



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HENRIQUE MEISTER VALENGA

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS PERIODONTAIS DE
HOMENS USUÁRIOS DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS

CURITIBA

2019

HENRIQUE MEISTER VALENGA

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS PERIODONTAIS DE
HOMENS USUÁRIOS DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Setor de
Ciências da Saúde da Universidade Federal
do Paraná, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Steffens
Coorientadora: Prof^a. Dra. Geisla Mary Silva
Soares

CURITIBA

2019

Valença, Henrique Meister

Aspectos microbiológicos e imunológicos periodontais de homens usuários de esteroides anabolizantes androgênicos [recurso eletrônico] / Henrique Meister Valença – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. João Paulo Steffens
Coorientadora: Professora Dra. Gelsia Mary Silva Soares

1. Testosterona. 2. Anabolizantes. 3. Periodonto. I. Steffens, João Paulo. II. Soares, Gelsia Mary Silva. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 617.632



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA -
40001016065P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **HENRIQUE MEISTER VALENGA** intitulada: **ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS PERIODONTAIS DE HOMENS USUÁRIOS DE ESTERÓIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 01 de Julho de 2019.

JOÃO PAULO STEFFENS
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

LUIS CARLOS SPOLIDÓRIO
Avaliador Externo (UNESP/ARAR)

MARIA ÂNGELA NAVAL MACHADO
Avaliador Interno (UFPR)

Dedico essa dissertação especialmente ao meu pai, Jorge Valenga Filho e à minha mãe, Vivian Meister Valenga, pois são eles os maiores responsáveis pela enorme paixão que cultivo por nossa tão linda profissão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos professores com quem tive o privilégio de estar ao lado durante meu mestrado. Muito me admira a dedicação e amor empenhados por cada um de vocês que tornaram essa inesquecível experiência acadêmica possível para mim e para tantos discentes que esse programa ainda irá formar. Agradeço os professores Humberto Schwartz Filho e Geisla Mary Soares pelo carinho, receptividade e aprendizagem ao longo desses dois anos. Vocês em muito me inspiram. Um agradecimento especial ao meu professor orientador, João Paulo Steffens. Sua incessante busca pela excelência, interminável interesse e invejável conhecimento sobre a periodontia e sobre o mundo acadêmico, sem dúvida abrilhantaram essa conquista que hoje comemoramos juntos. Meus agradecimentos mais profundos são aos meus pais e irmã. O apoio (no mais amplo e diverso sentido da palavra), a compreensão, a humanidade, o exemplo e o amor de vocês é e sempre será o verdadeiro combustível para todas as minhas realizações e aspirações. Não menos profundo é meu agradecimento à minha querida namorada Nicole, que foi minha primeira e maior motivadora nessa e em tantas outras jornadas que já passaram e que ainda estão por vir. Sem dúvida todo o carinho e incentivo que você e sua linda família sempre me deram também foram fundamentais para que eu alcançasse o que alcanço hoje. Agradeço aos colegas de mestrado e de iniciação científica que fizeram parte de minha trajetória como mestrando: Stephanie Von Stein Cubas Warnavin, João Daniel Paganella Chaves, Thainá Biudes, Natalia Amanda Gomes e Anny Cardoso. Desejo a todos vocês um brilhante futuro. Ao Gabriel Guidio Guarenghi, agradeço pelas inesquecíveis horas de trabalho, viagem, laboratório, clínica e parceria, mas agradeço acima de tudo pelo grande amigo que se tornou para mim nesse último ano. Pode contar comigo como eu sempre pude contar com você. Aos inspiradores professores Magda Feres, Luis Carlos Spolidorio e suas equipes de servidores pela tão aberta recepção e disponibilidade em seus respectivos espaços, a Universidade de Guarulhos (UnG) e a Universidade Estadual Paulista – Campus Araraquara (FOAr/UNESP). Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os envolvidos no Programa de Graduação e de Pós-Graduação em

Odontologia da Universidade Federal do Paraná que, após minha graduação, me acolheu novamente em seu centenário e tão honrado leito.

RESUMO

A testosterona, além de ser o principal responsável pelo desenvolvimento de características sexuais nos homens, exerce importante papel em outros processos como o desenvolvimento do tecido muscular esquelético, manutenção e equilíbrio do humor e perfusão cerebral. Esteroides anabolizantes androgênicos (EAA) são derivados sintéticos desse hormônio amplamente utilizados não apenas por atletas, mas também por homens em geral. O uso abusivo dessas drogas pode trazer efeitos adversos ao medicamento tais como doenças cardíacas, toxicidade hepática, infertilidade, distúrbios comportamentais e possíveis alterações no tecido periodontal. O objetivo desse estudo foi avaliar aspectos microbiológicos e imunológicos do periodonto de homens usuários de EAA. Foram recrutados em academias e eventos de fisiculturismo 15 homens usuários de EAA (grupo EAA). Para o grupo controle, foram recrutados 15 homens pareados por idade e hábitos (praticantes regulares de atividades físicas) não usuários de EAA. Todos os participantes passaram por exame periodontal em que índice de placa (O'Leary), profundidade de sondagem (PS), sangramento à sondagem (SS) e nível clínico de inserção (NCI) foram avaliados. Amostras de fluido crevicular e de biofilme subgingival foram coletadas de dois sítios periodontias contralaterais em cada participante, sendo um saudável e o outro doente (PS>3mm, SS presente e NCI>0). Amostras de fluido crevicular foram analisadas para quantificação de proteína total (Bradford) e expressão de interleucina (IL)-1 β (ELISA). As amostras de biofilme passaram por teste *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. A idade dos participantes variou entre 23 e 40 anos (grupo EAA: 30,07 \pm 4,4 anos; grupo controle: 28,1 \pm 4,6 anos). A expressão de IL-1 β em sítios saudáveis do grupo caso não foi estatisticamente diferente daquela observada em sítios doentes, ao contrário do grupo controle (p<0,05). Somente em usuários de EAA foi observada uma correlação positiva estatisticamente significativa entre micro-organismos de complexos compatíveis com doença e a expressão de IL-1 β (r=0.42; p<0,05). O número de ciclos de EAA foi positivamente associado com uma maior presença de micro-organismos compatíveis com doença periodontal (r=0.62; p<0,05), mas não com maior expressão de IL-1 β ou proteína total (r=0.28 e 0.18, respectivamente; p>0,05). Embora sem diferenças estatisticamente significantes, usuários de EAA apresentaram maiores porcentagens de micro-organismos de complexos microbianos compatíveis com doença tanto em sítios saudáveis (61%) quanto em sítios doentes (55%) quando comparados com não usuários (35% em sítios saudáveis e 40% em doentes) (Mann Whitney; p>0,05). Concluímos que mesmo em sítios periodontais saudáveis, o perfil microbiano e a expressão de IL-1 β de usuários de EAA parece ser compatível com sítios doentes.

Palavras-chave: Testosterona; Anabolizantes; Periodonto.

ABSTRACT

Besides being the main responsible for sexual characteristics development in men, testosterone is important in other biological processes like skeletal muscle development, maintenance of the mood and brain perfusion. Anabolic androgenic steroids (AAS) are synthetic derivatives of this hormone largely used not only by athletes, but by men in general. The abuse of these substances may result in adverse effects associated with the medication such as heart conditions, liver toxicity, sterility, behavior disturbances and possibly changes in the periodontium. The aim of this study was to assess microbiological and immunological aspects of men under AAS abuse. Participants were recruited in gyms, bodybuilding events and championships. Fifteen men that admittedly used AAS (AAS group) and 15 men paired by age, and habits (gym regular goers) but not AAS users (control group) were admitted in this study. All participants went through a complete clinical periodontal examination in which plaque index (O'Leary), probing depth (PD), bleeding on probing (BOP) and clinical attachment level (CAL) were assessed. Crevicular fluid and subgingival biofilm samples were collected from two contralateral periodontal sites from each participant being one healthy and the other diseased (PD>3mm, BOP presence and CAL>0). Crevicular fluid samples were analyzed for total protein quantification (Bradford) and Interleukin (IL)-1 β expression (ELISA). Biofilm went through *Checkerboard DNA-DNA hybridization* test. The age of participants varied between 23 and 40 years of age (AAS group: 30.07 \pm 4.4 years; control group: 28.1 \pm 4.6 years). IL-1 β expression in healthy sites of the AAS group was statistically not different from the observed in diseased sites, unlike in the control group ($p < 0.05$). Only in the AAS group a statistically positive correlation between microorganisms compatible with disease and the IL-1 β expression was observed ($r = 0.42$; $p < 0.05$). The number of AAS cycles was positively associated with a greater presence of microorganisms compatible with disease ($r = 0.62$; $p < 0.05$), but not with IL-1 β expression or total protein levels ($r = 0.28$ and 0.18 , respectively; $p > 0.05$). Although without statistically significant differences, AAS users presented higher percentages of microorganisms compatible with disease in both, healthy (61%) and diseased (55%) sites when compared to non-users (35% in healthy sites and 40% in diseased sites) (Mann Whitney; $p > 0.05$). We concluded that even in periodontal healthy sites, the microbial profile and the IL-1 β expression in AAS users seem to be compatible with periodontal diseased sites.

