, o que o torna um acelerador da formação de matriz óssea^{22,23}. Alguns relatos sugerem uma possível associação entre o uso sistêmico do ALN e o desenvolvimento da osteonecrose dos maxilares^{24,25}.

Estudos clínicos controlados e estudos em animais avaliaram a eficiência do uso local do gel de ALN adjunto a RAR no tratamento da DP, buscando evitar os efeitos adversos do uso sistêmico dos BFs²⁶⁻³² demonstrando uma nova possibilidade terapêutica na Periodontia com o uso do ALN.

Recentemente, foi avaliada clínico-radiograficamente, a eficácia do gel de ALN 1% em combinação com fibrina rica em plaquetas (PRF) e PRF isoladamente, no tratamento de defeitos de furca de grau II e demonstraram que os defeitos tratados com PRF + ALN exibiram melhores resultados clínicos e radiográficos sugestivos de regeneração periodontal aumentada quando comparada com locais tratados apenas com PRF³².

Estudos in vitro mostram resultados promissores do uso da terapia com laser de baixa potência (LLLT) nas células e nos tecidos periodontais, demonstrando efeitos positivos desta terapia quando utilizada em fibroblastos da gengiva e do ligamento periodontal³³⁻³⁸ e também em células-tronco do ligamento periodontal³⁹. A LLLT age por meio da estimulação na proliferação fibroblástica e, conseqüentemente, na liberação dos fatores de crescimento (FC)³⁶. Evidências de estudos clínicos indicam que a LLLT é benéfica para a cicatrização periodontal ao ser utilizado após a RAR no tratamento da gengivite^{40,41} e da periodontite⁴²⁻⁴⁴.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é outra abordagem alternativa investigada na relação da ação local de agentes antimicrobianos, constituída pela associação da LLLT a um corante fotoativado não tóxico⁴⁵. Sua ação terapêutica está baseada na ligação do agente fotossensível às células-alvo para, por meio da luz visível, induzir um estresse oxidativo aos patógenos microbianos - representando um tratamento alternativo às medicações sistêmicas em casos de infecções localizadas⁴⁵⁻⁴⁷. Estudos em animais demonstram que a aPDT promove um controle na progressão da PE por meio, principalmente, dos seus efeitos antimicrobianos⁴⁸⁻⁵².

A progressão da DP pode acarretar a perda do elemento dental, comprometendo funcional e esteticamente o indivíduo acometido. Métodos terapêuticos para o controle da progressão da periodontite, que visem o equilíbrio

entre a ação bacteriana e a resposta imune tecidual, bem como a redução e/ou eliminação da carga bacteriana, são bastante abordados na pesquisa científica atual. A presente proposta traz uma nova abordagem terapêutica que objetiva associar o efeito antirreabsortivo do ALN com as ações bactericidas e de estímulo celular da aPDT no tratamento da DP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do alendronato (ALN), da terapia fotodinâmica (aPDT), ou a associação de ambas as terapias adjuntas à raspagem e alisamento radicular (RAR) no tratamento da periodontite experimental (PE) induzida em ratos.

2.2 Objetivo específico

Avaliar o grau de maturação do colágeno nos tecidos periodontais (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar) aos 7, 15 e 30 dias após a realização dos diferentes tratamentos, através do método do Vermelho Picrosirius associado à microscopia de luz polarizada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Apreciação ética

A pesquisa foi realizada respeitando-se os princípios éticos da experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação

Animal e a legislação em vigor. O Projeto de Pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FO/UFPel) (no. 23110004923-2015/83) (Anexo A).

3.2 Modelo experimental

Noventa e seis ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), pesando entre 250 e 300 g provenientes do Biotério do Campus do Capão do Leão da UFPel foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24° C. Durante todo o experimento, os animais receberam ração sólida selecionada e água *ad libitum*. Os animais foram divididos nos seguintes 4 grupos experimentais: Grupo Raspagem e Alisamento Radicular (RAR); Grupo Alendronato (ALN); Grupo Terapia Fotodinâmica (aPDT); Grupo Alendronato e terapia fotodinâmica (ALN/aPDT). Cada grupo experimental foi subdividido em 3 subgrupos (n=8) para eutanásia aos 7, 15 ou 30 dias pós-operatórios.

3.3 Indução da periodontite e tratamentos

Para realização de todos os procedimentos experimentais, os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6 mg/kg) e de quetamina (70 mg/kg). Os animais foram posicionados em uma mesa especialmente adaptada para a abertura bucal, facilitando a visualização do primeiro molar inferior. Para indução da periodontite, uma ligadura de algodão (Corrente Algodão nº 24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) foi inserida ao redor do primeiro molar inferior esquerdo de todos os animais e mantida em posição subgingival por meio de nós cirúrgicos.

Após 7 dias de indução da doença, todos os animais foram novamente anestesiados e as ligaduras foram removidas. Imediatamente após a remoção das ligaduras, os animais receberam os seguintes tratamentos de acordo com os grupos experimentais: no Grupo RAR, foi realizada a RAR e irrigação da bolsa periodontal com soro fisiológico; no Grupo ALN, foi realizada a RAR e irrigação da bolsa periodontal com alendronato sódico (10^{-5} M)³⁰; no Grupo aPDT, foi realizada a RAR, irrigação da bolsa periodontal com azul de metileno e irradiação da bolsa com LLLT; no Grupo ALN/aPDT, foi realizada a RAR, irrigação da bolsa periodontal com alendronato sódico (10^{-5} M) associado ao azul de metileno, e irradiação da bolsa com LLLT.

O procedimento de RAR foi realizado com curetas manuais “*mini-five*” nº 5/6 (Hu-friedy, Chicago, IL, Estados Unidos) através de 10 movimentos de tração distomesial 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 RAR foram realizados por um mesmo operador experiente.

3.4 Protocolo de aplicação da LLLT

Os animais dos grupos aPDT e ALN/aPDT foram submetidos à irradiação com LLLT. Para os tratamentos, foi utilizado o laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAIAs) (GaAIAs; Laser Bio Wave LLLT; Kondortech Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil), com o seguinte protocolo de aplicação:

- Comprimento de onda: 660 nanômetros (nm), laser visível; Potência de saída: 30 miliwatts (mW); Modo de emissão: laser contínuo; Modo de aplicação: laser contato pontual; Área de aplicação do laser: a irradiação do laser foi realizada

com a ponteira direcionada para o interior da bolsa periodontal em 3 pontos eqüidistantes na superfície vestibular (mesial, média e distal) e 3 pontos eqüidistantes na superfície lingual (mesial, média e distal); Energia: 0,14 joules (J) / ponto; Densidade de energia pontual: 4,95 J/cm²; Tempo de exposição pontual: 4,66 segundos; Densidade de energia total: 29,58 J/cm².

