



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

MARCELA LUCIO CALDEIRA

**INFLUÊNCIA DE IRRIGAÇÃO SUBGENGIVAL COM CAMOMILA E TANSAGEM
SOBRE O TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM
RATOS. ESTUDO MICROBIOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

Presidente Prudente - SP
2020



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

MARCELA LUCIO CALDEIRA

**INFLUÊNCIA DE IRRIGAÇÃO SUBGENGIVAL COM CAMOMILA E TANSAGEM
SOBRE O TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM
RATOS. ESTUDO MICROBIOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre – Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora:
Profa. Dra. Carolina dos Santos Santinoni

Presidente Prudente - SP
2020

D64
C146i

Caldeira, Marcela Lucio

Influência de irrigação subgengival com Camomila e Tansagem sobre o tratamento da doença periodontal experimental em ratos. Estudo microbiológico, histoquímico e imunoistoquímico / Marcela Lucio Caldeira; orientadora Carolina dos Santos Santinoni. – Presidente Prudente, 2020.

59 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2020.

Bibliografia.

1. Periodontite. 2. Fitoterapia. 3. Plantago major. 4.
Camomila. I. Santinoni, Carolina dos Santos. II. Título.

MARCELA LUCIO CALDEIRA

**INFLUÊNCIA DE IRRIGAÇÃO SUBGENGIVAL COM CAMOMILA E TANSAGEM
SOBRE O TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM
RATOS. ESTUDO MICROBIOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Presidente Prudente, 27 de abril de 2020.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Graziela Garrido Mori
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente – SP

Profa. Dra. Sonia Carina Morais da Silva
Universidade do Minho – Departamento de Engenharia Biológica
Braga - Portugal

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus pela Tua graça e infinita generosidade. Por colocar dentro de mim grandes sonhos e objetivos e me dar forças para superar cada obstáculo durante esta caminhada, me fazendo crer que nada é impossível e que perante qualquer dificuldade quem acredita no teu amor encontrará o caminho da superação.

Aos meus pais Edemilson e Vera pelo amor e cuidado, pelas infinitas orações, por sempre me apoiarem em todas as decisões e por não medirem esforços para que eu pudesse realizar este sonho.

A minha irmã Isabela por estar ao meu lado em todas as circunstâncias me incentivando e me fazendo acreditar que era possível esse objetivo.

E a minha família que jamais deixou de acreditar que eu seria capaz de conquistar tudo que almejasse.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos que se alegraram com as minhas conquistas e permaneceram comigo nos momentos difíceis.

Minha imensa gratidão, respeito e admiração a minha querida Orientadora Carolina dos Santos Santinoni pela parceria iniciada na IC, pela paciência e partilha de conhecimento, pelo incentivo e por acreditar no meu potencial nos momentos que até eu duvidava.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação – Mestrado em Odontologia da Universidade do Oeste Paulista de Presidente Prudente que me acompanharam desde a graduação, em especial professor Douglas Monteiro e professora Christine Men Martins, que além de participarem ativamente da construção deste trabalho, sempre estiveram dispostos a orientar e compartilhar ensinamentos, não apenas para formação acadêmica, mas também para a vida.

Aos amigos do Mestrado Vanessa Peret Jacob, Beatriz Fábregas, Vitor Genaro, Érika Ramalho, João Paulo Pelagio Toneto que compartilharam diversos momentos de aprendizado e de descontração e que foram fundamentais neste processo.

A querida Yara Loyanne Levi sempre prestativa e que não media esforços para ajudar no que fosse preciso. E também a querida Bianca Lima Neves que se deslocou até a FOA – UNESP para me auxiliar nas intermináveis reações de imunoperoxidação.

A Universidade do Oeste Paulista de Presidente Prudente pela oportunidade de desfrutar da rede de bibliotecas e dos laboratórios para o desenvolvimento deste estudo.

Aos profissionais envolvidos, em especial Mariana Fonseca, Alexandre Oliveira e a Talita Rizo do Laboratório de Técnicas Histopatológicas e Embriológicas e o Bruno Carrino do Laboratório da Pós Graduação que sempre se mostraram dispostos em ajudar e que foram fundamentais para que esse trabalho fosse concluído.

Ao Professor Edilson Ervolino por gentilmente disponibilizar seu tempo e conhecimento para a realização das análises nos Laboratórios do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. E seus orientandos Luan Toro, Isabella Zacarin, Eduardo e Vinicius Ganzaroli e o técnico André por me auxiliarem enquanto estive no departamento.

Ao Professor Thiago Martins da Universidade Federal de Pelotas (UFpel) pela parceria e disponibilidade neste estudo e em todos os outros que pudemos desenvolver juntos.

E por fim, porém não menos importante, os profissionais e colegas da Star Clin de Cornélio Procópio que me estenderem à mão e deram apoio necessário para que fosse possível a concretização deste sonho.

“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano. Sempre que alguém descobre esse poder, algo antes considerado impossível, se torna realidade.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Influência de irrigação subgingival com Camomila e Tansagem sobre o tratamento da doença periodontal experimental em ratos. Estudo microbiológico, histoquímico e imunoistoquímico

Introdução: O presente estudo avaliou a influência da irrigação subgingival com os extratos naturais de Camomila e Tansagem coadjuvantes à terapia convencional sobre a quantificação de Unidades formadoras de colônias (UFC) e cicatrização periodontal na periodontite experimental (PE) em ratos. **Métodos:** Antes da indução da PE, uma amostra de biofilme foi coletada do sulco periodontal por meio de um cone de papel estéril no primeiro molar inferior esquerdo de 72 ratos. Posteriormente a PE foi induzida nesses dentes através da inserção de fio de algodão na região subgingival. Após 7 dias da indução da PE, a ligadura foi removida. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos: RAR - Raspagem e Alisamento Radicular e irrigação com 1 ml de soro fisiológico; CAM – raspagem e alisamento radicular e irrigação com 100 µg camomila/ml solução aquosa; e TAN – raspagem e alisamento radicular e irrigação com 100 µg Tansagem/ml solução aquosa. Após os tratamentos, realizou-se nova coleta de amostra de biofilmes. Cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos (n=8) e amostras de biofilmes foram coletadas do sulco periodontal dos dentes com PE induzida e anteriormente à eutanásia realizada aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamentos. Foi realizada a quantificação das UFC através das amostras de biofilme. Ainda, realizaram-se análises histomorfométrica da área de perda óssea (PO) na região da furca, porcentagem de fibras colágenas maduras e imaturas por meio do vermelho Picrosirius e a osteoclastogênese através da detecção de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) pelo método da imunoperoxidase indireta. Os dados foram analisados estatisticamente ($p < 0,05$). **Resultados:** CAM e TAN apresentaram número de UFC significativamente menores que RAR aos 15 dias. TAN apresentou PO significativamente menor que CAM aos 7 dias. CAM apresentou porcentagem de fibras colágenas imaturas significativamente maior que os grupos RAR e TAN aos 15 dias. CAM apresentou imunomarcações para RANKL e OPG significativamente maiores que TAN aos 15 e 7 dias, respectivamente. **Conclusão:** A irrigação subgingival com fitoterápicos coadjuvantes à RAR reduz a quantidade de UFC e melhora a cicatrização no tratamento da PE em ratos.

Palavras-chave: Doença Periodontal; Periodontite; Fitoterapia; Plantago, Matricaria, Camomila

ABSTRACT

Influence of subgingival irrigation with *Matricaria recutita* and *Plantago major* on the treatment of experimental periodontal disease in rats. Microbiological, histochemical and immunohistochemical study

Introduction: The present study evaluated the influence of subgingival irrigation with natural extracts of Chamomile and Tansage in addition to conventional therapy on the quantification of Colony Forming Units (CFU) and periodontal healing in experimental periodontitis (PE). **Methods:** Before PE induction, a biofilm sample was collected from the periodontal groove by means of a sterile paper cone on the lower left first molar of 72 rats. Subsequently, PE was induced in these teeth through the insertion of cotton thread in the subgingival region. After 7 days of PE induction, the bandage was removed. The animals were randomly divided into 3 groups: RAR - Root Scraping and Straightening and irrigation with 1 ml of saline; CAM - scaling and root planing and irrigation with 100 µg chamomile / ml of aqueous solution; and TAN - scaling and root planing and irrigation with 100 µg Tansagem / ml of aqueous solution. After the treatments, a new biofilm sample collection was attended to. Each group was subdivided into 3 subgroups (n = 8) and biofilms were collected from the periodontal sulcus of the teeth with induced PE and prior to euthanasia performed at 7, 15 and 30 days post-treatments. The CFU quantification was performed using biofilm samples. In addition, histomorphometric analyzes of the area of bone loss (PO) in the furcation region, percentage of mature and immature collagen fibers using Picrosirius red and osteoclastogenesis through tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), an activator receptor ligand nuclear factor kappa B (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) by the indirect immunoperoxidase method. The data were statistically imposed (p <0.05). **Results:** CAM and TAN additional number of UFC less than RAR at 15 days. NHS due to secondary PO less than CAM at 7 days. CAM offering complete immature collagen fibers than the RAR and TAN groups at 15 days. CAM presented immunostaining for RANKL and Complete OPG greater than TAN at 15 and 7 days, respectively. **Conclusion:** Subgingival irrigation with phytotherapies supporting RAR reduces the amount of CFU and improves healing in the treatment of PE in rats.

Keywords: Periodontal Disease, Periodontitis, Phytotherapy, Plantago, Matricaria, Chamomile.