Key-words: Testosterone; Steroids; Periodontium.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – **(A)** MÉDIAS DA CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS MULTIPLICADA POR 10^5 EM SÍTIOS SAUDÁVEIS E DOENTES NO GRUPO CONTROLE E EAA; **(B)** PORCENTAGENS DOS COMPLEXOS MICROBIANOS ACTINOMICETOS, ROXO, AMARELO, VERDE, LARANJA, VERMELHO E OUTROS MICRO-ORGANISMOS EM SÍTIOS SAUDÁVEIS E DOENTES DE INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE E EAA. **(C)** GRÁFICO BOXPLOT COM MEDIANA, MÍNIMA E MÁXIMA DA CONTAGEM TOTAL DE MICRO-ORGANISMOS EM SÍTIOS PERIODONTAIS SAUDÁVEIS E DOENTES DOS GRUPOS CONTROLE E EAA **(C)**.....43
- FIGURA 2 – CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL E DE IL-1 β EM SÍTIOS SAUDÁVEIS E DOENTES NOS GRUPOS CONTROLE E EAA.....44
- FIGURA 3 – CORRELAÇÃO ENTRE A PROFUNDIDADE DE SONDAGEM EM MILÍMETROS E A EXPRESSÃO DE IL-1 β **(A)** E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL **(B)** NOS GRUPOS CONTROLE E EAA.....45
- FIGURA 4 – **(A)** CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE IL-1 β E O NÚMERO DE CICLOS DE EAA. **(B)** CORRELAÇÃO ENTRE A PORCENTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS COMPATÍVEIS COM DOENÇA E O NÚMERO DE CICLOS DE EAA.....46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DADOS DEMOGRÁFICOS, SOCIOECONÔMICOS E CLÍNICOS PERIODONTAIS DOS PARTICIPANTES DOS GRUPOS CONTROLE E EAA. ADAPTADO DE WARNAVIN, 2019.....	47
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	DESENVOLVIMENTO	22
3.1	ARTIGO 1.....	22
4	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	APÊNDICE 1 – METODOLOGIA DETALHADA	53
	ANEXO 1 – PARECER DA APROVAÇÃO DA EMENDA DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA – CONEP	59
	ANEXO 2 – NORMAS DA REVISTA <i>JOURNAL OF PERIODONTOLOGY</i>	62

1 INTRODUÇÃO

Dentre suas diversas atuações no corpo humano, especialmente no organismo masculino, a testosterona (T) já foi relacionada na literatura com manutenção do humor (inclusive em quadros de depressão), desenvolvimento e manutenção do tecido muscular esquelético, aumento da perfusão cerebral e melhoria na capacidade cognitiva em homens (BAIN, 2010; AZAD et al., 2003; POPE et al., 2003). Além disso, a testosterona é também o principal hormônio andrógeno, sendo a principal responsável pelo desenvolvimento e manutenção da caracterização sexual primária e secundária nos homens (BAIN, 2010; PARK et al., 2019).

Esteroides anabolizantes androgênicos (EAA) são derivados sintéticos da testosterona cada vez mais utilizados de maneira abusiva, legal ou ilegalmente, especialmente por atletas profissionais e/ou amadores. Essa é uma realidade em regiões de todo o mundo, inclusive em países desenvolvidos como os Estados Unidos e no Reino Unido (KANAYAMA et al., 2018; KORKIA e STIMSON, 1997). Os principais motivos para o uso de maneira legal ou ilegal de EAA são para melhorar o desempenho físico, obter ganho acelerado de massa muscular e para melhorias em aspectos estéticos do corpo masculino (KORKIA e STIMSON, 1997). Essas drogas já vêm sendo vastamente utilizadas também por homens não atletas que, pressionados pelo ideal de um corpo esteticamente perfeito ou pela busca por rápida melhoria em seu desempenho físico, optam por fazer o uso abusivo de EAA. Outro motivo comum para seu uso é como tentativa de uma manutenção prolongada de características sexuais masculinas em homens mais velhos (RANEHMA et al., 2015).

Os derivados da testosterona adquiriram um perfil de consumo tão problemático que muitos países como Alemanha e Inglaterra já os tratam como um problema de saúde pública (KANAYAMA et al., 2018). Uma meta-análise realizada por Sagoe et al. em 2015 incluiu 50 artigos sobre o uso de EAA ao redor do mundo e concluiu que usuários dessas medicações são potencialmente expostos a graves malefícios pelo simples uso desses compostos. Os mesmos autores destacam que além dos riscos eminentes desta prática, existe uma correlação positiva entre o uso de EAA e o abuso de

outras drogas lícitas e ilícitas, sendo prudente que clínicos, pesquisadores e profissionais da área da saúde sejam informados dessa crescente realidade.

Apesar dos possíveis riscos e efeitos colaterais do uso indiscriminado de EAA, desde a década de 1930, quando os primeiros andrógenos de origem sintética (como a metiltestosterona) foram elaborados (FOSS e SIMPSON, 1959), também se observaram alguns benefícios para diversas condições sistêmicas em homens. A prática de terapia de reposição de testosterona (TRT) parece obter resultados satisfatórios quando devidamente indicada. Quadros de disfunção erétil recorrente, hipogonadismo e síndromes de deficiência androgênica são, segundo a Academia Americana de Urologia (AUA), indicações claras (porém específicas) para a TRT em homens (MUNHAL et al., 2018). Existem indicações para a terapia consideradas ainda não absolutas pela falta de evidências na literatura, dentre elas estão: diminuição e manutenção de gordura corporal, melhorias na capacidade cognitiva, controle da diabetes, perfil lipídico e diminuição de fadiga (PARK et al., 2019)

Nos Estados Unidos, embora as prescrições médicas de testosterona tenham decaído significativamente no período de 2013 a 2016, antes disso, o número de prescrições do hormônio triplicou de 2001 a 2011. Segundo Park et al. (2019), não existe justificativa clínica e epidemiológica compatível com esse aumento de prescrições. Os mesmos autores reforçam que a principal indicação para a TRT deve ser o baixo nível sérico da testosterona associado a sintomas clínicos reportados por pacientes, e não exclusivamente pelo nível sérico constado em exames laboratoriais.

Junto com o exponencial crescimento da prática da TRT, nasceu uma preocupação com os possíveis efeitos colaterais e complicações clínicas dessa prática. Usuários de esteroides anabolizantes androgênicos estão sujeitos a reações adversas ao medicamento locais como acne, retenção de líquido e ginecomastia. Efeitos adversos sistêmicos geralmente acometem homens que são usuários indevidos da testosterona ou de EAA há mais tempo. Intoxicação hepática irreversível, condições cardíacas severas, hipertensão arterial, distúrbios no sangue como policitemia e anemia, depressão, atrofia testicular e esterilidade são alguns desses efeitos (RAHNEMA et al., 2014).

A Testosterona na Saúde do Homem

Várias associações entre a testosterona e o metabolismo ósseo em humanos já foram reportadas. A osteoporose tem grande prevalência entre mulheres em idade pós-menopáusia, no entanto, osteoporoses secundárias já representam a principal causa de perda óssea sistêmica também entre homens, especialmente em idades avançadas (KLEEREKOPER et al., 1990). Canael et al., 2000 e Laitinen et al., 2012, em estudos observacionais em homens com hipogonadismo, recomendaram que a TRT seja realizada de maneira individualizada e precoce nesses indivíduos afim de atingir concentrações mais próximas o possível de níveis fisiológicos de testosterona. Ainda segundo os autores, essa terapia parece ser fundamental para que esses indivíduos jovens alcancem não apenas um metabolismo ósseo compatível com saúde, bem como fertilidade e outros benefícios gerais aos seus organismos.