Nos grupos aPDT e ALN/aPDT, as bolsas foram irrigadas com AM e ALN (1mg/ml) associado ao AM, respectivamente; as soluções permaneceram no interior da bolsa durante 1 minuto, e logo após foi realizada a aplicação da LLLT.

3.5 Processamento tecidual

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 7, 15 e 30 dias após a realização dos tratamentos locais da DP por meio de superdosagem anestésica de tiopental (150 mg/kg) (Cristália, Produtos químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil). As mandíbulas esquerdas foram removidas e fixadas em solução de formol tamponado a 4%, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%. As peças foram, então, processadas e incluídas em parafina. Após a inclusão dos espécimes em parafina, cortes semi-seriados (4 µm) foram obtidos no sentido méso-distal.

Os cortes histológicos foram deparafinizadas, hidratadas e imersos em solução de sirius F3BA em ácido pícrico aquoso por 1 hora. As secções coradas foram lavadas em dois banhos de solução de ácido acético a 0,5% por 1 minuto. Após desidratação, as secções protegidas com meio de montagem e lamínula de vidro.

3.6 Análise histoquímica

As lâminas histológicas foram analisadas sob microscopia de luz polarizada (200x). A distribuição espacial das fibras colágenas foi avaliada com a função de limite de cores de um programa ImageJ 1.51p (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), através da identificação de áreas de diferentes matizes que permitirão a quantificação das áreas ocupadas por diferentes cores, seguindo a metodologia proposta⁵³.

3.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos a verificação de normalidade pelo teste de análise de variância (ANOVA). Para verificar as diferenças entre os grupos e intragrupos foi realizada a análise de variância dois fatores seguido pelo pós-teste de Tukey. Os testes consideraram um nível de significância de 5% e foram realizados no software Prism GraphPad (v6.01)

4 RESULTADOS

4.1 Análise histoquímica

A distribuição espacial das fibras colágenas foi avaliada com a função de limite de cores, na área de interesse (Fig. 1). Em todos os espécimes analisados, a área de interesse mostrou-se ocupada por fibras colágenas, tanto imaturas como maduras, com variadas proporções entre os níveis de maturação (Fig. 2).

As médias e os desvios-padrão das porcentagens de fibras colágenas imaturas e maduras, aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamento, com comparações intergrupos estão apresentados na Fig. 3.

4.1.1 Fibras colágenas imaturas

Na análise intergrupos, aos 7 dias, o Grupo ALN apresentou porcentagem de fibras colágenas imaturas significativamente maior que o Grupo ALNaPDT. Aos 15 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Aos 30 dias, o Grupo Controle apresentou porcentagem de fibras colágenas imaturas significativamente maior que o Grupo ALN.

Na análise intragrupos, o Grupo Controle 30 dias apresentou porcentagem de fibras colágenas imaturas significativamente maior que o Grupo Controle 15 dias. O Grupo APDT 7 dias apresentou porcentagem de fibras colágenas imaturas significativamente maior que o Grupo APDT 15 dias. O Grupo ALN 7 dias apresentou porcentagem de fibras colágenas imaturas significativamente maior que os grupos ALN 15 e 30 dias. O Grupo ALN/aPDT 30 dias apresentou porcentagem de fibras colágenas imaturas significativamente maior que o Grupo ALN/aPDT 15 dias.

4.1.2 Fibras colágenas maduras

Na análise intergrupos, aos 7 dias o Grupo ALNaPDT apresentou porcentagem de fibras colágenas maduras significativamente maior que o Grupo ALN. Aos 15 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Aos 30 dias, o Grupo ALN apresentou porcentagem de fibras colágenas significativamente maior que o Grupo Controle.

Na análise intragrupos, o Grupo aPDT 15 dias apresentou porcentagem de fibras colágenas maduras significativamente maior que o Grupo aPDT 7 dias. O Grupo ALN 30 dias apresentou porcentagem significativamente maior de fibras colágenas maduras que o Grupo ALN 7 dias.

5 DISCUSSÃO

O modelo animal utilizado no presente estudo foi escolhido considerando que o uso dos ratos em pesquisa oferece a possibilidade de englobar vários tipos de doenças, além de algumas vantagens como a facilidade de manipulação, uma fisiologia parecida com a dos seres humanos, além de possuírem um metabolismo que possibilite a observação de eventos em um período de tempo relativamente menor^{2,51,54}. O modelo de periodontite experimental induzida por ligadura permite reproduzir e avaliar a progressão da doença periodontal. Este modelo é amplamente utilizado, favorecendo uma maior resposta inflamatória e anti-inflamatória nos tecidos gengivais, comparados com sítios sem ligadura⁵⁵.

Várias terapias adjuntas a RAR vêm sendo propostas para o tratamento da DP. No presente estudo, analisamos o grau de maturação das fibras colágenas na periodontite experimental induzida em ratos, utilizando o modelo da periodontite induzida por ligadura, após a RAR e outros tratamentos adjuntos a RAR. Assim como em estudos prévios, a cicatrização foi avaliada aos 07, 15 e 30 dias após iniciado os tratamentos, com objetivo de acompanhar os diferentes estágios do período de reparo^{30, 51}.

Quando a reabsorção óssea excede a formação, devido a um processo patológico, leva à perda óssea. A remodelação óssea, ou seja, a renovação do tecido ósseo, é essencial para a homeostase⁵⁶. O desequilíbrio desta homeostase é também observado na doença periodontal, a qual é caracterizada como infecção multifatorial e por uma complexas espécies bacterianas que interagem com as células hospedeiras e tecidos, causando a libertação de citocinas pró-inflamatórias que destroem os tecidos de suporte periodontais, incluindo osso alveolar². Os efeitos de sinalização para a reabsorção óssea por osteoclastos são disparados pela

doença periodontal, sendo que as células da linha osteoblástica controlam o processo de diferenciação das células da linha osteoclástica, através de um eixo de regulação comum, mais conhecido por RANKL/RANK/OPG⁵⁷. Os osteoblastos são responsáveis pela produção da matriz orgânica do osso, bem como pela sua mineralização, a qual é constituída de várias proteínas colágenas e não colágenas⁵⁸. A reabsorção osteoclástica do osso durante a atividade dos osteoclastos é controlada cooperativamente pelo ativador do receptor de interleucina-6, interleucina-1, e duas moléculas de ossos importantes, o fator kappa nuclear β ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG)⁵⁹. Na periodontite, ocorre diminuição dos níveis de OPG e o aumento da produção de RANKL no fluido crevicular gengival que pode favorecer osteoclastogese. Por contraste, os bisfosfonatos afetam o sistema de RANKL / OPG e produção de IL-6 em osteoblastos / células semelhantes a osteoblastos, aumentando a produção de OPG e diminuindo a produção de RANKL e IL-6, alterando, assim, a produção local de moléculas por osteoblastos que são centrais para ativação de osteoclastos⁶⁰. Como a produção de colágeno está envolvida no processo de formação e reabsorção ósseas, o presente estudo avaliou a maturação do colágeno durante o processo de cicatrização periodontal.