LISTA DE SIGLAS

CAM	– Grupo Camomila
PE	– Periodontite Experimental
PO	– Perda óssea
RAR	– Grupo Raspagem e Alisamento Radicular
TAN	– Grupo Tansagem
UFC	– Unidades Formadoras de Colônias
VP	– Vermelho Picrossirius

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Indução da doença periodontal. Posicionamento do animal em uma mesa adaptada para a abertura bucal (A). Inserção da ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo do animal (B)..... 44
- Figura 2 - Unidades formadoras de colônias (UFC) em uma placa de Petri..... 44
- Figura 3 - Valores médios do logaritmo da unidade formadora de colônias por mL (Log₁₀ UFC / mL) obtidos do biofilme coletado para cada grupo experimental (7, 15 e 30 dias) após os tratamentos. Abreviações e símbolo: CAM - camomila; TAN - tansagem; RAR – raspagem e alisamento radicular; UFC - unidade formadora de colônias; *, significativamente maior que T0; **, significativamente menor que o Grupo RAR aos 15 dias; ***, significativamente menor que o Grupo RAR, aos 15 dias..... 45
- Figura 4 - Fotomicrografias mostrando a área de infiltrado inflamatório na região de furca nos grupos RAR, CAM E TAN, respectivamente, 7 (A-C), 15 (D-F) e 30 (G-I) dias após os tratamentos. Abreviações: OA - osso alveolar; CAM, camomila; TAN - tansagem; RAR – raspagem e alisamento radicular. Coloração com hematoxilina e eosina; 40x..... 46
- Figura 5 - Gráficos mostrando a porcentagem de fibras colágenas imaturas (A) e maduras (B) e fotomicrografias mostrando a maturação do colágeno nos grupos RAR (C), CAM (D) e TAN (E) 15 dias após os tratamentos. Abreviações: OA - osso alveolar; CAM, camomila; TAN - tansagem; RAR – raspagem e alisamento radicular. *Significativamente maior que os grupos RAR e TAN aos 15 dias. Coloração vermelha de Picosirius sob luz polarizada; 40x..... 47
- Figura 6 - Fotomicrografias mostrando a marcação imunológica para TRAP nos grupos RAR, CAM e TAN, respectivamente, 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias após os tratamentos. Gráfico (A) mostrando o número de células TRAP-positivas nos grupos experimentais e período, em diferentes períodos analisados. Abreviações: OA - osso alveolar; CAM – camomila, TAN – Tansagem, RAR – raspagem e alisamento radicular. Contracoloração com hematoxilina; 400x 48
- Figura 7 - Fotomicrografias mostrando a marcação imunológica para RANKL nos grupos RAR (A), CAM (B) e TAN (C) 15 dias após tratamentos e fotomicrografias mostrando a marcação imunológica para OPG nos grupos RAR (D), CAM (E) e TAN (F) 7 dias após os tratamentos. Abreviações: OA - osso alveolar; TC – tecido conjuntivo; CAM – camomila, TAN – Tansagem, RAR – raspagem e alisamento radicular. Contracoloração com hematoxilina; 400x.... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perda óssea (PO) na comparação intergrupos.....	42
Tabela 2 – Médias \pm desvios-padrão da porcentagem de perda óssea (PO) na região de furca por grupo experimental e período, e o resultado da comparação intergrupos (valor de p).....	42
Tabela 3 – Escores observados para imunomarcacão com OPG e RANKL em cada grupo experimental, nos diferentes períodos.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVO.....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	Apreciação ética e Modelo experimental.....	17
3.2	Indução da periodontite experimental (PE).....	18
3.3	Protocolo de tratamentos.....	18
3.4	Eutanásia e processamento tecidual.....	19
3.5	Análise microbiológica.....	20
3.6	Análise histomorfométrica.....	20
3.7	Análises histoquímicas.....	21
3.8	Análises imunoistoquímicas.....	22
3.9	Análise estatística.....	23
4	RESULTADO.....	24
4.1	Análise microbiológica.....	24
4.2	Análise histológica.....	25
4.3	Análise histométrica.....	25
4.4	Análise histoquímica.....	25
4.5	Análise imunoistoquímica.....	26
5	DISCUSSÃO.....	26
6	CONCLUSÃO.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33
	ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA – UNOESTE.....	50
	ANEXO B - NORMAS PUBLICAÇÃO - JOURNAL OF PERIODONTOLOGY ..	51

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte como as fibras do tecido conjuntivo, cemento radicular e osso alveolar adjacente¹⁻⁴. Considerada como um problema de saúde pública por condição oral mais comum da população humana e por ser descrita como a principal razão do edentulismo^{1,5}, tem início e progressão relacionados à interação entre a resposta imune do hospedeiro e colonização de microrganismos periodontopatógenos^{5,6-8}, como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*^{5,7-9}.

As doenças periodontais podem, ainda, ser agravadas por fatores ambientais, como estresse, e comportamentais, incluindo o tabagismo, alterações hormonais nas mulheres, diabetes mellitus, medicamentos e má higiene bucal⁵. Provocam respostas inflamatórias locais, mas corroboram para o desencadeamento de diversas condições sistêmicas no organismo, como a arteriosclerose e diversas outras doenças¹⁰.

A fim de estabelecer o controle da doença a terapia periodontal convencional, definida pela Raspagem e Alisamento Radicular (RAR), é o tratamento mais comumente utilizado para a redução dos periodontopatógenos e da inflamação, eliminação das bolsas periodontais e remoção dos depósitos nas superfícies radiculares¹¹⁻¹³. Porém, de maneira única, não é capaz de eliminar completamente os microrganismos presentes nas bolsas mais profundas, áreas de furca e raízes côncavas, além de

alguns pacientes não responderem de maneira favorável ao tratamento convencional¹¹⁻¹³.

Assim, ao longo dos anos, agentes antimicrobianos sistêmicos e antissépticos coadjuvantes à RAR foram sendo introduzidos no tratamento da doença periodontal^{6,13}.

A utilização da antibióticoterapia sistêmica desempenha um papel significativo no tratamento periodontal. No entanto, apresenta efeitos adversos por necessitar da administração de altas doses para obter as concentrações adequadas podendo ocasionar toxicidade e hipersensibilidade, intolerância gastrointestinal, além de resistência bacteriana e interação medicamentosa^{8,14-16}.

No crescente interesse em buscar recursos terapêuticos alternativos que evitassem os efeitos colaterais causados pela administração sistêmica dos antibióticos iniciou-se a utilização da fitoterapia local por meio da irrigação subgengival pela sua considerável aceitação popular, pelo incentivo de pesquisas científicas e aumento de sua implantação pela Organização Mundial de Saúde. A mesma vem sendo analisada para combater doenças de custo reduzido e acesso simples, abrangendo 80% da população do mundo. São 132 espécies de plantas medicinais usadas em doenças bucais e cerca de 25 mil espécies de plantas usadas na fabricação de remédios tradicionais¹⁷.

Os fitoterápicos, utilizados desde os tempos antigos, apresentam propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antissépticas, anti-inflamatórias e anticolagenase^{18,19}. Contribuem para a melhoria do acesso da população à prevenção e tratamento de doenças de forma economicamente viável, além

de possuírem efeito sinérgico de seus fitoquímicos, atuação conjunto dos compostos em diversas moléculas alvo proporcionando desempenho integral do organismo, custos mais baixos e de fácil acesso²⁰.

Inúmeros estudos apontaram diversos efeitos farmacológicos vantajosos do *Plantago major* L. (Tansagem)²¹ e da *Matricaria recutita* L. (Camomila) devido seus aspectos agronômicos e fitoquímicos²².

A *Matricaria recutita* L., da família *Asteraceae*, popularmente conhecida como camomila, camomila italiana, camomila alemã, camomila selvagem e camomila húngara, nativa da Europa e da Ásia, é amplamente utilizada na como planta medicinal por apresentar propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, ansiolítica, antimutagênica, cicatrizadora, antidiabética, antisséptica, espasmolítica, anti-diarréia, neuroprotetora e antialérgica²³⁻²⁵. Em sua composição estão descritos compostos voláteis, lactonas de sesquiterpenos e compostos fenólicos, como flavonóides (flavonas e flavonóis) e cumarinas²⁶. Os constituintes químicos presentes ativamente incluem terpenóides, espiroéteres e os extratos das flores de camomila encontram-se os compostos fenólicos no qual a apigenina é considerada o mais bioativo²⁷. O principal componente do óleo essencial extraído da camomila é o terpenóide α -bisabol²⁶.

O *Plantago major* L., da família *Plantaginaceae*, popularmente conhecido como Tanchagem maior ou Tansagem maior, é uma planta medicinal nativa da Europa, Norte e Ásia Central. Sua bioatividade é atribuída aos seus constituintes químicos como flavonóides, alcalóide, compostos fenólicos, derivados do ácido cafeico, polissacarídeos (ramnogalacturonans, galactans, arabinogalactans e xylogalacturonans),

terpenóides, lipídios, glicosídeos iridoides, ácidos graxos e vitaminas (vitamina C e carotenoides)²⁸⁻³⁰. Amplamente aproveitada devido às suas propriedades biológicas gastroprotetoras, hepatoprotetoras, antiulcerativa, antidiabética, antidiarreica, anti-inflamatória, anticancerígena, antinociceptiva, antioxidante, anti-hipertensiva, antimicrobiana e antiviral^{23,30,31}.

Alguns estudos avaliaram os efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos de *Matricaria recutita* e *Plantago major* em Odontologia. A *Matricaria recutita* demonstrou, por meio de ensaios clínicos randomizados, ter eficácia igualmente a clorexidina para reduzir os índices de placa e sangramento^{17,32,33} e *Plantago major* demonstrou eficácia tanto quanto o triclosan composto em cremes dentais para reduzir biofilmes de microrganismos orais in vitro³⁴ e sua eficácia pode ter efeitos residuais no enxaguatório bucal por longos períodos em um relato de casos em série³⁵.

A necessidade de novas abordagens terapêuticas coadjuvantes à terapia convencional fez com que muitos pesquisadores desenvolvessem estudos voltados para medicina alternativa para o tratamento da doença periodontal. Assim, este estudo teve por finalidade avaliar a influência da irrigação subgengival com os extratos naturais de Camomila (*Matricaria recutita* L.) e Tansagem (*Plantago marjor* L.) coadjuvantes à RAR na periodontite experimental (PE) em ratos.