O envelhecimento é um processo natural que nos homens está associada com a queda gradual nos níveis séricos de testosterona (KANAYAMA et al., 2018). Estudos recentes (LOO et al., 2019; MCCLINTOCK et al, 2019; VIGEN et al., 2013 e RAHNEMA et al., 2014) vem reforçando a hipótese de que homens que fazem uso de testosterona para o tratamento ou amenização de situações eminentes do envelhecimento apresentam até duas vezes mais chances de desenvolver condições cardíacas graves como isquemia do miocárdio, derrame isquêmico e ainda uma condição de hipogonadismo induzido pelo uso prolongado de esteroides anabolizantes que, segundo autores, está associado com uma maior atividade de agregação plaquetária (AJAYI et al., 1995), aumento na formação de placa coronária e na formação de trombos (BADIMON et al., 2012) e aumento no risco de desenvolver apneias noturnas obstrutivas (LATTIMORE et al., 2003). Todos os autores supracitados observaram em seus respectivos estudos que essas condições são ainda mais recorrentes nos dois primeiros anos do uso de EAA mas que, embora positiva essa correlação, mais estudos são necessários para o melhor entendimento sobre o efeito da testosterona nesses órgãos e tecidos.

No metabolismo dos tecidos ósseos a ação dos EAA ainda não é completamente compreendida, embora muitos estudos venham observando

influências diretas desses compostos nos ossos. Homens portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico congênito (HHC) são indivíduos interessantes para a avaliação da testosterona no metabolismo ósseo a longo prazo, uma vez que esses pacientes geralmente são submetidos a terapias de reposição de testosterona logo muito jovens e permanecem fazendo seu uso até idades avançadas (ANTONIO et al., 2019). Em um estudo de coorte, Antonio et al., 2019, observaram a mineralização óssea por meio de exames de densitometria óssea de 25 homens com HHC dos quais, 19 já faziam TRT há em média 7 anos, e outros 6 homens que não faziam, mas passaram a fazer no início do estudo. Os autores concluíram que os efeitos da reposição da testosterona no tecido ósseo de homens com essa condição são mais notórios nos primeiros anos da terapia e que, embora a estrutura óssea tenha apresentado uma melhor densidade mineral com o passar do tempo, a maioria dos participantes terminou o estudo ainda em condição de osteopenia ou até mesmo de osteoporose.

Impacto de Altos Níveis de Testosterona na Cavidade Bucal

Soory em 2000 relatou a existência de alguns micro-organismos presentes no biofilme periodontal como *Porphyromonasgingivalis* e *Prevotella intermédia* são capazes de metabolizar hormônios esteroides. Relatou também que a presença de inflamação pode alterar a expressão dos receptores de hormônios esteroides no tecido periodontal, fazendo com que a ação, por exemplo da testosterona, seja também alterada no tecido em questão.

A testosterona atua principalmente quando se converte em dihidrotestosterona (DHT), seu metabólito mais comum. Essa conversão ocorre em diversos tecidos do corpo humano inclusive no periodontal. Tanto receptores diretos da testosterona como de DHT são vastamente presentes no tecido gengival, especialmente quando esse tecido apresenta sinais de inflamação (KASACA & SOORY, 1996). Além disso, quando avaliada a cicatrização do tecido periodontal de homens jovens com níveis de testosterona baixos ou fisiológicos apresentaram um tempo de cicatrização tecidual mais rápido em relação a homens com a mesma idade, mas com altos níveis séricos de testosterona (ENGELAND et al. 2009). Essas observações

nos permitem pensar que diferentes níveis de testosterona podem estar associados com diferentes perfis de resposta inflamatória nos tecidos orais.

Soory et al., em 2000 já observaram associação entre metabolização de esteroides por bactérias do tecido gengival e maiores níveis de produção de dihidrotestosterona não necessariamente naqueles com um perfil microbiano com mais periodontopatógenos, mas sim naqueles com um perfil microbiano mais amplo e variado. Essa característica de biofilme periodontal pode representar um indicador na maneira como o hospedeiro se relaciona com a doença periodontal tanto na sua duração (cronicidade) como no seu desenvolvimento (severidade).

Os fibroblastos de tecidos gengivais inflamados metabolizam a testosterona em DHT de forma aumentada quando comparado com fibroblastos de tecidos saudáveis (SOORY 2000). Essa conversão, por sua vez, parece ser maior nos tecidos com presença de células advindas de processos inflamatórios (SOORY e VIRDI 1999). Parkar et al, 1998 em um estudo *in vitro*, sugeriram que a DHT presente nos tecidos gengivais inflamados regula positivamente a proliferação de fibroblastos, de modo que altas concentrações da testosterona ou da DHT nos tecidos gengivais e periodontais parecem estar associadas com um perfil pró-inflamatório aumentado. Além disso, o mesmo estudo levanta a hipótese de que a testosterona pode regular seus próprios receptores de modo que tanto níveis supra fisiológicos como níveis sub fisiológicos podem modificar a resposta do tecido à inflamação.

Estudos na literatura revelaram alguns achados importantes quando avaliados parâmetros clínicos nos tecidos periodontais em usuários abusivos de EAA. Ozcelik et al., em 2006, avaliaram 44 fisiculturistas amadores dos quais 24 eram usuários de EAA há mais de um ano e os outros 20 não eram usuários. Os participantes foram pareados por idade que variou de 19 a 27 anos. Todos os participantes eram não fumantes e não haviam realizado nenhuma forma de tratamento periodontal bem como não haviam ingerido anti-inflamatórios ou antibióticos nos 6 meses anteriores ao estudo. Foram avaliados índice de placa, índice de inflamação gengival e índice de crescimento gengival. Os usuários de EAA demonstraram índices de crescimento gengival estatisticamente superiores aos não usuários,

demonstrando uma relação positiva entre usuários de longo prazo de EAA com um perfil gengival inflamatório maior.

A ação do hormônio no tecido ósseo dos maxilares parece acontecer especificamente em processos inflamatórios por meio da expressão de citocinas, mas também está associada com a dinâmica de células precursoras de osteoblastos e osteoclastos (MICHAEL et al., 2005; STEFFENS et al., 2014). Aumentos na concentração de testosterona aumentam diretamente a osteoclastogênese bem como a razão de RANKL:OPG por osteoblastos, demonstrando também uma potencial regulação indireta nesse processo da dinâmica óssea (STEFFENS et al., 2014; STEFFENS et al., 2015).

Steffens et al., em 2012, avaliaram as consequências de níveis supra e sub fisiológicos de T na perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos machos. Sessenta e três animais foram divididos em 6 diferentes grupos experimentais: controles (cirurgia *sham*) com e sem ligadura; animais orquiectomizados com e sem ligadura e animais orquiectomizados e suplementados com injeções de testosterona com e sem ligadura. Os autores concluíram que embora apenas animais com níveis sub fisiológicos de testosterona tenham apresentado diferença estatística na perda óssea induzida por ligadura, tanto níveis supra quanto sub fisiológicos do hormônio influenciaram o metabolismo ósseo alveolar. Portanto, níveis normais de testosterona podem significar um fator protetivo para a perda de osso alveolar em processos inflamatórios.

Steffens et al., em 2014, também em um estudo *in vivo* em ratos, demonstraram que tanto altos níveis quanto baixos níveis de testosterona em animais orquiectomizados estavam relacionados com maiores perdas de altura óssea alveolar induzida por ligadura. Também foram realizadas análises quanto à concentração de Interleucina (IL)-1 β e IL-6 sistêmicos e no periodonto. Em animais sem ligadura os diferentes níveis de testosterona não resultaram em diferenças na concentração das interleucinas sistêmica ou localmente. Altos níveis de testosterona se mostraram associados com maiores perdas ósseas. Os achados reforçam a hipótese de que a testosterona parece ter influência direta no processo de reabsorção do osso alveolar especialmente na presença de inflamação quando em concentrações não fisiológicas (supra fisiológicas).

Brusca et al., em 2014 pesquisaram possíveis alterações microbiológicas e severidade da doença periodontal em homens fisiculturistas usuários de EAA injetáveis. Noventa e dois homens com idade entre 19 e 42 anos foram incluídos na pesquisa. Os homens usuários de EAA se mostraram estatisticamente com mais doença periodontal e com menos casos de saúde periodontal em relação ao grupo de não usuários. Além disso, uma diferença estatística foi observada nos índices de placa entre usuários e não usuários de EAA, sendo piores nos usuários. Não foi observada diferença estatística no nível clínico de inserção entre os grupos, mas os usuários de EAA apresentaram mais doença periodontal severa do que os não usuários. Na avaliação microbiológica o uso de esteroides parece ter sido capaz de modificar o perfil do biofilme de usuários tornando-o mais compatível com inflamação e doença periodontal. *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* e culturas de diferentes espécies de *Candida* foram estatisticamente superiores no grupo de usuários, o que os autores relacionaram com um risco aumentado para o desenvolvimento de doença periodontal severa.