Bifosfonatos são análogos sintéticos do pirofosfato nos quais a ponte de oxigênio é substituída por um carbono (P-C-P), formando duas cadeias principais (R1 e R2). O poder de reabsorção e o mecanismo de ação do fármaco são determinados pela cadeia longa R2. Possui semelhança ainda ao pirofosfato em sua ligação com a hidroxapatita do osso⁶¹. Os BPs que contem nitrogênio, como alendronato e pamidronato, inibem diretamente a função dos osteoclastos e causam apoptose. Através destas ações, os BPs inibem a renovação óssea e a reparação de micro danos. A inibição da angiogênese, que pode ser causada pelos BPs,

compromete o suprimento vascular, podendo inibir a cicatrização, com isto, traumas e infecções na área, podem resultar em osteonecrose localizada⁶⁰.

O mecanismo de ação de aPDT baseia-se em um agente fotossensibilizante ligar-se a uma célula alvo, ativado por meio de irradiação de baixa dose e com luz visível de comprimento de onda adequado, assim, este agente passa do seu estado fundamental para um estado animado. Após a sua ativação, as moléculas de oxigénio reativas e outras substâncias que são produzidas geram um estresse oxidativo produzindo uma ação citotóxica⁶². Dois mecanismos potenciais geram a ação bactericida molecular de aPDT. Um deles produz danos no DNA⁶³ resultando em degenerações da membrana citoplasmática das bactérias⁶⁴ através do agente fotossensibilizante ativado que pode reagir com as biomoléculas circundantes em 2 formas diferentes: A primeira é provocando uma reação de transferência de elétrons entre o agente ativado e as moléculas das células vizinhas, e através da libertação de radicais livres que são altamente reativos e interagem com as moléculas de oxigénio endógeno produzindo derivados de oxigénio altamente reativos, tais como superóxidos, hidroxilos, e peróxido de hidrogénio, que danificam a integridade das membranas celulares bacterianas, causando danos biológicos irreversível. A segunda via reacional é produzida pela reação entre o agente fotossensibilizante ativado com o oxigénio, que gera oxigénio singleto, gerando uma reatividade química que desencadeia danos oxidativos e efeitos letais sobre bactérias⁶⁵.

Na literatura são poucos os estudos que relacionam o uso da aPDT com o ALN para tratamento da doença periodontal. A grande maioria dos artigos relatam o uso da aPDT para evitar o aparecimento da necrose óssea dos maxilares, quando da utilização de bisfosfonatos^{66,67,68}, ou da associação da aPDT com um antibiótico para o tratamento da doença periodontal^{69,70}.

Um dos estudos acima avaliou a eficácia da aPDT e o uso de um antibiótico, minociclina pomada (MO), em marcadores clínicos e bacteriológicos e a resposta inflamatória local do hospedeiro; em um ensaio clínico onde a administração MO local exibiu uma diminuição significativa nos resultados para os parâmetros clínicos, contagens bacterianas, interleucina-1 β e níveis de interferon- γ , 1 e 4 semanas após o tratamento. Nenhuma alteração significativa foi observada no grupo aPDT, exceto nos parâmetros clínicos⁶⁹.

Em uma revisão sistemática e meta-análise, comparou-se o tratamento com a aPDT adjunto à SRP produzindo melhores resultados clínicos do que os antibióticos periodontais como adjuvante da SRP na periodontite. Apesar da pequena amostragem, concluíram que é discutível se aPDT é mais eficaz em comparação com uso de antibióticos adjuvante no tratamento da periodontite, uma vez que a evidência científica é fraca⁷¹.

Em um estudo clínico, associou um antibiótico sistêmico juntamente com uma única aplicação de aPDT, avaliou, assim, o efeito local de claritromicina associada com aPDT no tratamento da periodontite agressiva generalizada em bolsas periodontais em dentes unirradiculares, onde concluiu que o desbridamento periodontal ultra-sônico apresentou maiores vantagens clínicas quando associado à claritromicina do que associado à aPDT, sendo que a aplicação conjunta de aPDT e claritromicina não apresentou benefícios adicionais⁷⁰.

Um grupo de autores avaliou os possíveis efeitos sinérgicos da combinação de aPDT e ALN sobre a perda óssea em periodontite induzida em ratos, que foram randomizados nos seguintes grupos: controle (Grupo 1); aPDT (Grupo 2); ALN 0,01 mg / kg (Grupo 3); ALN 0,25 mg / kg (Grupo 4); aPDT +ALN 0,01 mg / kg (grupo 5);

e aPDT + ALN 0,25 mg / kg (Grupo 6), sendo que os grupos que utilizaram o ALN, o mesmo foi dissolvido em solução salina estéril a 0,9% e administrado por via subcutânea. O grupo ALN 0,25 mg / kg, apresentou menor perda óssea e atividade inflamatória e maior densidade mineral óssea, com relação aos demais grupos⁶⁵.

O efeito da aPDT no sítio de extração dental de ratas tratadas com doses oncológicas de zoledronato, que apresentam os principais fatores de risco para o desenvolvimento de necrose óssea dos maxilares, onde as mesmas foram divididas nos seguintes grupos de tratamento: SAL (solução salina) , ZOL (zoledronato), SAL/aPDT e ZOL/aPDT, com injeções intraperitoneais de 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (SAL e SAL/aPDT) ou 0,45 ml da mesma solução acrescida de 100µg/Kg de zoledronato (ZOL e ZOL/aPDT), sendo que o grupo ZOL apresentou incompleta restituição da mucosa sobrejacente ao sítio de extração dental, inúmeras áreas osteonecroticas nas adjacências do alvéolo dental, menor tecido ósseo neoformado, maior percentagem de fibras colágenas imaturas e menor porcentagens de fibras colágenas maduras, já o grupo ZOL/aDPT apresentou os melhores resultados em todos os parâmetros avaliados⁶⁸.

Em nosso estudo o ALN apresentou uma maior quantidade de fibras colágenas imaturas quando comparado ao ALNaPDT aos 7 dias após o início dos tratamentos, e o Grupo ALNaPDT apresentou uma maior quantidade de fibras colágenas maduras em comparação ao Grupo ALN, neste mesmo período.