2 OBJETIVO

O propósito do presente estudo foi avaliar a influência da irrigação subgengival com os extratos naturais de Camomila (*Matricaria recutita* L.) e

Tansagem (*Plantago major L.*) coadjuvantes à RAR sobre a quantificação de UFC, o processo de cicatrização, a maturação do colágeno e a osteoclastogênese na periodontite experimental (PE) em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Apreciação ética e Modelo experimental

A pesquisa foi realizada respeitando os princípios éticos da experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, a legislação em vigor e o guia *ARRIVE (Animal Research: Reporting of in vivo Experiments)*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE (Processo no. 4496).

O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo programa Graphpad Statemate 2.0*. O tamanho da amostra foi determinado para assegurar poder estatístico de 80% no reconhecimento de diferenças significativas entre os grupos em torno de 20% e desvio padrão de 15% com um intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), considerando as mudanças na variação de osso formado no defeito criado, variável primária de resultado. Dessa forma, chegou-se a um tamanho amostral adequado de 8 animais por grupo experimental.

Foram utilizados 72 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), pesando entre 250 e 300g, provenientes do Biotério Central da UNOESTE. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (máximo de 4 animais por gaiola) e alimentados com ração e água *ad libitum*. Os animais

foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos experimentais: Grupo RAR - Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) e irrigação com 1 ml de soro fisiológico; Grupo CAM – RAR e irrigação com solução de Camomila (100 µg/ml de solução aquosa - Apothicário Farmácia de Manipulação, Araçatuba, SP, Brasil); Grupo TAN – RAR e irrigação com solução de Tansagem (100 µg/ml de solução aquosa - Apothicário Farmácia de Manipulação, Araçatuba, SP, Brasil). Cada grupo experimental foi subdividido em 3 subgrupos (n=8) para eutanásia aos 7, 15 ou 30 dias pós-operatórios.

3.2 Indução da periodontite experimental (PE)

Para realização de todos os procedimentos, 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 (Fig. 1A). 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 (Figura. 1B).

3.3 Protocolo de tratamentos

Seguindo o modelo proposto por Johson et al.³⁶, após 7 dias da indução da periodontite, 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: Grupo RAR - Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) e irrigação com 1 ml

de soro fisiológico; Grupo CAM – RAR e irrigação com 100 µg solução de camomila por ml de solução aquosa; e Grupo TAN – RAR e irrigação com 100 µg solução de tansagem por ml de solução aquosa.

O procedimento de RAR foi realizado por um mesmo operador com curetas manuais “*mini-five*” nº 5/6 (Hu-friedy, Chicago, IL, Estados Unidos) através de 10 movimentos de tração disto-mesial nas faces vestibular e lingual. As áreas interproximais e de furca foram raspadas com as mesmas curetas por meio de movimentos de tração cérvico-oclusais. A irrigação subgengival foi realizada com auxílio de uma seringa de 1 ml com agulha sem bisel. Durante a irrigação o excesso das soluções foi removido com auxílio de gaze estéril.

3.4 Eutanásia e processamento tecidual

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 7, 15 e 30 dias após a realização dos tratamentos locais da periodontite experimental 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 mésio-distal. Alguns cortes foram submetidos à coloração de hematoxilina e eosina (H.E.).

3.5 Análise microbiológica

Amostras de biofilme foram coletadas, antes da indução da doença periodontal (T0), após 7 dias de sua indução (T1) e antes da eutanásia dos grupos nos tempos de 7 (T2), 15 (T3) e 30 dias (T4), com pontas de papel absorvente (#20, Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) estéreis inseridos nos sulcos/bolsas periodontais e mantidos durante 1 minuto. Os cones de papel com amostras de biofilme foram, então, transferidos para microtubos contendo 1 mL de *BHI* (*brain-heart infusion*). Foram feitas diluições seriadas e os microtubos foram agitados em um vortex por 10 segundos e 10 mL da solução obtida foram diluídos até obter uma concentração de 1×10^4 células/mL. Alíquotas de 10 mL das diluições foram semeados em triplicata em placas de Petri contendo BHI com ágar. As placas foram estocadas em estufa bacteriológica por 48 horas (aerobiose, 37° C) para então realizar a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL (UFC/mL) (Figura. 2).

3.6 Análise histomorfométrica

Um examinador calibrado e cego aos tratamentos realizou a análise histomorfométrica. Imagens da região da furca dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H.E) foram capturadas com uma câmera digital conectada a um microscópio. A área de perda óssea (PO) na região da furca foi determinada usando um programa de análise de imagem (ImageJ 1.51p <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

3.7 Análises histoquímicas

Os cortes histológicos foram desparafinizados, hidratados 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.

Os cortes histológicos corados com vermelho Picrosirius foram analisados sob microscopia de luz polarizada. Imagens da região de furca foram capturadas com uma câmera digital conectada a um microscópio de luz polarizada com ampliação de 40x. Utilizando a função de limite de cores de um software, foi selecionada a região de furca que era a área de interesse. Em seguida, foi utilizada a função “Medida RGB”, que fornece informações sobre vermelho (R), verde (G) e azul (B) da área circulada. Os valores de vermelho (R) foram usados para calcular a porcentagem de fibras colágenas maduras na região da furca e os valores de verde (G) foram usados para calcular a porcentagem de fibras imaturas de colágeno na região da furca³⁷.

Os grupos sulfônicos ácidos do Vermelho Sirius interagem fortemente com moléculas de colágeno, que são ricas em aminoácidos básicos. Esta reação ocasiona o aumento da birrefringência das fibras colágenas³⁸. As fibras colágenas coradas com a técnica do Vermelho Picrosirius e analisadas em microscopia de luz polarizada adquirem cores que variam entre o verde, amarelo, laranja e vermelho. 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 maduras³⁹.

3.8 Análises imunoistoquímicas

Os cortes foram submetidos ao método da imunoperoxidase indireta para identificação das proteínas TRAP (biomarcador de osteoclastos), OPG e RANKL. A descoberta do sistema receptor ativador do fator nuclear kapa B/ligante do receptor do fator nuclear kapa B/osteoprotegrina (RANK/RANKL/OPG) é outra peça fundamental para o entendimento molecular da biologia óssea⁴⁰. O reconhecimento molecular da ligação RANK/RANKL induz a diferenciação de precursores de osteoclastos em osteoclastos ativos, levando à reabsorção óssea⁴¹. Por outro lado, a OPG inibe competitivamente a ligação RANK/RANKL ao atuar como receptor do RANKL, impossibilitando a diferenciação osteoclástica e sua função reabsortiva⁴². Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão específico (Diva decloaker®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 1 hora. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em seis lotes, e cada

lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-TRAP, anti-OPG e anti-RANKL. Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). Foi realizada a contracoloração com hematoxilina de Harris (para TRAP, OPG e RANKL), desidratados em etanol, diafanizados em xilol e, recobertos com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, USA) e lamínulas de vidro.

3.9 Análise estatística

Os dados microbiológicos foram submetidos à verificação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, para verificar as diferenças entre os grupos, foi realizado Teste de Student-Newman-Keuls. Os testes consideraram um nível de significância de 5% e foram realizados no programa Sigma Plot.

Os dados histomorfométricos foram submetidos à verificação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, para verificar as diferenças entre os grupos, foi realizado ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Os testes consideraram um nível de significância de 5% e foram realizados no programa *SPSS Statistics* (v20.0).

Os dados histoquímicos foram analisados sob microscopia de luz polarizada. A distribuição espacial das fibras colágenas foi avaliada com a função de limite de cores de um programa de análise de imagem (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.

Nos dados imunoistoquímicos o número de células imunorreativas por TRAP, OPG e RANKL foram quantificadas. Os valores da imunomarcacão foram expressos como média \pm desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Análise microbiológica

As amostras de biofilme coletadas anteriormente à indução da PE (T0) apresentaram números de UFC estatisticamente menores em relação ao número de UFC com 7 dias após indução (T1).

Após 7 (T2) e 30 (T4) dias da realização dos tratamentos, as amostras de biofilme coletadas dos grupos RAR, CAM e TAN não apresentaram diferenças significativas no número de UFC comparadas às amostras de biofilme coletadas após a indução da periodontite (T1).

Após 15 dias (T3) da realização dos tratamentos, as amostras de biofilme coletadas dos grupos CAM e TAN apresentaram números de UFC significativamente menores que o Grupo RAR.

Valores médios do logaritmo das UFC por ml (Log_{10} UFC/ml) obtidos do biofilme coletado após a realização dos tratamentos, nos diferentes períodos experimentais, com comparações intergrupos, estão apresentados na Figura. 3.

4.2 Análise histológica

No Grupo RAR, aos 7 dias, foi observado intenso infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo na região de furca. O septo inter-radicular mostrou-se irregular e foram observados numerosos osteoclastos na superfície. Aos 15 e 30 dias, o infiltrado inflamatório apresentava-se menos intenso.

Nos grupos CAM e TAN, aos 7 dias, foi observado infiltrado inflamatório de intensidade moderada no tecido conjuntivo na região de furca. O septo inter-radicular mostrou-se irregular e foram observados osteoclastos na superfície, em menor quantidade quando comparado ao Grupo RAR. Aos 15 e 30 dias, o infiltrado inflamatório apresentava-se menos intenso. Imagens representativas de cada grupo, nos diferentes períodos experimentais, estão apresentadas na Figura 4.

4.3 Análise histométrica

O Grupo TAN apresentou perda óssea significativamente menor que o Grupo CAM após 7 dias da realização dos tratamentos (Tabelas 1 e 2).

Na comparação intragrupos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais.

4.4 Análise histoquímica

Na comparação intergrupos, o Grupo CAM e TAM apresentaram fibras colágenas imaturas significativamente menores que o Grupo RAR após 15 dias da realização dos tratamentos. Imagens representativas de cada grupo estão apresentadas na Figura 5.

Na comparação intragrupos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais.