Steffens et al., em 2015, afim de observar a relação entre níveis séricos de testosterona e a prevalência e severidade da doença periodontal, realizaram um estudo observacional com dados da terceira *National Health and Nutrition Examination Survey* - NHANES III. Além disso, também pesquisaram a relação de outros hormônios sexuais e fatores determinantes para baixos níveis de testosterona como estradiol (metabólito da testosterona), globulina ligante de hormônio sexual e outros metabólitos da testosterona ou da DHT. Foram avaliados 755 homens, todos com pelo menos 30 anos de idade e que haviam realizado exames para determinar concentração sérica de testosterona bem como exame periodontal. A periodontite foi mais prevalente em homens com altos níveis de testosterona quando comparados aos homens com concentrações normais do hormônio (*odds ratios* de 2.1; 1 para 4,5 com intervalo de confiança de 95%). Os altos níveis de testosterona também foram associados com maior severidade da doença periodontal (*odds ratios* de 2.1; 1 para 4,3 com intervalo de confiança de 95%).

Warnavin et al., em 2018, avaliaram sítios periodontais saudáveis e doentes (inflamados) de 30 homens praticantes regulares de atividades físicas de força dos quais 15 eram usuários de anabolizantes e 15 não eram (controles).

Os participantes não portavam nenhuma doença sistêmica, eram todos não fumantes e foram pareados por idade. Foram avaliados índice de placa, sangramento marginal, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI). Os autores observaram uma maior quantidade de sítios periodontais doentes nos usuários de EAA. Além disso, mais sítios com $PS \geq 4\text{mm}$ e mais sítios com $PS \geq 4\text{mm}$ com presença de sangramento à sondagem foram observados em usuários de EAA. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação ao NCI.

Levando-se em consideração que o uso abusivo de EAA parece estar associado a dados clínicos inflamatórios piorados (WARNAVIN et al., 2018 e OZCELIK et al., 2006), um melhor entendimento do processo inflamatório desses indivíduos se faz necessário. Uma das formas mais comuns de observar inflamação no tecido periodontal é por meio da concentração de IL-1 β , uma interleucina fundamental no processo de resposta do hospedeiro frente a processos inflamatórios (DINARELLO, 1996). Existe mais de uma via produtora dessa interleucina, embora a maioria dos estudos demonstre a sua produção via células do sistema imune inato como monócitos e macrófagos (CASTEJON e BROUGH, 2011), células muito atuantes também no tecido periodontal. A periodontite é caracterizada por uma sobre produção acentuada de interleucinas pró-inflamatórias tais como IL-6, Fator de necrose tumoral (TNF) e da própria IL-1 β (MOGI et al., 1999; RAWLINSON et al., 2000). Além disso, a IL-1 β também parece estar associada com o desenvolvimento da doença periodontal e com a absorção de osso alveolar (THUNELL et al., 2010).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar aspectos microbiológicos e a expressão de IL-1 β no periodonto de homens usuários de esteroides anabolizantes androgênicos (EAA).

2.1 Objetivos específicos

- Correlacionar os aspectos microbiológicos encontrados com os dados de profundidade de sondagem obtidos no estudo;
- Correlacionar as expressões de IL-1 β e de proteína total encontrados com os dados de profundidade de sondagem obtidos no estudo;
- Comparar a proporção dos complexos de micro-organismos periodontais entre homens usuários e não usuários de EAA;
- Comparar a prevalência de micro-organismos compatíveis com doença ou saúde periodontal entre usuários e não usuários de EAA;
- Quantificar a expressão de IL-1 β em amostras de fluido crevicular dos participantes;
- Quantificar a expressão de proteína total em amostras de fluido crevicular dos participantes;
- Correlacionar os aspectos microbiológicos encontrados com aspectos imunológicos (proteína total e IL-1 β) obtidas no estudo;
- Correlacionar as expressões de IL-1 β , proteína total e achados microbiológicos com número de ciclos de EAA.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Artigo 1

PERIODONTAL MICROBIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF ANDROGENIC ANABOLIC STEROIDS IN MALE USERS

Henrique M. Valenga*

Stephanie v. S. C. Warnavin*

Thainá B. C. Costa†

Joao D. P. Chaves†

Magda Feres‡

Luis C. Spolidorio§

Denise M. P. Spolidorio§

Geisla M.S. Soares*

João P. Steffens*

*Postgraduate Program in Dentistry, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

†School of Dentistry, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

‡Postgraduate Program in Dentistry, Universidade Guarulhos, Guarulhos, São Paulo, Brazil.

§Department of Physiology and Pathology, UNESP – Univ Est Paulista, School of Dentistry at Araraquara, Araraquara, São Paulo, Brazil

Corresponding Author:

Prof. Dr. João Paulo Steffens. Av. Prof. Lothário Meissner, 632. Curitiba, PR, Brazil Zip-Code 80210-170. Phone: +554133604032.

E-mail: joao.steffens@ufpr.br

Word count: 2761

Number of figures: 5

Number of references: 32

Short running title: Periodontium of androgenic anabolic steroids abusers.

One-sentence summary: The use of AAS negatively affects microbiological and immunological aspects of periodontally healthy sites making them compatible with periodontally diseased sites.

ABSTRACT

Background: High testosterone levels have been linked with higher prevalence and severity of periodontitis. Androgenic anabolic steroids (AAS) are synthetic derivatives of testosterone. AAS abuse can lead to several systemic adverse effects. The aim of this study was to assess microbiological and immunological aspects in the periodontal tissues of AAS male users.

Methods: Thirty men, fifteen AAS users (AAS group) and 15 non-users (control), matched by aged and habits (physical activity) were recruited. Clinical examination assessing probing depth (PD), bleeding on probing (BOP) and clinical attachment loss (CAL) was performed. Crevicular fluid and subgingival biofilm were collected from two contralateral sites of each participant, one healthy and another diseased (PD>3mm, presence of BOP and CAL>0mm). Crevicular fluid samples were assessed for total protein (Bradford) and Interleukin-1 β (ELISA). Biofilm was evaluated using Checkerboard DNA-DNA hybridization.

Results: IL-1 β expression was statistically higher in diseased sites when compared to healthy sites only in the control group ($p<0.05$). Only in the AAS group a statistically positive correlation between microorganisms from diseases compatible complexes and the IL-1 β expression was observed ($r=0.42$; $p<0.05$). AAS cycles was positively associated with higher percentages of microorganisms compatible with disease ($r=0.62$; $p<0.05$), but not with IL-1 β or total protein concentrations ($r=0.28$ and 0.18 , respectively; $p<0.05$).

Conclusions: Even in healthy conditions, the periodontium of AAS users showed a profile of IL-1 β compatible with diseased tissue. The microbiology of periodontal

biofilm seems to be more pathogenic specially in AAS prolonged users, possibly turning them into a higher risk group for periodontal disease.

Key words: Testosterone, Steroids, Periodontium.

INTRODUCTION

Besides being the main hormone when it comes to primary and secondary sexual characteristics development in men,^{1,2} testosterone (T) has already been associated to other functions in human body such as mood maintenance and regulation, cerebral perfusion growth, development of skeletal muscle tissues and participation in the bone tissue metabolism.^{2,3,4} Literature isn't yet clear about many other functions T might have in human metabolism.