Uma possível explicação para isto poderia ser a dose de ALN utilizada (10^{-5} M). Altas doses deste medicamento podem levar a um efeito tóxico na função osteoclástica e comprometer o processo de remodelação óssea, sugerindo que o ALN afeta os osteoclastos de forma dose-dependente⁷². Por este mesmo motivo, a

liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, nos tecidos periodontais, poderia aumentar o processo inflamatório, prejudicando o reparo periodontal^{73,74}. A capacidade do ALN de inibir a diferenciação osteoclástica induzida por bactérias in vitro foi avaliada⁷⁵ e esses autores utilizaram a mesma dosagem de ALN que a do presente estudo (10^{-5} M), e demonstraram que apesar desta dose possuir um efeito inibitório na formação de osteoclastos, ela não reduz o nível de IL-6 in vitro. Assim, sugere-se que o fármaco pode ter influenciado a produção local de citocinas inflamatórias e, conseqüentemente, aumentando a quantidade de fibras colágenas imaturas. Autores relataram que a proliferação, capacidade de migração e adesão intercelular podem ser diminuídas significativamente pelos BPs. Evidenciaram que o mesmo também influencia na maturação dos queratinócitos, todos esses eventos são essenciais para o processo de regeneração do tecido epitelial^{76,77}. Os efeitos negativos sobre os fibroblastos exercidos pelos BPs, comprometendo a sua proliferação, foram relatados^{78,79}. Relataram os efeitos negativos sobre fibroblastos quanto sua motilidade⁸⁰ e sobre a produção de elementos da matriz extracelular, em especial do colágeno⁸¹.

A aPDT provavelmente contribuiu na inativação de microrganismos associados com o condições patológicas do periodonto⁸², em menos de recrutamento de osteoclastos e inferior imunomarcção RANKL em comparação SRP⁵², na redução da fase inflamatória, aumento da microcirculação local e estímulo a angiogénese³⁸, mas esta ação foi mais eficaz nos estágios iniciais, após o início dos tratamentos, fato este já observado^{70,83}. O efeito sinérgico na associação do ALN com aPDT, com melhorias no sobre a perda óssea alveolar na periodontite induzida, já foi demonstrado⁸⁴, indo de encontro com os resultados de nosso estudo.

Já aos 30 dias, o Grupo Controle apresentou porcentagem de fibras colágenas imaturas significativamente maior que o Grupo ALN, e o Grupo ALN apresentou porcentagens de fibras maduras significativamente maior que o Grupo Controle, neste mesmo período; efeito este que pode ter sido beneficiado por uma ação anti-inflamatória. O ALN, em forma de gel, pode influenciar uma revogação da produção de interleucina-6 pelo em células osteoblásticas, podendo afetar atividade osteoclástica^{85,86}, pode exercer um efeito antimicrobiano⁸⁷; um aumento da produção de OPG⁸⁸, diminuição da produção de RANKL⁶⁰, e uma inibição de reabsorção óssea osteoclástica com propriedades osteoestimuladoras e de formação de matriz⁸⁶.

Uma pesquisa utilizando de uma metodologia semelhante ao nosso estudo, avaliou histomorfometricamente o uso de solução de 1ml de ALN (10^{-5} M), como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico da periodontite experimental em ratos, sendo que aos 30 dias após o início dos tratamentos, o grupo tratado com RAR + ALN o tecido conjuntivo mostrou-se isento de inflamação com o septo interradicular bastante regular com osteócitos vitais e raros eram osteoclastos, já o grupo tratado apenas com RAR, aos 30 dias, ainda possuía infiltrado inflamatório, apesar de uma redução quando comparado aos 7 dias³⁰.

Um estudo clínico comparou a eficácia de 1% ALN e o gel de aloe vera (AV) como um complemento à raspagem e alisamento radicular (SRP) na periodontite crônica pacientes com defeitos de furca classe II. Parâmetros clínicos e radiográficos foram registrados no início e aos 6 e 12 meses, onde a redução média da profundidade de sondagem, o nível de inserção clínica horizontal relativa (CAL) e os ganhos relativos de CAL vertical foram maiores no grupo ALN do que nos grupos AV e placebo aos 6 e 12 meses. Além disso, uma porcentagem média

significativamente maior de redução de profundidade de defeitos (DDR) foi encontrada no grupo ALN do que os grupos AV aos 6 e 12 meses, respectivamente⁸⁹.

Pesquisadores utilizando um gel de ALN 1%, testaram sua eficácia comparado com o gel placebo com um sistema de entrega de droga local, como adjuvante da SRP para o tratamento de defeitos intra-ósseos, em pacientes com periodontite crônica, e concluíram que a aplicação de 1% ALN na bolsa periodontal estimulou um aumento significativo na redução de sondagem de profundidade, ganho de nível clínico e melhoria de preenchimento de osso em comparação com um gel de placebo, como adjuvante ao SRP²⁷.

O gel de alendronato a 1% foi testado como adjuvante da terapia mecânica no tratamento da periodontite crônica em fumantes, onde mostrou que 1% de ALN estimulou um aumento significativo na redução da DP, ganho de inserção periodontal e melhor preenchimento ósseo em comparação com o gel placebo na periodontite crônica entre os fumantes⁸⁶.

Um estudo examinou histopatologicamente se a administração local de aminobifosfonato (ALN) poderia ser eficaz na prevenção da reabsorção óssea do alvéolo associada a retalhos mucoperiosteais, através de um pellet cirúrgico embebido com aminobifosfonato aplicado localmente na superfície óssea exposta e coberto por retalho, os resultados mostraram que, embora não houvesse diferenças estatisticamente significativas detectáveis entre o e grupos tratados com alendronato na inflamação existente e número de osteoclastos e osteoblastos atividade, os resultados para o componente fibrótico e colágeno (com feixes densamente

dispostos e bem formados de fibras de colágeno), morfologias dos osteoclastos e lacunas de reabsorção existentes foram estatisticamente significante⁹⁰.

O fato de os Bisfosfonatos serem fármacos que apresentam uma molécula bastante estável, além de uma alta afinidade pela hidroxiapatita do osso, ficando retidos no tecido ósseo na forma inativa, por um longo período, sendo liberados localmente durante os processos de reabsorção óssea⁹¹. Em colaboração com o resultado de nosso trabalho, onde mesmo tendo apresentado valores maiores de fibras colágenas imaturas e menores de fibras colágenas maduras, na fase inicial de tratamento, Grupo ALN 7 dias, pode apresentar menos fibras colágenas imaturas e mais fibras colágenas maduras, que os demais grupos, na fase final de tratamento, Grupo ALN 30 dias. A melhoria gradual do processo inflamatório, juntamente com a diminuição da osteoclastogênese ao longo do período de tratamento do grupo tratado com ALN, e uma diminuição gradual do efeito anti-inflamatório juntamente com o da microcirculação local e estímulo a angiogênese do grupo tratado com ALN/aPDT, possa ser uma explicação pelo fato que aos 15 dias após o início dos tratamentos não ter havido diferenças estatísticas significativas entre esses grupos.

Embora o uso de BF no tratamento da DP tenha sido avaliado em diversos estudos, poucas pesquisas tem investigado os efeitos de seu uso tópico^{27,32,84,85,86}. Apesar dos achados do presente estudo relacionados ao ALN apresentarem resultados favoráveis ao reparo ósseo, é importante que sejam confirmados com metodologias de estudo mais avançadas, para que haja a compreensão do processo cicatricial que ocorre nos tecidos periodontais na presença do bisfosfonato.