4.5 Análise imunohistoquímica

As células imunomarcadas para proteína TRAP estão descritas na Figura 6. Quando comparados estatisticamente (ANOVA, Teste de TUKEY $p < 0,05$) o Grupo experimental CAM apresentou significativamente menores quantidades de células imunorreativas em relação ao Grupo TAN após 7 dias da realização dos tratamentos ($p = 0,054$).

Os resultados para RANKL e OPG apresentam-se, respectivamente, na Figura 7. Aos 15 dias, o Grupo TAN mostrou padrão de imunomarcção para RANKL significativamente menor que o Grupo CAM ($p = 0,011$) e RAR ($p = 0,045$), praticamente não apresentando células imunorreativas. Comparando os grupos experimentais, aos 7 dias da realização dos tratamentos, para a proteína OPG, constatou-se que o Grupo TAN demonstrou quantidades maiores de células imunorreativas em relação ao Grupo RAR ($p = 0,040$), (Tabela 3).

Nas demais comparações não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de irrigação subgengival com dois extratos naturais (camomila e tansagem) associados à raspagem e alisamento radicular (RAR) no tratamento de periodontite experimental e comparar os resultados obtidos ao tratamento convencional

da periodontite experimental em ratos (RAR e irrigação com soro fisiológico). Este objetivo foi fundamentado na necessidade de aplicação local de produtos que apresentem ação antimicrobiana e/ou antiinflamatória dentro das bolsas periodontais como um fator coadjuvante ao debridamento mecânico e à raspagem corono-radicular, especificamente em sítios com periodontite que não regrediram após o tratamento convencional.¹¹

Dentre as vantagens para o uso local de agentes químicos, incluindo os produtos fitoterápicos, podem ser evidenciadas: maximização de seu efeito em sítios específicos e a prevenção da toxicidade sistêmica e de problemas relacionados à falta de comprometimento do paciente.^{17,44} A administração local de medicamentos na bolsa periodontal é um tratamento eficaz quando associado ao debridamento mecânico. As terapias localizadas têm recebido atenção significativa devido ao padrão de destruição de infecções periodontais específicas do local e aos potenciais efeitos colaterais de antimicrobianos sistêmicos e agentes anti-inflamatórios.⁴⁵ Outra razão importante para o desenvolvimento de aplicação local eficaz de medicamentos nas bolsas periodontais decorre da descoberta de que a administração sistêmica de muitos medicamentos (e antibióticos em particular) resulta em concentrações locais pouco eficazes do princípio ativo livre na bolsa periodontal e nos tecidos circundantes.⁴⁵ No entanto, é necessário considerar que a recolonização é um fenômeno importante que deve ser evitado por uma estratégia clínica: higiene supragengival ideal, desinfecção de toda a boca e / ou uso de anti-séptico oral anti-séptico.⁴⁵

No presente trabalho, os grupos tratados com camomila e tansagem apresentaram menor infiltrado inflamatório quando comparado com o grupo

controle. Além disso, esses grupos apresentaram menor quantidade de formação de biofilme. Assim, pode-se inferir que as soluções de camomila e tansagem apresentam potencial de melhorar os resultados do tratamento periodontal convencional. Esses resultados corroboram com outros resultados já encontrados na literatura que demonstraram que tanto a camomila^{32,17,33} quanto a tansagem^{34,35} apresentam potencial de ação preventivo e curativo na Odontologia e na Periodontia.

Lins et al.¹⁷, Cárcamo et al.³², Lucena et al.³³ realizaram estudos clínicos para comparar a eficácia do enxaguatório bucal com clorexidina e camomila em pacientes com gengivite. Os resultados mostraram uma grande redução nos índices de placa com camomila tão eficiente quanto a clorexidina. É possível que os benefícios da camomila na cicatrização periodontal sejam devido à atividade antioxidante do conteúdo de polifenóis e flavonóides que regulam negativamente a atividade de eliminação de radicais livres e a expressão das metaloproteinases da matriz.²⁶ Nesse contexto, também é importante considerar que a atividade antioxidante da camomila demonstrou agir de maneira dependente da dose.²⁶ Aqui, foi utilizado o extrato de camomila produzido em farmácia por evaporação de etanol / água. Portanto, pode-se inferir que se obteve uma concentração estimada de 13,51%, como estudos anteriores.^{26,46}

Anushree et al.³⁴ realizaram um estudo in vitro para comparar o efeito antimicrobiano de creme dental contendo triclosan e tansagem e concluíram que esse agente herbal pode ser tão eficaz quanto os antimicrobianos convencionais já utilizados. A tansagem pode, ainda, ter permanecido por um tempo maior nos tecidos periodontais onde foi aplicada, levando a um

resultado ainda melhor, quando comparado com a camomila. Esta característica da Tansagem de permanecer por um longo período de tempo nos tecidos periodontais é uma das características desejáveis dos agentes antimicrobianos utilizados para tratamento e prevenção das doenças periodontais, conhecida como substantividade.⁴⁷ Navarro et al.³⁵ revelaram a eficácia na redução dos índices de biofilme de pacientes tratados com enxaguatório bucal com tansagem e obteve um efeito residual dessa planta mesmo após 42 dias. Essa característica é importante para evitar a recolonização.²³ Além disso, foi demonstrada a presença de oligossacarídeos com efeitos benéficos para a saúde humana.²⁹⁻³¹

Um agente antimicrobiano deve apresentar propriedades, tais como: substantividade, inocuidade aos tecidos bucais, redução significativa do biofilme bacteriano e da gengivite, inibição da calcificação do biofilme e também não favorecer o desenvolvimento de bactérias resistentes, não manchar os dentes e não alterar a gustação. Entretanto, nenhum produto comercialmente disponível até o momento preenche todos esses requisitos, apresentando alguns efeitos colaterais ou pouca eficiência.⁴⁷

Segundo nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a avaliar a histoquimicamente e imunoistoquimicamente os efeitos da irrigação subgengival com camomila e tansagem associados ao tratamento convencional de periodontite experimental. Considerando que o grupo tratado com camomila apresentou porcentagem de fibras colágenas imaturas significativamente maior que os grupos RAR ou TAN e uma imunomarcção significativamente menor de TRAP comparado ao grupo TAN, pode-se sugerir que a tansagem apresentou melhor resultado sobre a

cicatrização periodontal do que a camomila. Os resultados histomorfométricos do presente estudo corroboram e reforçam esta hipótese.

Diferenças na composição de camomila e tansagem podem explicar diferenças nos resultados obtidos por cada tratamento no presente estudo. A tansagem apresenta ácido caféico como um de seus componentes.³⁵ O ácido caféico tem sido associado à redução do estresse oxidativo e à redução da inflamação.^{48,49} Estudos in vitro com outras plantas que contêm ácido cafeico mostraram que ele pode reduzir a ação pró-inflamatória do lipopolissacarídeo *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella Intermedia* e a expressão do gene da enzima antioxidante catalase por meio da redução dos níveis de espécies reativas intracelulares de oxigênio e a expressão de genes que codificam enzimas produtoras.^{50,51} Com metodologia semelhante usada no presente estudo, Yiğit et al.⁵² avaliaram o efeito do ácido caféico na perda óssea alveolar, citocinas séricas (interleucina (IL) -1 β , IL-6, fator de necrose tumoral- α e IL-10) e apoptose gengival, além dos níveis de antioxidantes. Também avaliaram doses baixas de doxiciclina combinada ou não com ácido caféico. O grupo tratado com ácido caféico apresentou menor perda óssea alveolar, infiltração inflamatória e expressão de citocinas séricas entre os grupos experimentais. Os autores concluíram que o ácido caféico tem mais efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e anti-apoptóticos do que os antibióticos avaliados.

Além da Camomila e da Tansagem, outros produtos fitoterápicos também têm sido avaliados como tratamento coadjuvante ao tratamento periodontal convencional. Almeida et al.⁵³ utilizaram o mesmo modelo de periodontite experimental utilizado no presente estudo para avaliar o efeito

do extrato de chá verde sobre a cicatrização periodontal, através de análise histológica e imunoistoquímica para detecção de proteínas inflamatórias e osteoclastos na região de furca. Resultados promissores foram observados. Os resultados demonstraram que os grupos tratados com chá verde apresentaram menor processo inflamatório, menor número de osteoclastos e menor perda óssea, comparado com os grupos controle onde só a RAR foi realizada.

Poucos estudos são encontrados na literatura acerca do uso dos produtos fitoterápicos no tratamento periodontal. Moro et al.¹⁸ realizaram uma recente revisão sistemática de literatura para avaliar o efeito da aplicação de agentes fitoterápicos coadjuvantes à RAR sobre parâmetros clínicos de pacientes com periodontite e compará-los à RAR sozinha. Os resultados demonstraram que o uso local dos fitoterápicos coadjuvantes à RAR pode promover benefícios adicionais na redução da profundidade de sondagem e nível de inserção clínica. Contudo, mais estudos são necessários para melhor avaliar sua aplicação.

Os limites desse estudo puderam ser descritos na aplicação única dos extratos, na utilização da estufa de aerobiose na análise microbiológica sendo que os periodontopatógenos são gram negativos anaeróbicos facultativos e na manipulação dos extratos naturais ser realizada em farmácia de manipulação sem determinação da concentração de seus compostos.

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a irrigação subgingival com Tansagem coadjuvante à RAR pode reduzir a formação de biofilme, melhorar a cicatrização periodontal, promover uma maior maturação do colágeno e reduzir a osteoclastogênese no tratamento da PE em ratos.