Androgenic anabolic steroid (AAS) are synthetic drugs that have been increasingly abused (legally or illegally) all around the world.^{5,6} It is usually used by professionals or amateur athletes, but it also has been reaching the interest of men in general (non-athletes). It is normally used for improving physical efficiency, accelerated muscle growth, sexual activity improvement, aesthetic purposes and to extend sexual characteristics phenotypes.⁷ The objective of users is normally directly associated with the intensity and quantity of AAS use during a certain period of time, which is commonly called as an AAS cycle.⁸

Periodontal biofilm is a complex organization that suffers many changes according to host immune capacity and environment conditions.⁹ Environmental changes can generate a shift in microbiological profile by increasing microorganism associated with periodontitis (red and orange microbial complexes) and decreasing the ones associated with periodontal health (purple, yellow, green and *Actinomyces* complexes).^{10,11} Some studies have reported the effects of high levels of T and androgenic anabolic steroids (AAS) abuse in the periodontium.^{5,6} High levels of testosterone were associated with gingival enlargement⁵, higher percentages of diseased periodontal sites^{6,12} and higher prevalence and severity of periodontitis in humans.¹³ *In vivo* studies in rats also

reported that testosterone may have a regulatory effect on gingival and periodontal tissue.¹⁴ Supraphysiologic levels of testosterone have also been associated with higher rates of periodontal bone resorption,¹⁴ modifications on the regulatory RANKL:OPG turnover pathway of the bone¹⁵ and in the production of the pro-inflammatory cytokine TNF- α and Interleukin-1 β .¹⁶ Another study demonstrated that AAS users presented a more pathogenic periodontal microbiota.⁶

The abusive use of AAS have been associated with many systemic side effects such as fluid retention, acne overgrowth, hepatic intoxication, arterial hypertension, blood cells disorders, anemia, depression, infertility and even heart conditions.¹⁷ Inflammatory processes have been linked to alterations in T and in its derivatives such as estradiol and dihydrotestosterone receptors in any tissue where they are present which includes periodontium,¹⁸ meaning that T has the capacity of modifying the immune capacity of the host. Hence, the aim of this study was to evaluate periodontal microbiological and immunological aspects of the periodontium of male AAS users.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Brazilian National Commission for Research Ethics – CONEP, under the protocol numbers: 1.906.729 - 2.443.657. It was carried from March 2017 until April 2019 at the Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

Men aged 18 years or older, practitioners of physical activity (at least 3 times a week in the last three months) and that admittedly were, at the moment of the interview, making use of AAS for physical purposes were included in the

sample for the case group (AAS group). For the control group, men with the same characteristics of age and physical activities practice but non users of AAS were invited.

All of the participants had at least 20 teeth excluding third molars, were nonsmokers, had no systemic disease or conditions and were not making use of any other medication that could be of any influence on the inflammatory, immunological, hormonal and clinical conditions of the periodontium. The men in control group had never used AAS previously.

Clinical examination

All men that accepted to participate of the study signed an informed consent term. Before clinical examination, the AAS users were asked about their use of AAS routine: what substance, for how long (how many cycles) and dosage. A previously calibrated and trained researcher (SVSCW, Kappa $\pm 1\text{mm}=0.97$) performed a whole mouth clinical examination by assessing O'Leary's plaque index (PI),¹⁹ probing depth (PD), bleeding on probing (BOP) and clinical attachment loss (CAL).

For microbiological and immunological sample collection, two periodontal interproximal sites from contralateral teeth were chosen in each participant, being one of the sites periodontally healthy and the other one with periodontal disease. The greatest PD was chosen to represent the diseased site, that also had to present bleeding on probing and clinical attachment loss. Each participant was then classified according to the criteria used for describing periodontal health or disease based on the 2018 American Academy of Periodontology and European

Federation of Periodontology Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions.²⁰

Microbiological samples

For microbiological investigations, subgingival biofilm was collected from one healthy and one diseased site as mentioned above. Supragingival plaque was removed from the sites and the area was isolated with sterilized cotton rolls. Subgingival biofilm was removed of the site by using sterilized 5-6 Gracey scaler^{ll} that was placed at the bottom of the periodontal sulcus or pocket (as previously noted in the PD). The samples were placed in separated Eppendorf tubes containing 150 μ L of a buffer solution. Then, 100 μ L of a 0.5M solution of sodium hydroxide (NaOH) was added in each tube. All samples were stored in a -80°C freezer until the time the samples were assessed via Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis.²¹ For microbiological exploratory analysis we considered microorganisms from the *actinomyces*, yellow, green and purple complexes as “health compatible”. Bacteria from the orange and red complexes were considered as “compatible with disease”.¹⁰

Immunological samples

Crevicular fluid was collected from the same healthy and diseased periodontal sites mentioned above. The site was previously isolated with cotton rolls and after supragingival cleaning, a sterilized absorbent paper cone #30 was placed at the bottom of the periodontal sulcus or pocket. The cone was then kept there for 10 seconds before removal. After removal, the cones were evaluated by the examiner to check if there was no blood in the sample, once it could influence

the sample quality. The same was done with 3 more cones with a time interval of 3 minutes between each one of them, totalizing 4 paper cones per site. The paper cones of each participant were placed separately into tubes with 200 μ L of a phosphate-buffered saline solution (PBS) associated with a protease inhibitor and kept in a -80°C freezer. The tubes were vortexed for 1 minute and centrifuged for 10 minutes at 12,000Xg to elute components. Total protein and IL-1 β were assessed by Bradford test using DC Protein Assay[¶] and ELISA[#] respectively. Total protein and IL-1 β were assessed in 40 seconds of exposition.²²

Statistical analysis

All statistical analysis was performed using software GraphPad version 7.0, (La Jolla, CA, US). For the age pairing of ± 3 years confirmation, the Student t-test was performed between the groups.

Regarding the microbiological data, when comparing the biofilm and microorganisms' characteristics of AAS users with non-users in healthy and diseased sites Mann-Whitney test was used. For intragroup comparisons in health and non-health periodontal sites the Wilcoxon test was performed.

Quantitative immunologic data was compared by t-test and Wilcoxon or Mann-Whitney tests depending on the homogeneity of variances and distribution. The correlation between IL-1 β and total protein with microbiological parameters and characteristics of the AAS use were performed by using Pearson's Correlation Test. For all assessments, the statistical significance was set at $p < 5\%$. A previous *a posteriori* calculation of the power of the test for PD as primary outcome was performed.¹² Considering a significance level of 5%, 15 patients per groups represented a 96% power.

RESULTS

Thirty men were included in the final sample being 15 AAS users (AAS group) and 15 non-users (control group). The mean age of the participants was 29.1 ± 4.55 years being the youngest 23 years old and the oldest 40. Demographic, socioeconomic and periodontal clinical data of patients can be found in Table 1, as reported elsewhere.¹²

There were no significant statistical differences between the bacteria counting means of control and AAS users in diseased sites, although it was noticeable that *Tannerella forsythia* (red complex bacteria) in AAS users was 5x fold higher than in AAS non-users. When comparing healthy sites between groups, some health-compatible microorganisms were statistically diminished in the AAS group ($p < 0.05$) and the total percentage of health compatible microorganisms were statistically lower in AAS users when compared to the control group ($p < 0.05$). Although it was statistically not significant, diseased sites of AAS users showed higher percentages of bacteria from the disease-compatible complexes (55%) when compared to non-users (39%) (Figure 1).

Total protein concentration was similar between AAS and control groups in healthy and diseased sites. Diseased sites presented a non significant increase in protein concentration in both AAS ($\cong 50\%$) and control ($\cong 38\%$) groups ($p > 0.05$). IL-1 β expression in diseased sites was significantly higher than in healthy sites in the control group ($\cong 2.4x$; $p < 0.05$), but not in the AAS group (Figure 2).

Exploratory statistical analyses showed that there was a significant correlation between PD and both IL-1 β and total protein levels in the control group ($r = 0.62$ and 0.44 , respectively; $p < 0.05$), but not in the AAS group ($r = 0.04$ and

0.31, respectively; $p > 0.05$) (Figure 3). AAS cycles was not significantly correlated with IL-1 β or total protein levels ($r = 0.28$ and 0.18 , respectively; $p > 0.05$), but there was a statistically significant correlation with percentage of disease-compatible microorganisms ($r = 0.62$; $p < 0.05$). A significant correlation between the expression of IL-1 β and microorganisms compatible with disease was observed in AAS users ($r = 0.42$; $p < 0.05$) (Figure 4).

DISCUSSION

Previous studies have demonstrated that AAS abuse is associated with higher prevalence and severity of periodontal diseases.^{5,6} This study aimed to evaluate microbiological and immunological periodontal aspects of AAS users by assessing subgingival biofilm, IL-1 β and total protein levels.

Some authors reported higher percentages of sites with CAL ≥ 3 mm and also gingival enlargement in AAS users.^{5,6} In the present study, AAS users demonstrated higher number of sites with CAL > 0 mm ($p > 0.05$) and also higher percentages of sites with PD ≥ 4 mm ($p < 0,05$). No statistical difference in periodontitis prevalence between groups was observed, although high levels of testosterone have been associated with higher periodontitis prevalence in previous study⁸ (Table 1). To the best of our knowledge this is the first study to investigate microbiological and also immunological aspects of AAS users in order to complement and better understand clinical parameters previously observed in these men.^{5,12}

High levels of total protein and IL-1 β are commonly observed in patients with periodontal disease.^{23,24} Periodontitis is characterized by a high production of proinflammatory interleukin such as IL-6, tumoral necrosisfactor (TNF) and IL-

IL-1 β .^{23,24} In this study total protein levels increased similarly in diseased sites when compared to healthy sites in both groups. Although it was statistically not significant ($p > 0,05$) we believe this tendency could reach statistical significance with a larger number of participants per group. One of the most common ways of observing inflammation in periodontal tissues is through the expression of IL-1 β , a fundamental interleukin in the host response when inflammation is installed.²⁵ There are more than only one production pathway of the IL-1 β , although its production is more commonly observed through cells from the innate immune system such as monocytes and macrophages,²⁶ which are very important cells also in the periodontal tissue.