5 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o ALN coadjuvante à RAR, sozinho ou associado à aPDT, aumentou a maturação das fibras colágenas nos estágios iniciais e finais do tratamento da PE induzida em ratos.

REFERÊNCIAS

1. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* 1997;14:9-11.
2. Oktay S, Chukkapalli SS, Rivera-Kweh MF, Velsko IM, Holliday LS, Kesavalu L. Periodontitis in rats induces systemic oxidative stress that is controlled by bone-targeted antiresorptives. *J Periodontol* 2015;86(1):137-45. doi: 10.1902/jop.2014.140302.
3. Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch CA. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodontal Res* 1995;30(1):23-33.
4. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23(12):1127-32.
5. Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mäntylä P, Rönkä H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2000;27(5):66-9.
6. Montes GS, Junqueira LCU. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86(Suppl. 3):1-11.
7. Benevides BS. Alteração do perfil de colágeno de dentes extraídos de pacientes submetidos a radioterapia de cabeça e pescoço [tese]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2016.
8. Rich L, Whittaker P. Collagen and picrosirius red staining: A polarized light assessment of fibrilla hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci*

- 2005;22(2):97-104.
9. Guimaraes-Stabili MR, Aquino SG, Almeida Curylofo F et al. Systemic administration of curcumin or piperine enhances the periodontal repair: a preliminary study in rats. *Clin Oral Invest* 2018 nov 29. doi: <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2755-9>.
 10. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol* 1993;64(4):243-53.
 11. Pavone C, Perussi LR, Oliveira GJ et al. Effect of Er,Cr:YSGG laser application in the treatment of experimental periodontitis. *Lasers Med Sci* 2014 jan 30. doi: 10.1007/s10103-014-1526-3.
 12. Matia JI, Bissada NF, Maybury JE, Ricchetti P. Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1986;6(6):24-35.
 13. Buduneli E, Vardar S, Buduneli N et al. Effects of combined systemic administration of low-dose doxycycline and alendronate on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2004;75(11):1516-1523.
 14. Theodoro LH, Caiado RC, Longo M et al. Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. *Lasers Med Sci* 2014 apr 15. doi: 10.1007/s10103-014-1575-7.
 15. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2002;2(10):787-95.

16. Serhan CN. A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. *Histochem Cell Biol* 2004;122(4):305-21.
17. Rodrigues AZ, Kawata, VKS, Novaes Junior, AB et al. Estratégias terapêuticas e potenciais alvos para modulação da resposta do paciente periodontal. *Periodontia* 2009;19(1):14-21.
18. Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8(1):12-37.
19. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* 2011;49(1):2-19. doi: 10.1016/j.bone.2011.04.022.
20. De Colli M, Tortorella P, Agamennone M et al. Bisphosphonate matrix metalloproteinase inhibitors for the treatment of periodontitis: an in vitro study. *Int J Mol Med* 2018;42(1):651-657. doi: 10.3892/ijmm.2018.3641.
21. Nakaya H, Osawa G, Iwasaki N, Cochran DL, Kamoi K, Oates TW. Effects of bisphosphonate on matrix metalloproteinase enzymes in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 2000;71(7):1158-66.
22. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004;25(18):4105-15.
23. Tekin U, Tüz HH, Onder E, Ozkaynak O, Korkusuz P. Effects of alendronate on rate of distraction in rabbit mandibles. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66(10):2042-9. doi: 10.1016/j.joms.2008.06.023.
24. Malden N, Lopes V. An epidemiological study of alendronate-related osteonecrosis of the jaws. A case series from the south-east of Scotland with

- attention given to case definition and prevalence. *J Bone Miner Metab* 2012;30(2):171-82. doi: 10.1007/s00774-011-0299-z.
25. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2014;72(10):1938-56. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.031.
26. Buduneli E, Vardar-Şengül S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 γ 2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol* 2007;78(1):127-34. doi: 10.1902/jop.2007.050451.
27. Pradeep AR, Sharma A, Rao NS, Bajaj P, Naik SB, Kumari M. Local drug delivery of alendronate gel for the treatment of patients with chronic periodontitis with diabetes mellitus: a double-masked controlled clinical trial. *J Periodontol* 2012;83(10):1322-8.
28. Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 2012a;83(1):11-8. doi: 10.1902/jop.2011.110091.
29. Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% Alendronate Gel in adjunct to mechanotherapy in the treatment of aggressive periodontitis – a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 2012b;83(1):19-26. doi: 10.1902/jop.2011.110206.
30. Almeida J, Ervolino E, Bonfietti LH et al. Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. *J*

- Periodontol* 2015;86(10):1166-75. doi: 10.1902/jop.2015.150166.
31. Storrer CLM, Deliberador TM, Giovanini AF, Crivellaro V, Zielak JC, Romito GA. Effect of alendronate on the progression of periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: a study in rats. *Clin Oral Invest* 2016 mar 9. Doi: 10.1007/s00784-016-1769-4.
 32. Wanikar I, Rathod S, Kolte AP. Clinico-radiographic evaluation of 1 % Alendronate gel as an adjunct and smart blood derivative platelet rich fibrin in grade II furcation defects. *J Periodontol* 2019;90:52–60. doi: <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0146>.
 33. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 2001;29(2):179-84.
 34. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol* 2003;30(4):353-8.
 35. Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2005;76(2):187-93.
 36. Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2008;23(2):211-5.
 37. Choi EJ, Yim JY, Koo KT et al. Biological effects of a semiconductor diode laser on human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Implant Sci*

- 2010;40(3):105-10. doi: 10.5051/jpis.2010.40.3.105.
38. Kellesarian SV, Malignaggi VR, Majoka HA et al. Effect of laser-assisted scaling and root planing on the expression of pro-inflammatory cytokines in the gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis: a systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2017;18:63-77. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.02.010>.
39. Soares DM, Ginani F, Henriques ÁG, Barboza CA. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers Med Sci* 2015;30(3):1171-4. doi: 10.1007/s10103-013-1436-9.
40. Pejčić A, Kojović D, Kesic L, Obradović R. The effects of low level laser irradiation on gingival inflammation. *Photomed Laser Surg* 2010;28(1):69-74. doi: 10.1089/pho.2008.2301.
41. Igic M, Mihailović D, Kesic L et al. Cytomorphometric and clinical investigation of the gingiva before and after low-level laser therapy of gingivitis in children. *Lasers Med Sci* 2012;27(4):843-8. doi: 10.1007/s10103-011-0993-z.
42. Aykol G, Baser U, Maden I et al. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. *J Periodontol* 2011;82(3):481-8. doi: 10.1902/jop.2010.100195.
43. Obradović R, Kesić L, Mihailović D et al. A histological evaluation of a low-level laser therapy as an adjunct to periodontal therapy in patients with diabetes mellitus. *Lasers Med Sci* 2013;28(1):19-24. doi: 10.1007/s10103-012-1058-7.
44. Chen YW, Hsieh O, Chen YA, Chiou LL, Chang PC. Randomized controlled clinical effectiveness of adjunct 660-nm light-emitting diode irradiation during non-surgical periodontal therapy. *J Formos Med Assoc* 2019.