NOTAS DE RODAPÉ

*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA

† Dopalen, Agribands Purina do Brasil Ltda., Paulinia, SP, Brazil

‡ Coopazine, Coopers, São Paulo, São Paulo, Brazil

§ Corrente Algodão nº 24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil

|| Hu-friedy, Chicago, IL, Estados Unidos

¶ Cristália, Produtos químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil

Leica Microsystem CMS, Wetzlar, Germany

** GraphPad Prism version 5.0, San Diego, CA, USA

* Apothicário Farmácia de Manipulação, Araçatuba, SP, Brasil

† #20, Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland

‡ Diva decloaker®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA

§ Decloaking chamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA

|| DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA

¶ Permound, Fisher Scientific, San Diego, CA, USA

Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun; 89 Suppl 1:S173-S182. doi: 10.1002/JPER.17-0721.
2. Pradeep AR, Priyanka N, Kalra N, Naik SB. A randomized controlled clinical trial on the clinical and microbiological efficacy of systemic satranidazole in the treatment of chronic periodontitis. *J Int Acad Periodontol*. 2013 Apr; 15(2):43-50.
3. Calderaro DC, Ferreira GA, Mendonça SM, Corrêa JD, Santos FX, Sanção JG, da Silva TA, Teixeira AL. Is there an association between systemic lupus erythematosus and periodontal disease? *Rev Bras Reumatol Engl Ed*. 2016 May-Jun; 56(3):280-4. doi: 10.1016/j.rbre.2015.08.003.
4. Van Dyke TE. Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. *Mol Aspects Med*. 2017 Dec; 58:21-36. doi: 10.1016/j.mam.2017.04.006. Epub 2017 May 18.
5. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017 Apr-Jun; 11(2): 72-80.
6. Jose KA, Ambooken M, Mathew JJ, Issac AV, Kunju AP, Parameshwaran RA. Management of Chronic Periodontitis Using Chlorhexidine Chip and Diode Laser-A Clinical Study. *J Clin Diagn Res*. 2016 Apr; 10(4): ZC76-80. doi: 10.7860/JCDR/2016/13241.7669. Epub 2016 Apr 1.

7. Soeroso Y, Akase T, Sunarto H, Kemal Y, Salim R, Octavia M, et al. The risk reduction of recurrent periodontal pathogens of local application minocycline HCl 2% gel, used as an adjunct to scaling and root planing for chronic periodontitis treatment. *Ther Clin Risk Manag*. 2017 Mar 10; 13: 307-314. doi: 10.2147/TCRM.S130257. eCollection 2017.
8. Nagasri M, Madhulatha M, Musalaiah SV, Kumar PA, Krishna CH, Kumar PM. Efficacy of curcumin as an adjunct to scaling and root planning in chronic periodontitis patients: A clinical and microbiological study. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015 Aug; 7 (Suppl 2): S554-8. doi: 10.4103/0975-7406.163537.
9. Pensantes-Sangay SJ, Calla-Poma RD, Requena-Mendizabal MF, Alvino-Vales MI, Millones-Gómez PA. Composição Química e Efeito Antibacteriano do Extrato Principal de Plantago em Patógenos Periodontais. *Pesqui. Bras. Odontopediatria Clín. Integr*. 2020 Aug.
10. Kolte RA, Kolte AP, Shah KK, Modak A, Sarda TS, Bodhare GH. Comparative evaluation of the left ventricular mass in patients with chronic kidney disease in periodontally healthy, chronic gingivitis, and chronic periodontitis patients. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2019 Nov-Dec; 13(6):13-18.
11. Nagarakanti S, Gunupati S, Chava VK, Reddy BV. Effectiveness of Subgingival Irrigation as an Adjunct to Scaling and Root Planing in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Systematic Review. *J Clin Diagn Res*. 2015 Jul; 9(7):ZE06-9. doi: 10.7860/JCDR/2015/13862.6210. Epub 2015 Jul 1.
12. Bhatia M, Urolagin SS, Pentyala KB, Urolagin SB, K B M, Bhoi S. Novel therapeutic approach for the treatment of periodontitis by curcumin. *J Clin*

Diagn Res. 2014 Dec; 8(12):ZC65-9. doi: 10.7860/JCDR/2014/8231.5343.
Epub 2014 Dec 5.

13. Anuradha BR, Bai YD, Sailaja S, Sudhakar J, Priyanka M, Deepika V. Evaluation of Anti-Inflammatory Effects of Curcumin Gel as an Adjunct to Scaling and Root Planing: A Clinical Study. *J Int Oral Health.* 2015 Jul; 7(7):90-3.

14. Behal R, Mali AM, Gilda SS, Paradkar AR. Evaluation of local drug-delivery system containing 2% whole turmeric gel used as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis: A clinical and microbiological study. *J Indian Soc Periodontol.* 2011 Jan; 15(1):35-8. doi: 10.4103/0972-124X.82264.

15. Shah SA, Vijayakar HN, Rodrigues SV, Mehta CJ, Mitra DK, Shah RA. To compare the effect of the local delivery of hyaluronan as an adjunct to scaling and root planing versus scaling and root planing alone in the treatment of chronic periodontitis *J Indian Soc Periodontol.* 2016 Sep-Oct; 20(5):549-556. doi: 10.4103/0972-124X.201695.

16. Hugar SS, Patil S, Metgud R, Nanjwade B, Hugar SM. Influence of application of chlorhexidine gel and curcumin gel as an adjunct to scaling and root planing: A interventional study. *J Nat Sci Biol Med.* 2016 Jul-Dec; 7(2): 149-54. doi: 10.4103/0976-9668.184701.

17. Lins R, Vasconcelos FHP, Leite RB, Coelho-Soares RS., Barbosa DN Avaliação clínica de bochechos com extratos de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e Camomila (*Matricaria recutita L.*) sobre a placa bacteriana e a gengivite. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2013;15(1):112-120. doi. 10.1590/S1516-05722013000100016.

18. Moro MG, Silveira Souto ML, Franco GCN, Holzhausen M, Pannuti CM. Efficacy of local phytotherapy in the nonsurgical treatment of periodontal disease: A systematic review. *J Periodontal Res.* 2018 Jun; 53 (3): 288-297. doi: 10.1111/jre.12525. Epub 2018 Jan 19.
19. Pai PG, Dayakar MM, Nath AR, Ashwini G. Phytotherapeutics in the management of periodontal disease - A review. *SRM Journal of Research in Dental Sciences.* July 11, 2019.
20. Nardini EF, Almeida TS, Yoshimura TM, Ribeiro MS, Cardoso RJ, Garcez AS. The potential of commercially available phytotherapeutic compounds as new photosensitizers for dental antimicrobial PDT: A photochemical and photobiological in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Sep; 27: 248-254. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.05.027. Epub 2019 Jun 5.
21. Batista AL, Lins RD, de Souza Coelho R, do Nascimento Barbosa D, Moura Belém N, Alves Celestino FJ. Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction. *Complement Ther Clin Pract.* 2014 Feb; 20 (1): 93-8. doi: 10.1016/j.ctcp.2013.08.002. Epub 2013 Sep 25.
22. Kartini, Piyaviriyakul S, Thongpraditchote S, Siripong P, Vallisuta O. Effects of *Plantago major* Extracts and Its Chemical Compounds on Proliferation of Cancer Cells and Cytokines Production of Lipopolysaccharide-activated THP-1 Macrophages. *Pharmacogn Mag.* 2017 Jul-Sep; 13(51): 393-399. doi: 10.4103/pm.pm_406_16. Epub 2017 Jul 19.
23. Gomes VTS, Nonato Silva Gomes R, Gomes MS, Joaquim WM, Lago EC, Nicolau RA. Effects of *Matricaria Recutita* (L.) in the Treatment of Oral

Mucositis. *Scientific World Journal*. 2018 Jun 12; 2018: 4392184. doi: 10.1155/2018/4392184. eCollection 2018.

24. Miraj S, Alesaeidi S. A systematic review study of therapeutic effects of *Matricaria recuitta* chamomile (chamomile). *Electron Physician*. 2016 Sep 20; 8 (9):3024-3031. eCollection 2016 Sep.

25. Goes P, Dutra CS, Lisboa MR, Gondim DV, Leitão R, Brito GA, Rego RO. Clinical efficacy of a 1% *Matricaria chamomile* L. mouthwash and 0.12% chlorhexidine for gingivitis control in patients undergoing orthodontic treatment with fixed appliances. *J Oral Sci*. 2016; 58 (4): 569-574. doi: 10.2334/josnugd.16-0280.

26. Al-Dabbagh B, Elhaty IA, Elhaw M, Murali C, Mansoori AAI, Awad B, Amin A. Antioxidant and anticancer activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *BMC Res Notes* 2019; 12:3. doi. 10.1186/s13104-018-3960-y

27. Sharifi-Rad M, Nazaruk J, Polito L et al. *Matricaria* genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. *Microbiol Res*. 2018 Oct; 215: 76-88. doi: 10.1016/j.micres.2018.06.010. Epub 2018 Jun 25.

28. Najafian Y, Hamed SS, Farshchi MK, Feyzabadi Z. *Plantago major* in Traditional Persian Medicine and modern phytotherapy: a narrative review. *Electron Physician*. 2018 Feb 25; 10 (2): 6390-6399. doi: 10.19082/6390. eCollection 2018 Feb.

29. Lukova PK, Karcheva-Bahchevanska DP, Bivolarski VP, Mladenov RD, Iliev IN2, Nikolova MM2. Enzymatic Hydrolysis of Water Extractable Polysaccharides from Leaves of *Plantago major* L. *Folia Med (Plovdiv)*. 2017 Jun 1; 59 (2): 210-216. doi: 10.1515/folmed-2017-0023.

30. Adom MB, Taher M, Mutalabisin MF, Amri MS, Abdul Kudus MB, Wan Sulaiman MWA, et al. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. *Biomed Pharmacother*. 2017 Dec; 96: 348-360. doi: 10.1016/j.biopha.2017.09.152. Epub 2017 Oct 10.
31. Parhizgar S, Hosseinian S, Soukhtanloo M et al. *Plantago major* protects against cisplatin-induced renal dysfunction and tissue damage in rats. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2018 Sep-Oct; 29 (5): 1057-1064. doi: 10.4103/1319-2442.243960.
32. Cárcamo OV, Olivia MP, González CP. Efectividad Antimicrobiana Del Colutorio de *Matricaria recutita*, em Funcionarios de la Facultad de Odontología de la Universidad del Desarrollo, Chile. *Int. J. Odontostomat*. 2011; 5:179-184.
33. Lucena RN, Lins RDAU, Ramos INC, Cavalcanti AL, Gomes RCB, Maciel MAS. Estudo clínico comparativo do efeito anti-inflamatório da *Matricaria recutita* e da clorexidina em pacientes com gengivite crônica. *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde*. 2009; 11:31-36.
34. Anushree B, Fawaz MA, Narahar R, Shahela T, Syed A. Comparison of Antimicrobial Efficacy of Triclosan- Containing, Herbal and Homeopathy Toothpastes-An Invitro Study. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9:10.
35. Navarro DF, Santos EAT, Rocha JCF, et al. Efeitos do digluconato de clorexidina, *plantago major* e placebo sobre placa dental e gengivite: uma comparação clínica da eficácia de colutórios. *Rev. Bras. Pl. Med*. 1998; 1:28-38.
36. Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res* 1975; 10:332-345.36.