Differences in IL-1 β expression were statistically significant in the control group but not in the AAS group (Figure 2). Also, IL-1 β and total protein expressions were not statistically correlated with PD in AAS users (Figure 3). Hence, it is reasonable to think that AAS users might be more susceptible for immunologic changes in periodontium and that even in periodontal healthy sites, the higher IL-1 β expression might indicate a predisposition for periodontal disease development in this group of people. It is also important to notice that there was no correlation between IL-1 β or total protein levels and number of AAS cycles, meaning that these changes might occur after only one cycle (Figure 4).

Regarding microbiological aspects, because of our participants' age, cultural and sociodemographic aspects, advanced stages of periodontal disease were not expected in our sample. However, the lower percentages of microorganisms compatible with health in the AAS group in comparison to the control group in healthy sites ($p < 0,05$) could indicate a microbiological profile that is shifting towards a more compatible with disease profile. Besides, although

it was statistically not significant, a clear numeric tendency of higher percentages of the red and orange complexes in AAS users in both, healthy and diseased sites was observed when compared to the control group.

It was interesting to notice that in healthy sites, the control group showed bigger quantities of almost all the microorganisms that were analyzed. Although it was statistically significant only for a few microorganisms, it was a clear numerical tendency. Previous studies that investigated clinical parameters and also microbiological aspects found that AAS users are less healthy and have greater inflammatory indicators when compared to non-users.^{5,6,18} Although some might believe this was associated with a greater number of microorganisms in AAS users, our study, on the contrary, demonstrated no quantitative but qualitative significant differences in microbiological profile between the two groups in diseased sites (Figure 1).

Linking microbiological aspects with IL-1 β expression in this study, it is interesting to remember that microorganisms associate with more advanced phases of the periodontal disease (microbiological complexes compatible with disease) such as the ones from orange and red complexes are associated with higher activity of cells from the immune system, consequently resulting into a higher expression of IL-1 β .²⁷ *T. forsythia*, *P. gingivalis* and *T. denticolla* are highly pathogenic microorganisms from the red complex and are associated with higher inflammation and IL-1 β levels through stimulation of macrophages that are directly linked to higher production of the interleukin.^{11,27} The checkerboard DNA-DNA hybridization is a microbiological laboratory test that is able to precisely detect the presence of these microorganisms.¹⁰ Our results showed that in

diseased sites, all these three microorganisms were more present in AAS users samples when compared to the control group.

Some studies already demonstrated that the prolonged situations (physiologic or none physiologic) of high levels of sexual hormones (including T) might result in differentiation of the periodontal biofilm and in the host relationship with the periodontal disease.²⁸⁻³¹ In accordance with these studies, our results showed a statistically significant positive association between the number of cycles (use) of AAS and a higher percentage of microorganisms compatible with disease, meaning that long time users of AAS might be more susceptible to develop periodontal disease conditions (figure 4).

The recruitment of participants for this study was very difficult once it was hard to find admittedly AAS users because of these substances' use secretive nature. The diet of frequent physical activity practitioners is normally different from men in general being rich in protein and carbohydrates consumption and even supplementation focused in muscle growth.³² The diet of participants was not evaluated, which might be considered as a limitation of this study. In our understanding, further investigations should be conducted in order to better understand the effects of AAS abuse in the periodontal tissues.

CONCLUSIONS

AAS abuse can affect the periodontal profile of users in immunologic and microbiological levels. Even in healthy conditions, the periodontium of AAS users has a profile of IL-1 β compatible with diseased tissue. The microbiology of periodontal biofilm seems to be more pathogenic specially in AAS prolonged users.

FOOTNOTES

II. Hu-Friedy® Mfg. Co., IL, US.

¶. BioRad, Hercules, CA, US.

#. Quantikine HS ELISA kit IL-1 β /IL-1F2, R&D Systems, Houston, TX, US.

ACKNOWLEDGMENTS

One of the researchers of this group (SVSCW) was awarded with a grant by the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brasília, DF, Brazil). We would like to thank all of the support from the staff of the Department of Stomatology of the Federal University of Paraná and from the postgraduate programs in dentistry of the Guarulhos University (UNG) and the State of São Paulo University of Araraquara (UNESP- Araraquara). All authors state that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Bain J. Testosterone and the aging male: To treat or not to treat? *Maturitas* 2010; 66(1):16–22.
2. Park HJ, Ahn ST, Moon DG. Evolution of Guidelines for Testosterone Replacement Therapy. *J Clin Med* 2019; 8(3): 410. doi:10.3390/jcm8030410
3. Azad N, Pitalles S, Barres WE, Friedman N. Testosterone treatment enhances regional brain perfusion in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3064–8.
4. Pope Jr HG, Cohane GH, Kanayama G, Siegel AJ, Hudson JI. Testosterone gel supplementation for men with refractory depression: a randomized, placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 105–11.
5. Ozcelik O, Haytac MC, Seydaoglu G. The Effects of Anabolic Androgenic Steroid Abuse on Gingival Tissues. *J. Periodontol* 2006; 77: 1104-1109. doi:10.1902/jop.2006.050389
6. Brusca MI, Verdugo F, Amighini C. et al. Anabolic steroids affect human periodontal health and microbiota *Clin Oral Investig* 2014; 18:1579. doi:10.1007/s00784-013-1126-9

7. Rahnema CD, Lipshultz LI, Crosnoe LE, Kovac JR, Kim ED. Anabolic steroid–induced hypogonadism: diagnosis and treatment. *Fertility and Sterility* 2014; 101(5): 1271 – 1279.
8. Kanayama G, Kaufman MJ, Pope Jr HG. Public health impact of androgens. *Wolters Kluwer Health* 2018; 25(3): 218-223.
9. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 2005; 38:135–187.
10. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134–144.
11. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002; 28:12–55.
12. Warnavin SVSC, Chaves JDP, Valenga HM, Costa, TBC, Steffens JP. Periodontal clinical profile of men under androgenic anabolic steroids abuse. [Dissertation]. Curitiba, PR: Federal University of Paraná; 2018. 68 p.
13. Steffens JP, Wang X, Starr JR, Spolidorio LC, Van Dyke TE, Kantarci A. Associations Between Sex Hormone Levels and Periodontitis in Men: Results From NHANES III. *J Periodontol* 2015; 86(10):1116–1125.
14. Steffens JP, Coimbra LS, Ramalho-Lucas PD, Rossa C, Spolidorio LC. The Effect of Supra- and Subphysiologic Testosterone Levels on Ligature-

Induced Bone Loss in Rats — A Radiographic and Histologic Pilot Study. *J Periodontol* 2012; 83(11):1432–1439.

15. Steffens JP, Herrera BS, Coimbra LS, et al. Testosterone regulates bone response to inflammation. *Horm Metab Res*, 2014; 46:193-200.

16. Steffens JP, Coimbra LS, Rossa C Jr, Kantarci A, Van Dyke TE, Spolidorio LC. Androgen receptors and experimental bone loss - an in vivo and in vitro study. *Bone* 2015; 81:683–690. doi:10.1016/j.bone.2015.10.001

17. Korkia P, Stimson GV. Indications of Prevalence. Practice and Effects of Anabolic Steroid Use in Great Britain. *Int J Sports Med* 1997; 18(07): 557 – 562. doi: 10.1055/s-2007-972681

18. Soory M. Targets for Steroid Hormone Mediated Actions of Periodontal Pathogens, Cytokines and Therapeutic Agents Some Implications on Tissue Turnover in the Periodontium. *Current Drug Targets* 2000; 1:309. doi.10.2174/1389450003349119

19. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The Plaque Control Record, *J Periodontol* 1972; 43(1), 38-38.

20. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, et al., Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the

Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J ClinPeriodontol* 2018; 45(20):S68–S77.

21. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;17(4):788-92.

22. Duarte PM, de Mendonça AC, Máximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti FH. Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. *J Periodontol* 2009; 80:234-243.

23. Mogi M, Otagoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M, Kojima K. Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Arch Oral Biol*1999;44:535-539.