45. Banfi S, Caruso E, Buccafurni L et al. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on gram negative and gram positive bacteria. *J Photochem Photobiol B* 2006;85(1):28-38.
46. Sieroń A, Adamek M, Kawczyk-Krupka A, Mazur S, Ilewicz L. Photodynamic therapy (PDT) using topically applied delta-aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med* 2003;32(6):330-6.
47. Wainwright M, Crossley KB. Photosensitising agents: circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int Biodeterior Biodegradation* 2004;53(2):119-126.
48. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol* 2008a;79(6):1081-1088.
49. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* 2008b;79(11):2156-2165.
50. Fernandes LA, Almeida JM, Theodoro LH et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* 2009;36(3):219-28. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01355.x.
51. Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol* 2013;84(4):556-65. doi: 10.1902/jop.2012.120163.

52. Garcia VG1, Gualberto Júnior EC, Ervolino E, Nagata MJH, Almeida JM, Theodoro LH. aPDT for periodontitis treatment in ovariectomized rats under systemic nicotine. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018;22:70-78. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.02.017.
53. Kanno CM, Oliveira JA, Garcia JF, Castro AL, Crivelini MM. Effects of cyclosporin, phenytoin, and nifedipine on the synthesis and degradation of gingival collagen in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*): histochemical and MMP-1 and -2 and collagen I gene expression analyses. *J Periodontol* 2008;79(1):114-22.
54. Gupta A, Dai T, Hamblin, MR. Effect of red and near-infrared wavelengths on low-level laser (light) therapy-induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice. *Lasers Med Sci* 2013. doi: 10.1007/s10103-013-1319-0.
55. Dalcico R, Menezes AM, Deocleciano OB. Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. *Journal of Periodontology* 2013;84(8): 1145–57. doi: <http://doi.wiley.com/10.1902/jop.2012.120114>.
56. Reszka, AA, Rodan, GA. Mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Osteoporos Rep* 2003;1(2): 45–52.
57. Judas F, Palma P, Falacho RI, Figueiredo H. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. 2012. Available at: <https://core.ac.uk/download/pdf/61497217.pdf>. Accessed 10 april 2018.
58. Andia DC, Cerri PS, Spolidorio LC. Tecido ósseo : aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Rev Odontol UNESP* 2006;35(2):191-98.
59. Roskamp L, Vaz RS, Lima JHC. Fatores imunológicos envolvidos na reabsorção de tecido duro na doença periodontal. *Rev Bras Alerg Immunopatol* 2006;29(6): 250–5.

60. Tipton DA, Seshul BA, Dabbous MKH. Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis : RANKL , Osteoprotegerin and interleukin-6. *J Periodontal Res* 2011;46(1):39-47. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01306.x.
61. Sampaio FC, Veloso HHP, Barbosa DN. Mecanismos de ação dos bifosfonatos e sua influência no prognóstico do tratamento endodôntico. *Rev. Fac. Odontol Porto Alegre* 2010;51(1): 31-38.
62. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy : useful in the future? *Lasers Med Sci* 2007;22(2):83-91.
63. Fiel RJ, Datta-Gupta N, Mark EH, Howard JC. Induction of DNA damage by porphyrin photosensitizers. *Cancer Res* 1981;41(9 Pt 1):3543-5.
64. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy : a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3(5):436-50.
65. Camacho-Alonso F, Davia-Peña RS, Vilaplana-Vivo C, Tudela-Mulero MR, Merino JJ, Martínez-Beneyto Y. Synergistic effect of photodynamic therapy and alendronate on alveolar bone loss in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontal Res* 2018;53(3): 306–14.
66. Gegler A, Cherubini K, Figueiredo MAZ, Yurgel LS, Azambuja AA. Bisfosfonatos e osteonecrose maxilar : revisão da literatura e relato de dois casos. *Rev Bras Cancerol* 2006; 52(1): 25-31.
67. Statkiewicz C, Toro LF, Mello-Neto JM et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *J Photochem Photobiol B* 2018;184:7-17. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.05.004.
68. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF et al. Antimicrobial photodynamic therapy

- improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone* 2019;120:101–13. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.10.014>.
69. Hokari T, Morozumi T, Komatsu Y et al. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and local administration of minocycline on clinical , microbiological , and inflammatory markers of periodontal pockets : a pilot study. *Int J Dent* 2018. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/1748584>.
70. Andere NMRB, Santos NCC, Araujo CF et al. Evaluation of the local effect of nonsurgical periodontal treatment with and without systemic antibiotic and photodynamic therapy in generalized aggressive periodontitis. A randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;24:115-20. doi: [10.1016/j.pdpdt.2018.09.002](https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.09.002).
71. Akram Z, Hyder T, Al-Hamoudi N, Binshabaib MS, Alharthi SS, Hanif A. Efficacy of photodynamic therapy versus antibiotics as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2017;19:86-92. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.05.007>.
72. Bodde EW, Kowalski RS, Spauwen PH, Jansen JA. No increased bone formation around alendronate or omeprazole loaded bioactive bone cements in a femoral defect. *Tissue Eng Part A* 2008;14(1):29-39. doi: [10.1089/ten.a.2007.0086](https://doi.org/10.1089/ten.a.2007.0086).
73. Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG et al. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. *J Periodont Res* 1994;29:35-40.

74. Yamaguchi K, Motegi K, Iwakura Y, Endo Y. Involvement of Interleukin-1 in the Inflammatory Actions of Aminobisphosphonates in Mice. *Br J Pharmacol* 2000;130(7):1646-54.
75. Kum KY, Park JH, Yoo YJ, Choi BK, Lee HJ, Lee SJ. The inhibitory effect of alendronate and taurine on osteoclast differentiation mediated by porphyromonas gingivalis sonicates in vitro. *J Endod* 2003;29(1):28-30.
76. Saito T, Izumi K, Shiomi A et al. Zoledronic acid impairs re-epithelialization through down-regulation of integrin $\alpha v \beta 6$ and transforming growth factor beta signalling in a three-dimensional in vitro wound healing model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014;43(3): 373–80. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2013.06.016>.
77. Toro LF, Mello-Neto JM, Santos FFVD et al. Application of autologous platelet-rich plasma on tooth extraction site prevents occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws in rats. *Sci Rep* 2019;9(1):22. doi: 10.1038/s41598-018-37063-y.
78. Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi C, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014;43(8):1030-4. doi: 10.1016/j.ijom.2014.02.011.
79. Açil Y, Möller B, Niehoff P et al. The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;40(8): e229–35. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2011.10.024>.
80. Walter C, Pabst A, Ziebart T, Klein M, Al-Nawas B. Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of huvec, fibroblasts and osteoblasts in vitro.