37. Gajendrareddy PK, Junges R, Cygan G, Zhao Y, Marucha PT, Engeland CG. Increased oxygen exposure alters collagen expression and tissue architecture during ligature-induced periodontitis. *J Periodontal Res* 2017; 52:644-649.
38. Montes GS, Junqueira LCU. O uso do método de Picrosirius-polarização para o estudo da biopatologia do colágeno. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1991 Aug; 86 (3):1-11.
39. Rich L, Whittaker P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz. J. morphol. Sci.* 2005; 22(2):97-104.
40. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May 15; 473(2):139-46.
41. Harada S, Takahashi N. Control of bone resorption by RANKL-RANK system. *Clin Calcium* 2011; 21:1121-1130.
42. Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, Uehara S, Kobayashi Y. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011; 16:21-30.
43. Dal-Fabbro R, Marques-de-Almeida M, Cosme-Silva L, Capalbo LC, Ervolino E, Cintra LTA, Gomes-Filho JE. Effects of different alcohol concentrations on the development of apical periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2019 Dec;108:104538. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104538. Epub 2019 Aug 25.
44. Kumar P, Ansari SH, Ali J. Herbal remedies for the treatment of periodontal disease – a patent review. *Recent Pat Drug Delivery Formul.* 2009;3:221-228.

45. Tonetti MS, Cortellini P. Administração local de medicamento para o tratamento da periodontite. In: Lang NP, Lindhe J. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. Nova Iorque: Wiley; 2015.
46. Roby MHH, Sarhan MA, Selim KA-H, Khalel KI. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Ind Crops Prod*. 2013;44:437–45.
47. Lang NP, Lindhe J. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. Nova Iorque: Wiley. 2015.
48. Stähli A, Maheen CU, Strauss FJ, Eick S, Sculean A, Gruber R. Caffeic acid phenethyl ester protects against oxidative stress and dampens inflammation via heme oxygenase 1. *Int J Oral Sci*. 2019 Feb 20;11(1):6. doi: 10.1038/s41368-018-0039-5.
49. Li L, Sun W, Wu T, Lu R, Shi B. Caffeic acid phenethyl ester attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses in human gingival fibroblasts via NF- κ B and PI3K/Akt signaling pathway. *Eur J Pharmacol*. 2017 Jan 5;794:61-68. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.11.003. Epub 2016 Nov 7.
50. Le Sage F, Meilhac O, Gonthier MP. Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of Polyphenols Extracted From *Antirhea Borbonica* Medicinal Plant on Adipocytes Exposed to *Porphyromonas Gingivalis* and *Escherichia Coli* Lipopolysaccharides. *Pharmacol Res* 2017 May; 119:303-312. doi: 10.1016/j.phrs.2017.02.020. Epub 2017 Feb 27.
51. Choi EY, Choe SH, Hyeon JY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ. Effect of caffeic acid phenethyl ester on *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide-induced production of proinflammatory mediators in murine macrophages. *J*

Periodontal Res. 2015 Dec; 50(6):737-47. doi: 10.1111/jre.12260. Epub 2015 Jan 20.

52. Yiğit U, Kırzioğlu FY, Uğuz AC, Nazıroğlu M, Özmen Ö. Is caffeic acid phenethyl ester more protective than doxycycline in experimental periodontitis? *Arch Oral Biol.* 2017 Sep; 81:61-68. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.04.017. Epub 2017 Apr 21

53. Almeida JM, Marques BM, Novaes VCN, Oliveira FLP, Matheus HR, Fiorin LG. et al. Influence of adjuvant therapy with Green tea extract in the treatment of experimental periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2019 Jun; 102:65-73. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.03.028. Epub 2019 Apr 3.

TABELAS

Tabela 1 – Perda óssea (PO) na comparação intergrupos.

GRUPOS		SIGNIFICÂNCIA
RAR	CAM	.129
	TAN	.648
CAM	RAR	.129
	TAN	.023
TAN	RAR	.648
	CAM	.023

Tabela 2 – Médias \pm desvios-padrão da porcentagem (%) de perda óssea (PO) na região de furca por grupo experimental e período, e o resultado da comparação intergrupos (valor de p).

	RAR			CAM			TAN		
	7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias
Média	8,78	9,84	10,06	14,08	11,16	9,21	6,62*	11,31	6,36
DP	5,76	5,03	5,91	7,73	5,42	4,85	3,32*	5,42	2,86

Comparação intergrupos:

*Significativamente menor que o Grupo CAM após 7 dias da realização dos tratamentos ($p=0,023$).

Tabela 3 – Escores observados para imunomarcção com OPG e RANKL em cada grupo experimental, nos diferentes períodos.

Marcador	Escore	RAR			CAM			TAN		
		7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias
OPG	1	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/6	0/7	0/7	1/7
	2	2/7	3/7	2/7	3/7	2/7	3/6	0/7	3/7	3/7
	3	0/7	2/7	4/7	0/7	1/7	3/6	0/7	1/7	2/7
	4	5/7	2/7	1/7	4/7	4/7	0/6	7/7	3/7	1/7
	Média	2,40	1,86	1,86	2,14	2,29	1,50	3,00*	2,00	1,43
RANKL	1	1/7	1/6	1/6	2/6	0/7	1/6	4/7	6/7	3/7
	2	3/7	4/6	5/6	2/6	6/7	4/6	3/7	1/7	3/7
	3	2/7	1/6	1/6	1/6	1/7	1/6	0/7	0/7	1/7
	4	1/7	0/6	0/6	1/6	0/7	0/6	0/7	0/7	0/7
	Média	1,42	0,63	0,63	1,16	1,14	1,00	0,42	0,28**	0,71

Comparação intergrupos:

*Significativamente maior que o Grupo RAR aos 7 dias ($p=0,040$)

**Significativamente menor que CAM ($p=0,011$) e RAR ($p=0,045$) aos 15 dias

FIGURAS

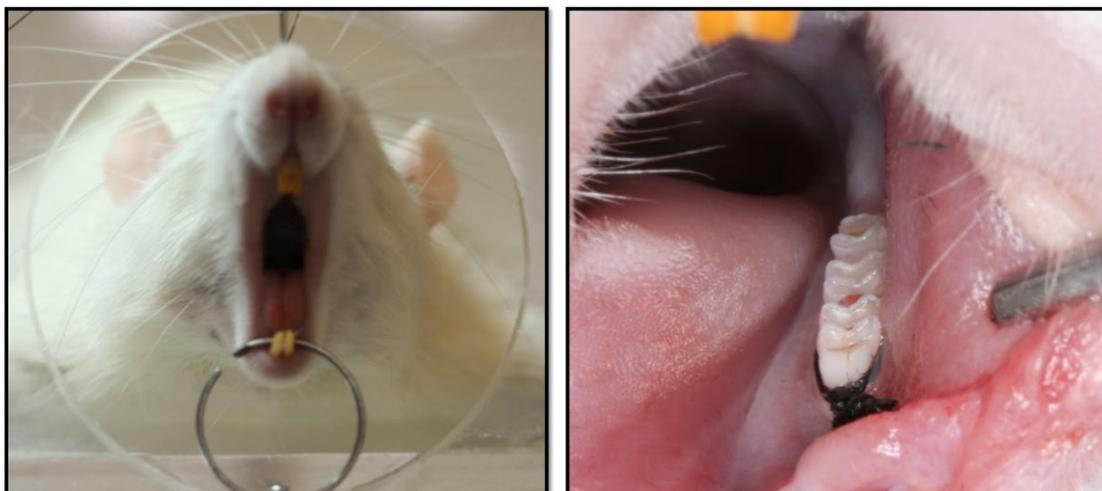


Figura. 1. Indução da doença periodontal. Posicionamento do animal em uma mesa adaptada para a abertura bucal (A). Inserção da ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo do animal (B).

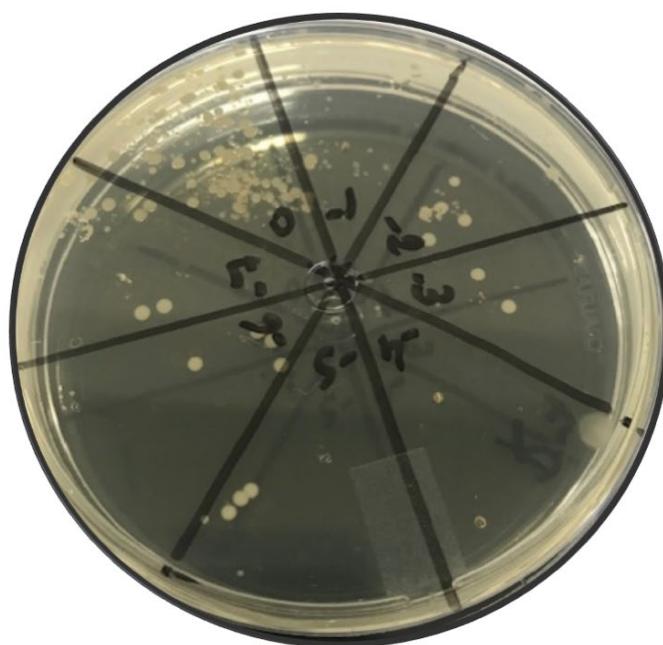


Figura 2. Unidades formadoras de colônias (UFC) em uma placa de Petri.