24. Rawlinson A, Dalati MH, Rahman S, Walsh TF, Fairclough AL. Interleukin-1 and IL-1 receptor antagonist in gingival crevicular fluid. *J ClinPeriodontol* 2000;27:738-743.

25. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 indisease. *Blood* 1996; 87(6):2095–147.

26. Castejon GL, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; (22): 189-195.

27. Shibata, K. Historical aspects of studies on roles of the inflammasome in the pathogenesis of periodontal diseases. *Mol Oral Microbiol* 2018; 33: 203– 211. <https://doi.org/10.1111/omi.12217>
28. Daltaban O, Saygun I, Bolu E. Periodontal Status in Men With Hypergonadotropic Hypogonadism: Effects of Testosterone Deficiency. *J Periodontol* 2006; 77: 1179-1183. doi:10.1902/jop.2006.050286
29. Soory M, Viridi H. The uptake of two androgen substrates by cultured human gingival fibroblasts in response to minocycline and metabolic studies using a cell-free system. *Arch Oral Biol* 1998;44(3):215-222. doi:10.1016/S0003-9969(98)00121-6
30. Cakmak O, Alkan BA, Ozsoy S, Sen A, Abdulrezzak U. Association of Gingival Crevicular Fluid Cortisol/Dehydroepiandrosterone Levels With Periodontal Status. *J Periodontol* 2014; 85: e287-e294. doi:10.1902/jop.2014.130787
31. Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K and Wang H. Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 671-681. doi:10.1034/j.1600-051X.2003.00055.x
32. Lenzi JL, Teixeira EL, de Jesus G, Schoenfeld BJ, de SallesPainelli V. Dietary strategies of modern bodybuilders during different phases of the competitive cycle. *J Strength Cond Res*. 2019; doi: 10.1519/JSC.0000000000003169 [Epub]

FIGURE LEGENDS

Figure 1: (A)Means of microorganisms count (x10⁵) of each microorganism in healthy and diseased sites of control and AAS participants; **(B)**Percentages of microorganisms of *Actinomyces*, purple, yellow, green, orange, red complexes and other microorganisms in healthy and diseased sites of individuals from the control and AAS groups. Boxplot with median, minimum and maximum of microorganisms total count in periodontal health and disease sites in Control and AAS groups **(C)**.

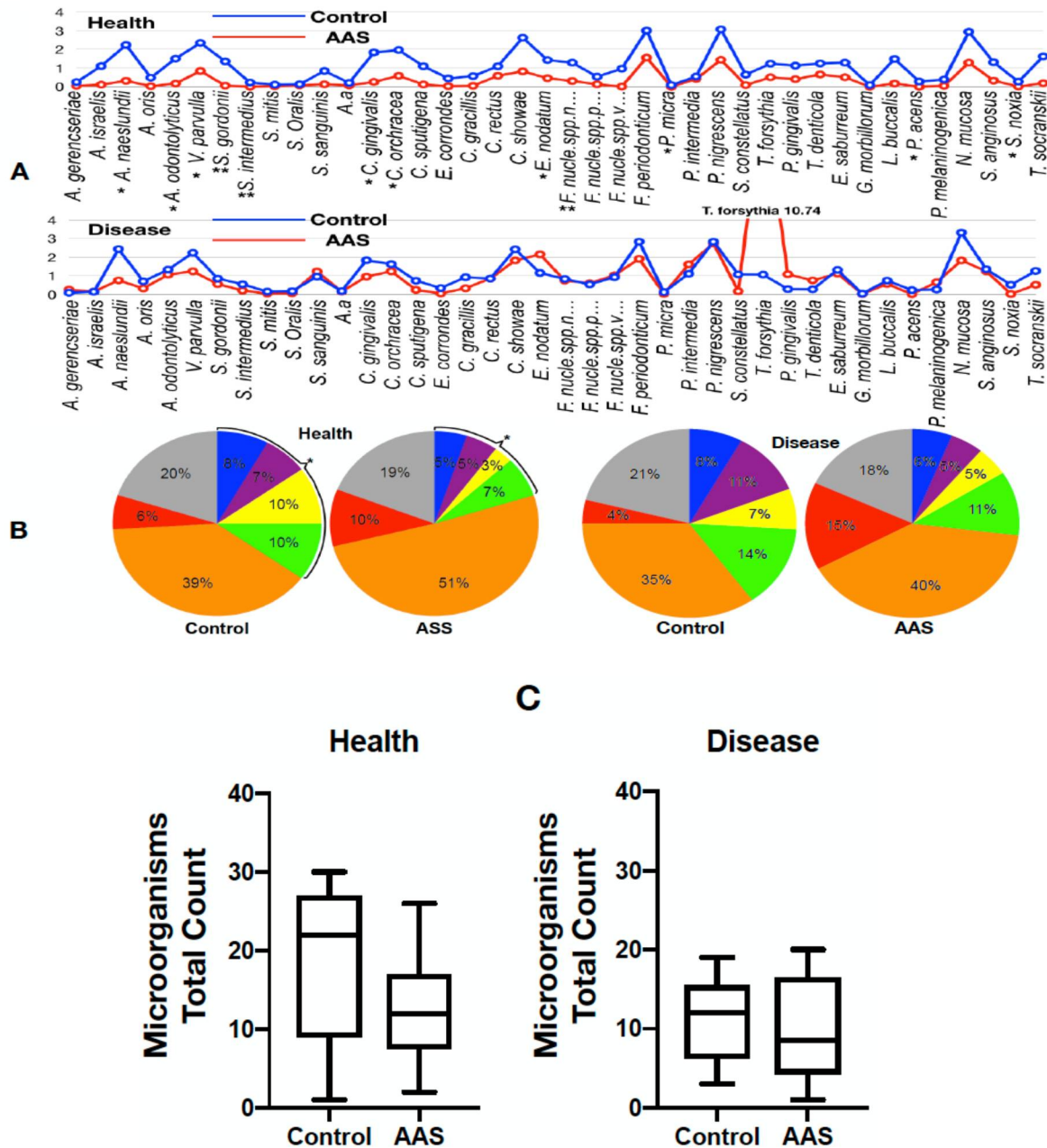


Figure 2: Concentration of total protein and IL-1 β in healthy and diseased sites in the control and AAS groups.

(* $p < 0.05$ between health and disease in control group)

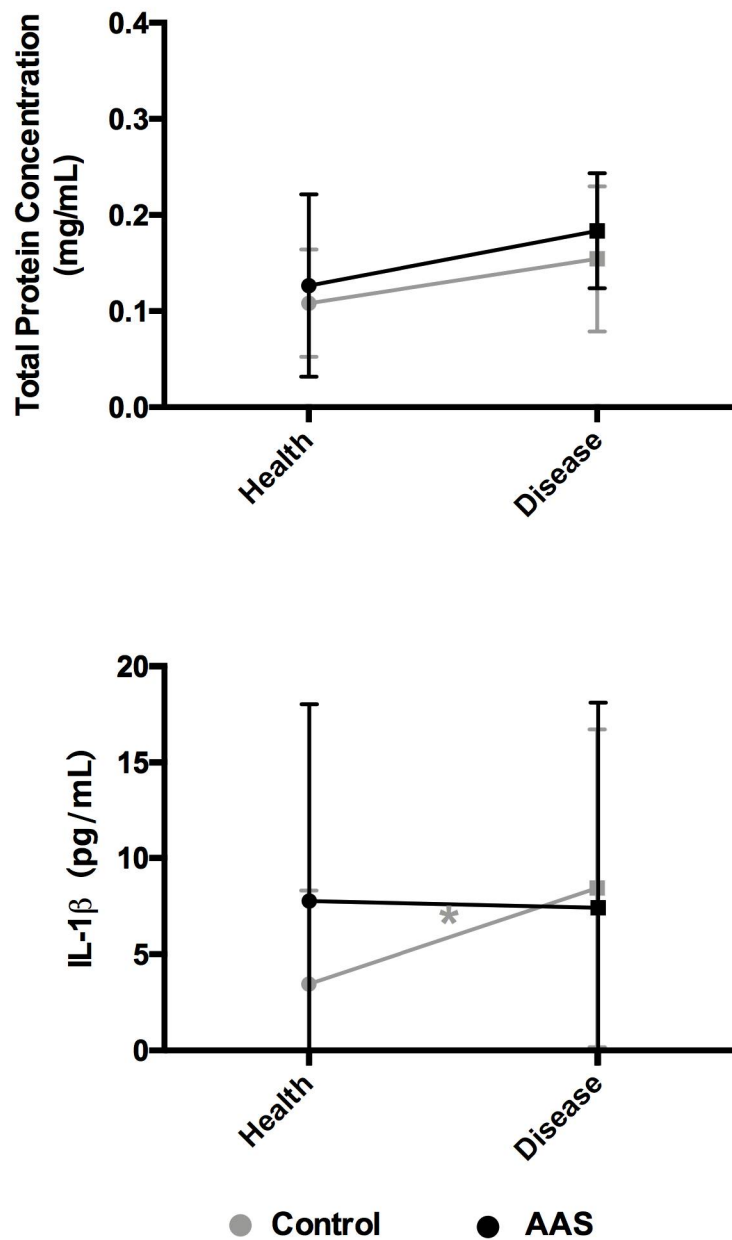


Figure 3: Correlation between PD (mm) and **(A)** IL-1 β or **(B)** total protein levels in the control and AAS groups.