- Oral Dis* 2011;17(2):194-9. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01720.x
81. Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS. Bisphosphonate Effects on the Behaviour of Oral Epithelial Cells and Oral Fibroblasts. *Archives of Oral Biology* 2011;56(5): 491–98. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.11.003>.
82. Barbosa FI, Araújo PV, Machado, LJC, Magalhães CS, Guimarães MMM, Moreira AN. Effect of photodynamic therapy as an adjuvant to non-surgical periodontal therapy: periodontal and metabolic evaluation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018;22:245-50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.04.013>.
83. Azaripour A, Dittrich S, Van Noorden CJF, Willershausen B. Efficacy of photodynamic therapy as adjunct treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci* 2018;33(2):407–23.
84. Ripplinger T. Protocolo para avaliação de frênulo lingual na primeira infância [dissertação]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas; 2017.
85. Monkkonen J, Simill J, Rogers MJ. Effects of tiludronate and ibandronate on the secretion of proinflammatory cytokines and nitric oxide from macrophages in vitro. *Life Sci* 1998;62(8):95-102.
86. Sharma A, Raman A, Pradeep AR. Role of 1 % Alendronate gel as adjunct to mechanical therapy in the treatment of chronic periodontitis among smokers. *J Appl Oral Sci* 2017;25(3). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0201>.
87. Hsu MT, Sturr G, Curran TM, Marquis RE. Inhibition of Streptococcal Growth, F-ATPase and Pyrophosphatase by Diphosphonates. *Oral Microbiol Immunol.* 1995;10(1): 47–53.

88. Kruszewska H, Zareba T, Tyski S. Search of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs. *Acta Pol Pharm* 2002;59(6):436-9.
89. Ipshita S, Kurian IG, Dileep P, Kumar S, Singh P, Pradeep AR. One percent alendronate and aloe vera gel local host modulating agents in chronic periodontitis patients with class ii furcation defects: a randomized, controlled clinical trial. *J Investig Clin Dent* 2018; 9(3):e12334. doi: 10.1111/jicd.12334.
90. Kaynak D, Meffert R, Günhan M, Günhan O, Ozkaya O. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol* 2000;71(5):790-6.
91. Nobre MDP, Fernandes RG, Chin CM, Faig-Leite H. Local action of sodium alendronate in bone repair of spontaneously hypertensive rat (SHR). *Arq Bras Cardiol* 2008;90(4): 239–46.

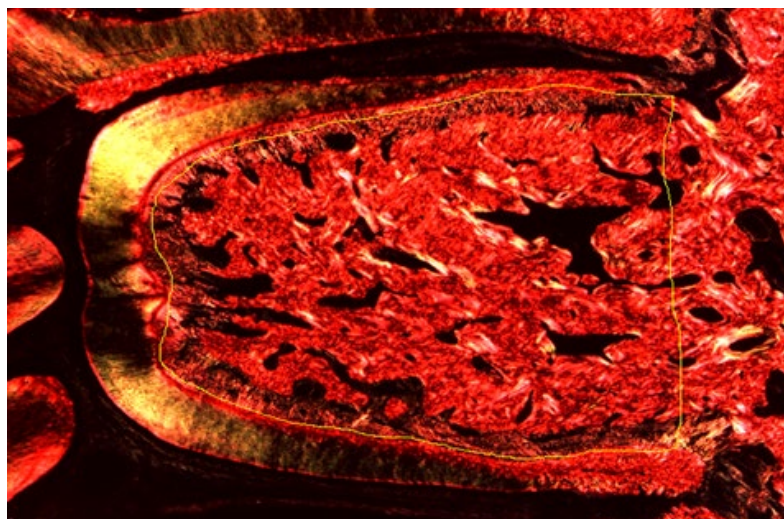
FIGURAS

Figura 1 - Área delimitando a região de interesse, região de furca do primeiro molar. Coloração com vermelho Picrosirius visualizado em microscopia de luz polarizada; 200x.