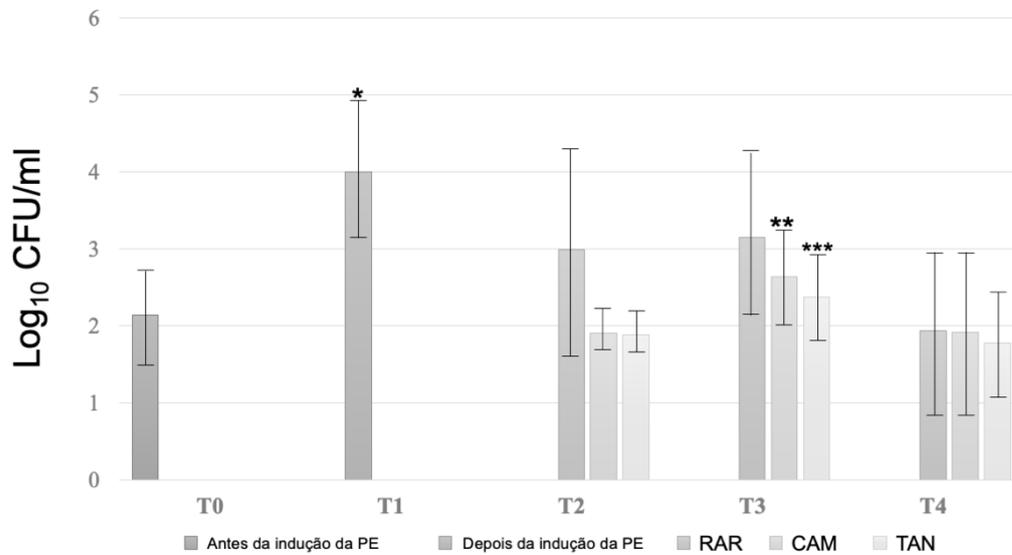


Figura 3. Valores médios do logaritmo da unidade formadora de colônias por mL (Log_{10} UFC / mL) obtidos do biofilme coletado para cada grupo experimental (7, 15 e 30 dias) após os tratamentos. Abreviações e símbolo: CAM - camomila; TAN - tansagem; RAR – raspagem e alisamento radicular; UFC - unidade formadora de colônias; *, significativamente maior que T0; **, significativamente menor que o Grupo RAR aos 15 dias; ***, significativamente menor que o Grupo RAR, aos 15 dias.

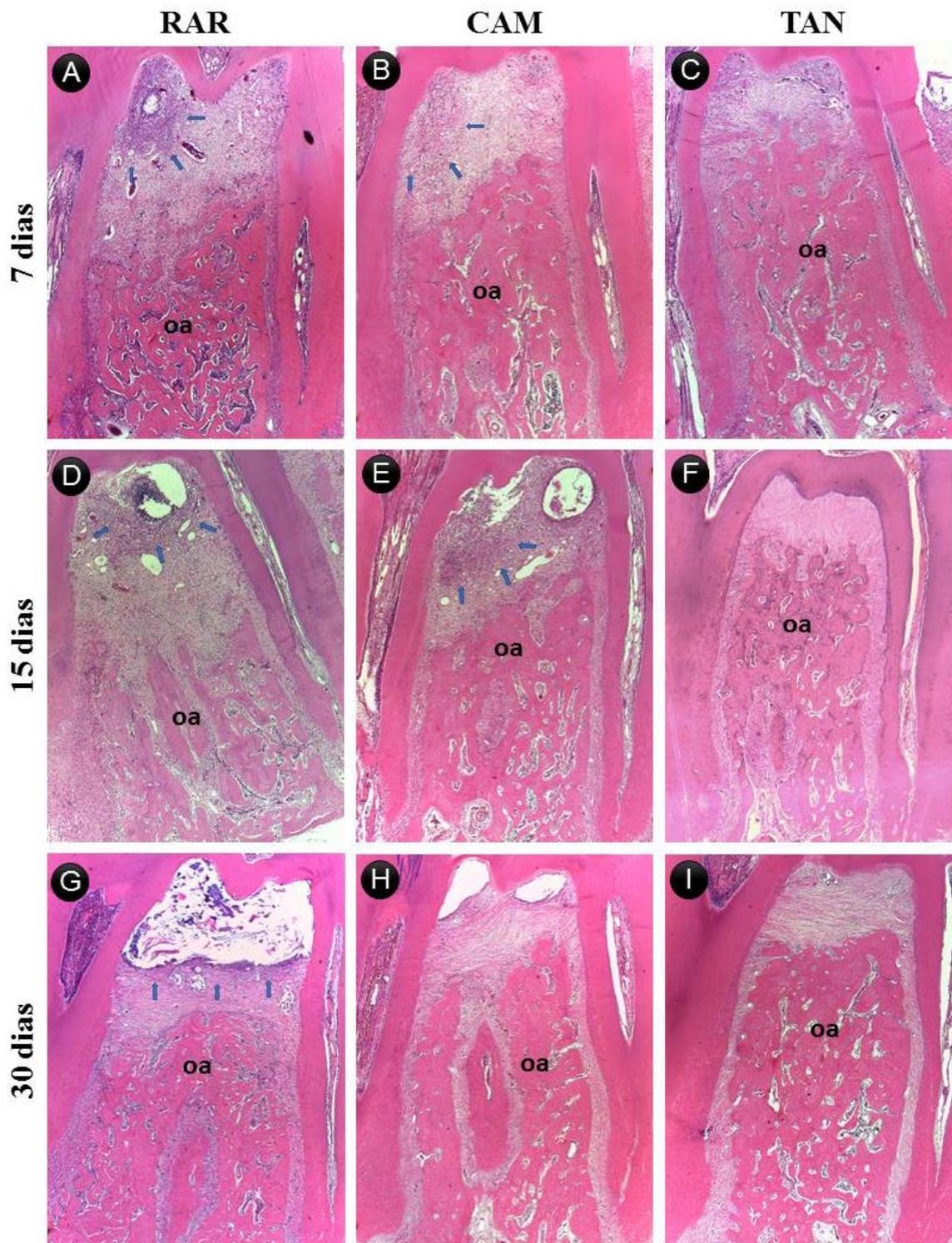


Figura 4. Fotomicrografias mostrando a área de infiltrado inflamatório na região de furca nos grupos RAR, CAM E TAN, respectivamente, 7 (A-C), 15 (D-F) e 30 (G-I) dias após os tratamentos. Abreviações: OA - osso alveolar; CAM, camomila; TAN - tansagem; RAR – raspagem e alisamento radicular. Coloração com hematoxilina e eosina; 40x.

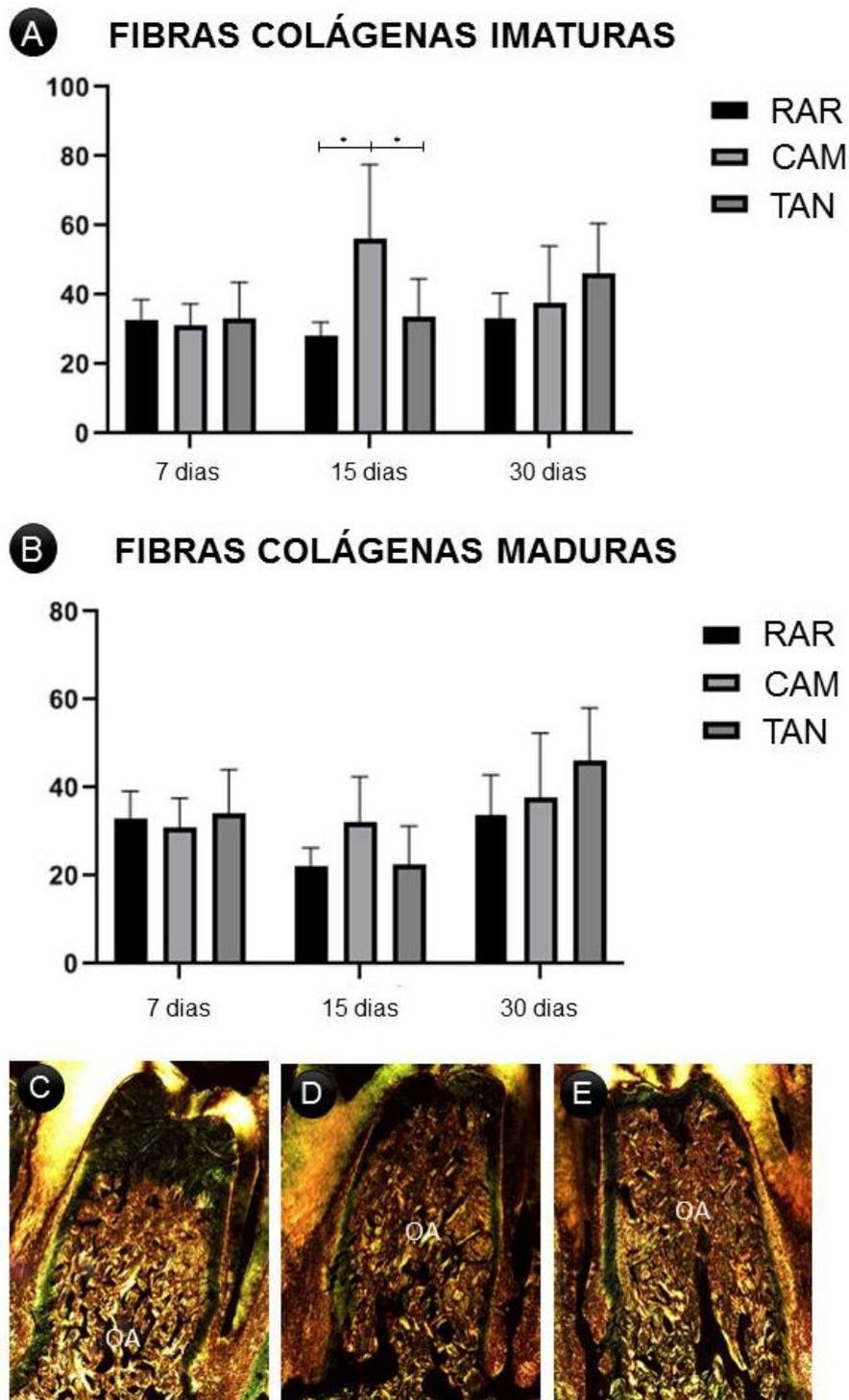


Figura 5. Gráficos mostrando a porcentagem de fibras colágenas imaturas (A) e maduras (B) e fotomicrografias mostrando a maturação do colágeno nos grupos RAR (C), CAM (D) e TAN (E) 15 dias após os tratamentos. Abreviações: OA - osso alveolar; CAM, camomila; TAN - tansagem; RAR – raspagem e alisamento radicular. *Significativamente maior que os grupos RAR e TAN aos 15 dias. Coloração vermelha de Picrosirius sob luz polarizada; 40x.