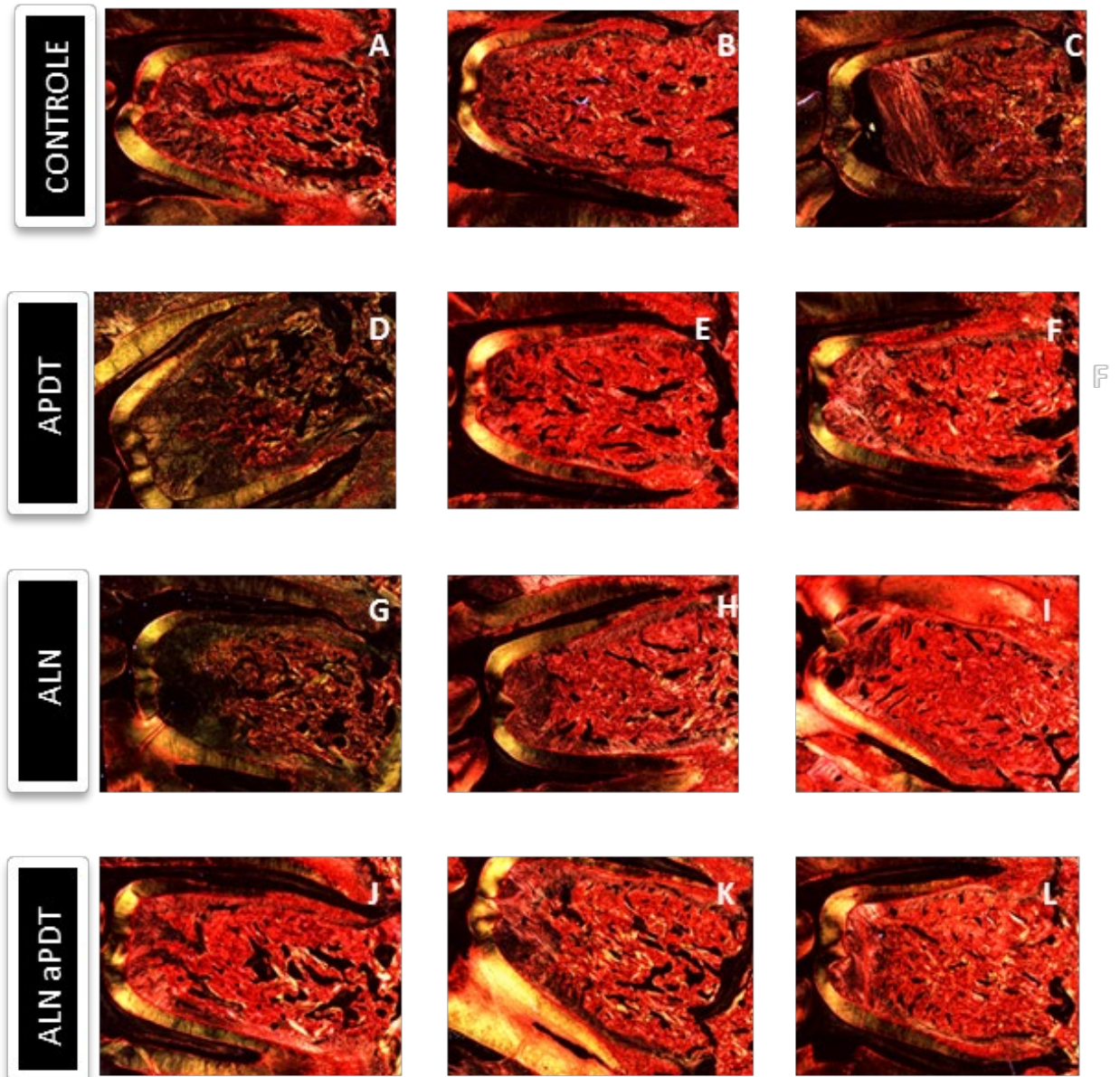


Figura 2 - Nível de maturação das fibras colágenas. Fotomicrografias ilustrando os estágios de maturação das fibras nos grupos Controle (A-C), aPDT (D-F), ALN (G-I), e ALNa/PDT (J-L), aos 07, 15 e 30 dias pós tratamento. Coloração com vermelho Picrosirius visualizado em microscopia de luz polarizada; 200x. Símbolos e siglas: ALN, alendronato sódico; ALNa/PDT, alendronato sódico e terapia fotodinâmica; aPDT, terapia fotodinâmica.

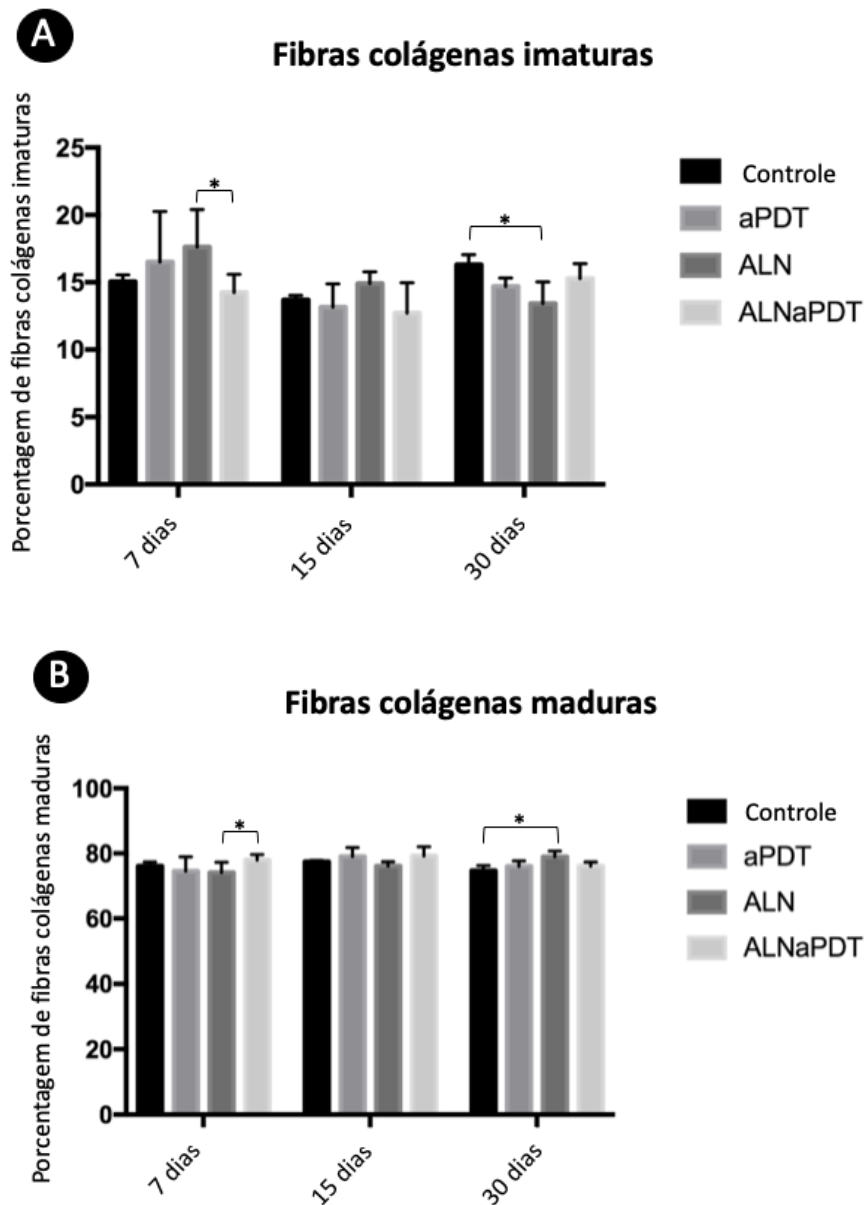
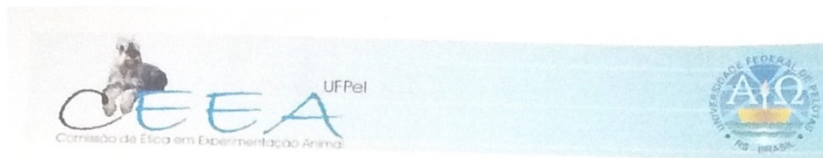


Figura 3 - Proporção de fibras colágenas imaturas e maduras. Gráfico mostrando as médias e desvios-padrão das porcentagens de fibras colágenas imaturas, com comparações intergrupos aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamento (A). Gráfico mostrando as médias e desvios-padrão das porcentagens de fibras colágenas maduras, com comparações inter-grupos aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamento (B). Símbolos e siglas: *, $p < 0.05$; ALN, alendronato sódico; ALNa/PDT, alendronato sódico e terapia fotodinâmica; aPDT, terapia fotodinâmica.

ANEXO A

**APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS - UFPEL**



Pelotas, 07 de outubro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Profª. Dra. Natália Marcumini Pola

Departamento de Semiologia e Clínica – Faculdade de Odontologia

Senhora Professora

A CEEA analisou o projeto intitulado “**Influência do alendronato sódico, da terapia fotodinâmica ou da associação de ambos como terapias adjuntas à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite experimental induzida** processo nº23110 004923/2015-83, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11 794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4923-2015).

Vigência do Projeto: 08/10/2015 a 01/09/2017

Espécie/Linhagem: *Rattus norvegicus*/ Wistar

Nº de animais: 210

Idade: 8 semanas

Sexo: Machos

Origem: Biotério Central/UFPEL

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável. *Natália Marcumini Pola* Ciente em: 09/11/2015

ANEXO B

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – JOURNAL OF PERIODONTOLOGY

Author Guidelines

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/ictpr/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.