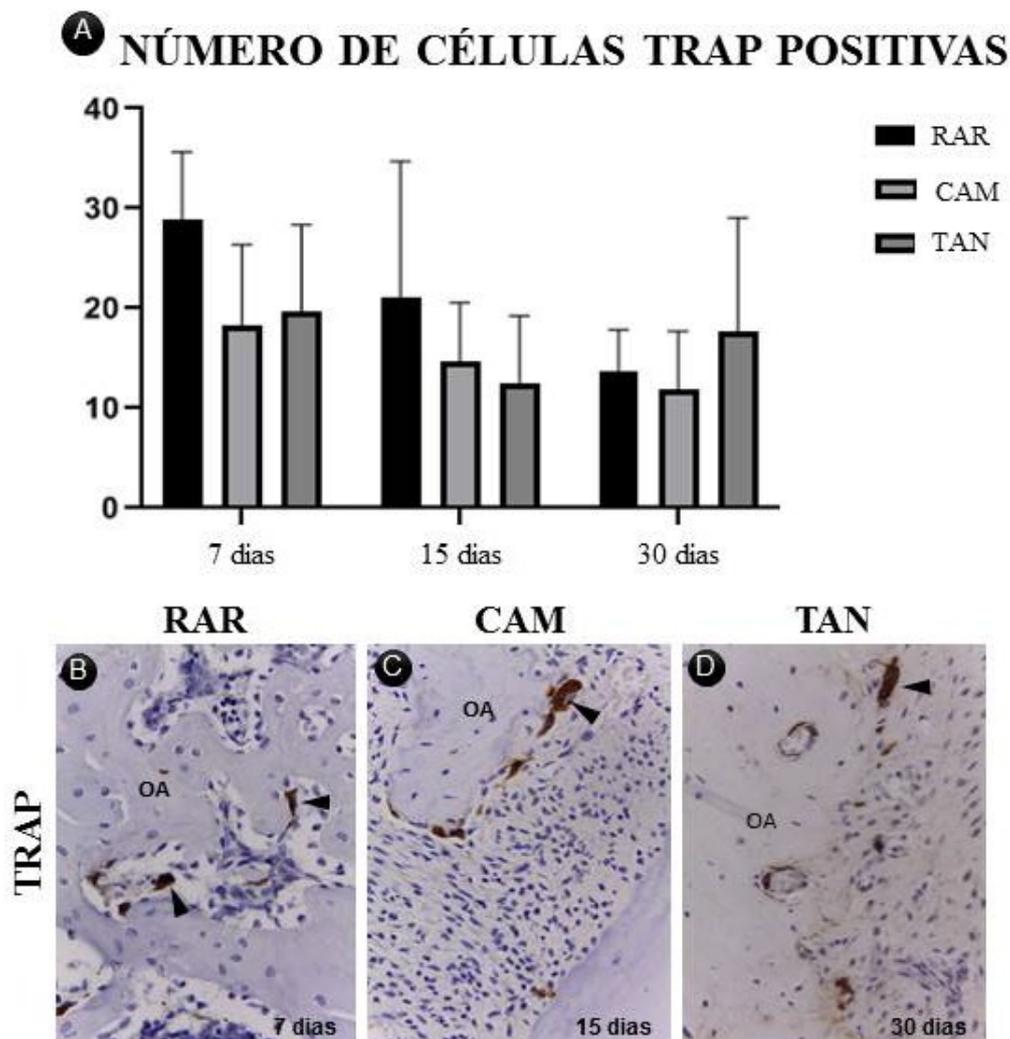


Figura 6. Fotomicrografias mostrando a marcação imunológica para TRAP nos grupos RAR, CAM e TAN, respectivamente, 7 (A), 15 (B) e 30 (C) dias após os tratamentos. Gráfico (A) mostrando o número de células TRAP-positivas nos grupos experimentais e período, em diferentes períodos analisados. Abreviações: OA - osso alveolar; CAM – camomila, TAN – Tansagem, RAR – raspagem e alisamento radicular. Contracoloração com hematoxilina; 400x.

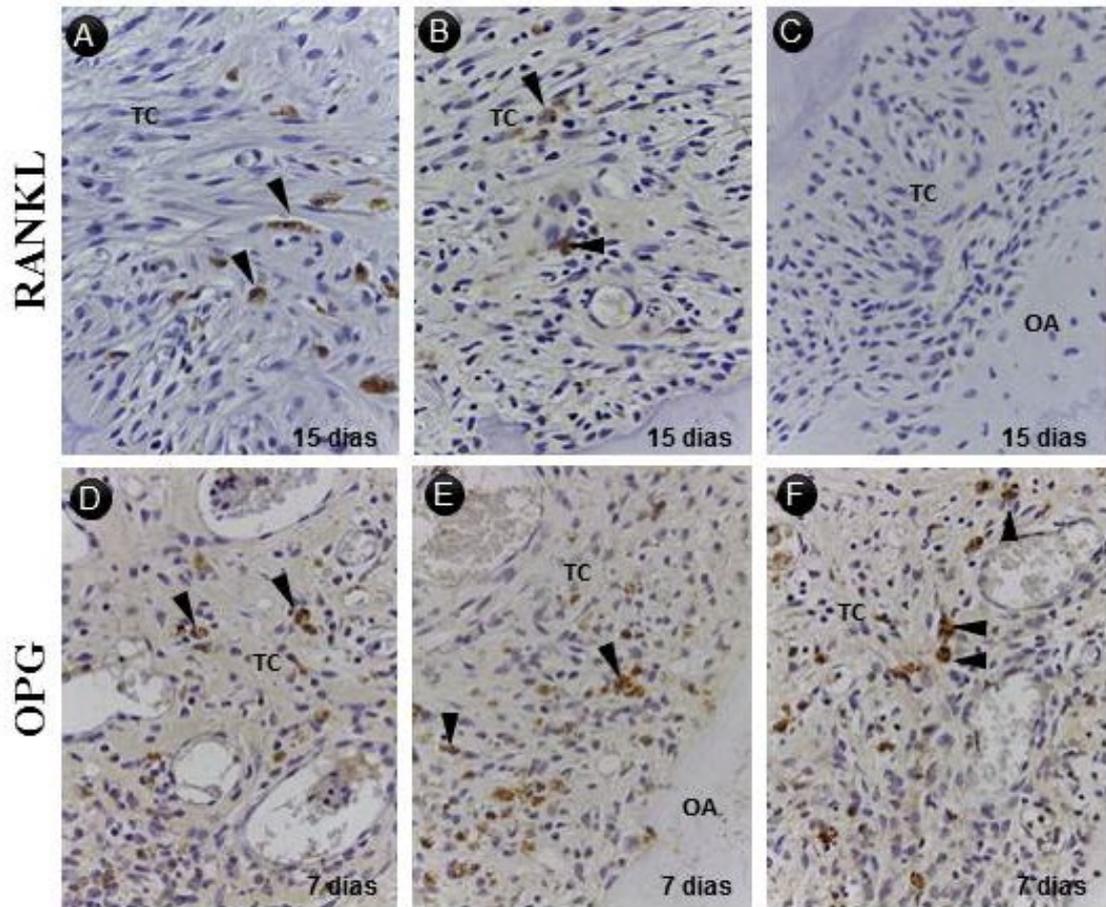


Figura 7. Fotomicrografias mostrando a marcação imunológica para RANKL nos grupos RAR (A), CAM (B) e TAN (C) 15 dias após tratamentos e fotomicrografias mostrando a marcação imunológica para OPG nos grupos RAR (D), CAM (E) e TAN (F) 7 dias após os tratamentos. Abreviações: OA - osso alveolar; TC – tecido conjuntivo; CAM – camomila, TAN – Tansagem, RAR – raspagem e alisamento radicular. Contracoloração com hematoxilina; 400x.

ANEXOS

**ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
(CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA – UNOESTE**

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "INFLUÊNCIA DE IRRIGAÇÃO SUBGENGIVAL COM EXTRATOS NATURAIS SOBRE O TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM RATOS. ESTUDO MICROBIOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E IMUNOISTOQUÍMICO", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 4496 e tendo como participante(s) YARA LOYANNE DE ALMEIDA SILVA LEVI (discente), MARCELA LUCIO CALDEIRA (discente), VALERIA RODRIGUES FREITAS (discente), NATÁLIA MARCUMINI POLA (participante externo), THIAGO MARCHI MARTINS (participante externo), LUCIANA PRADO MAIA ANDRAUS (docente), CHRISTINE MEN MARTINS (docente), CAROLINA DOS SANTOS SANTINONI (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

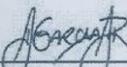
Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 20/06/2018.

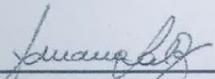
Vigência do projeto: 07/2018 a 12/2019.

ANIMAL VIVO

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Rattus norvegicus, albinus	72	300 gramas	90 dias	M	Biotério Central da UNOESTE

Presidente Prudente, 31 de Agosto de 2018.


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


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

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.