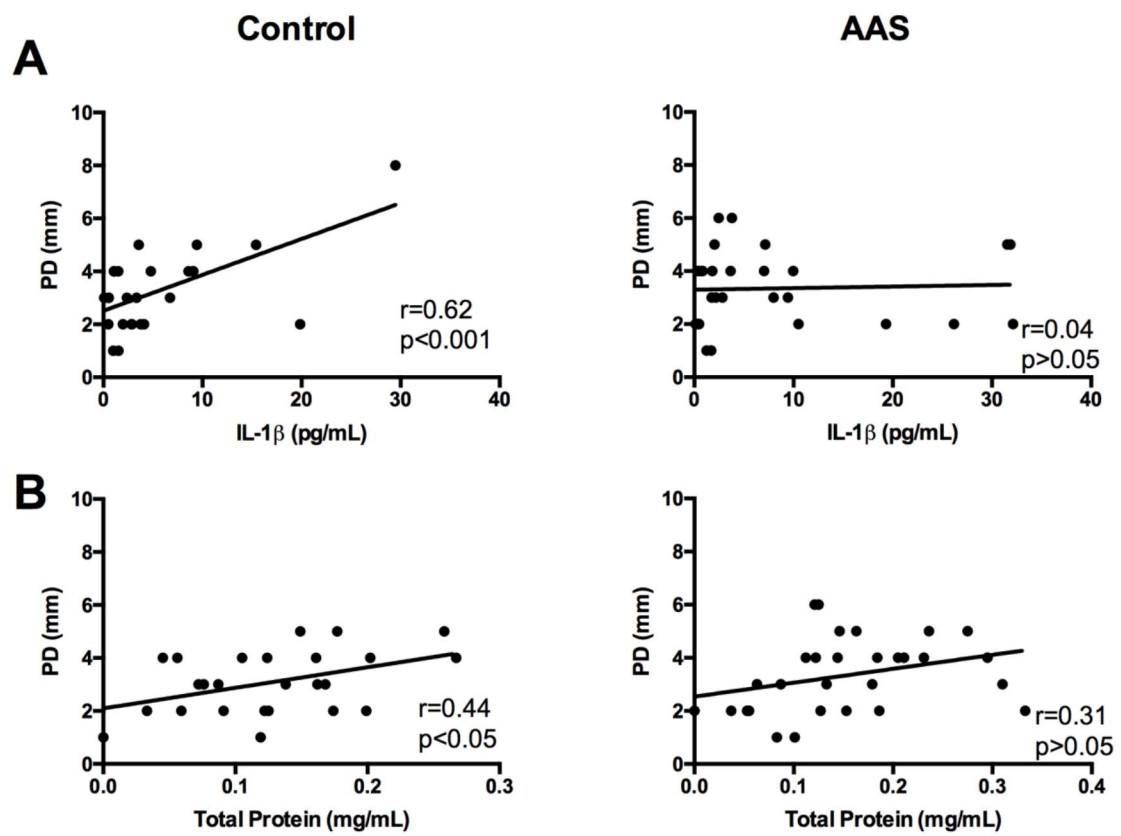


Figure 4: (A) Correlation between expression of IL-1 β and number of AAS cycles. (B) Correlation between microorganisms compatible with disease and number of AAS cycles in AAS users.

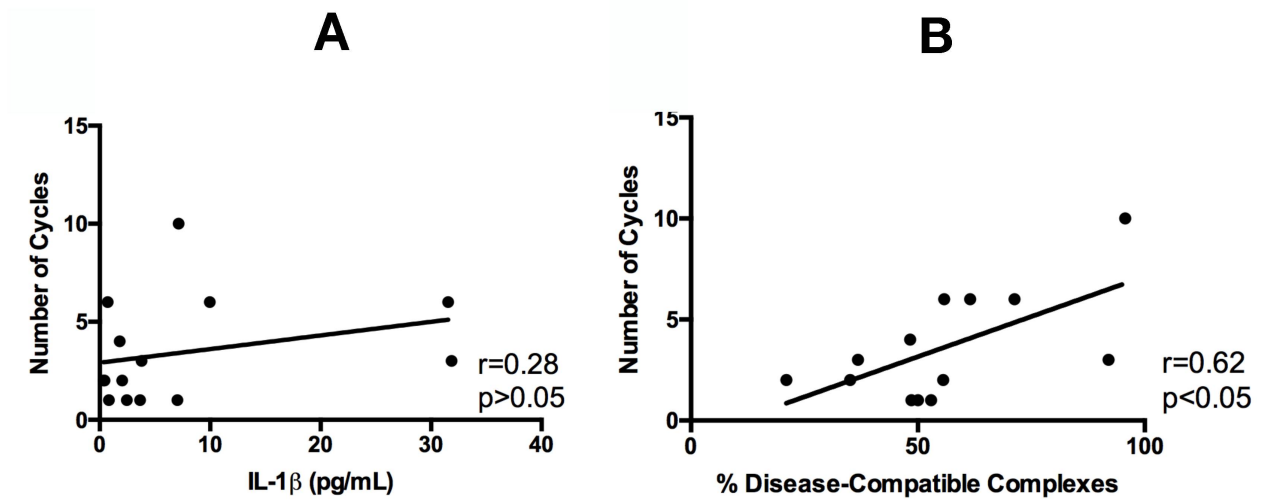


Table 1: Demographic, socioeconomic, periodontal clinical data of patients belonging to the case group (AAS) and control group (non-AAS). Adapted from Warnavin, 2018.

Variable	AAS	Control	p value	Test
Age (Years)	30.1±4.4	28.1±4.6	NS	t test
Ethnic Group (% , n)				
White	92.5 (n=14)	100 (n=15)	NS	Fisher
Non-White	7.5 (n=1)	0 (n=0)		
Income (Dolars)	1,071±923.2	1,087.5±333.7	NS	Mann Whitney
Educational Level (%)				
High School	60% (n=9)	73.3% (n=11)	NS	Fisher
College/University	40% (n=6)	26.6% (n=4)		
-Nandrolone (Deca Durabolin®), Schering-Plough, Brazil	40% (n=6)	-	N/A	N/A
-Testosterone Propionate (Durateston®), Schering-Plough, Brazil	40% (n=6)	-		
-Testosterone Cypionate (Deposteron®), EMS, Brazil	26.6% (n=4)	-		
-Methandrostenolone (Dianabol®), CIBA, Switzerland	20% (n=3)	-		
-Testosterone enanthate (Testovir on Depot®, Bayer Pharma, Germany)	13.3% (n=2)	-		
-Drostanolone Propionate (Masteron®), Syntex, Argentina	6.6% (n=1)	-		
-Boldenone Undecylenate (Boldenone®), USP Labs, USA	6.6% (n=1)	-		
-Trenbolone Acetate (Trembolona Acetato®), Landerlan, Paraguay	6.6% (n=1)	-		
-Anastrozole* (Anastrozol®), Eurofarma, Brazil	6.6% (n=1)	-		
Diagnosis (%)				
Healthy	0 (n=0)	6.7 (n=1)	NS	Fisher
Gingivitis	26.7 (n=4)	53.3 (n=8)	NS	Fisher
Periodontitis	73.3 (n=11)	40 (n=6)	NS	Fisher
BOP (%)	23.7±8.1	18.9±7.7	NS	t test
Plaque Index (%)	44.3±25.3	28.7±18.2	NS	t test
PD (mm)	2.6±0.3	2.3±0.1	0.004	t test
CAL (mm)	0.1±0.08	0.06±0.06	NS	Wilcoxon

NS: Not statistically significant; N/A: Not applicable; BOP: Bleeding on Probing;
PD: Probing Depth; CAL: Clinical Attachment Loss; *Not AAS

4 CONCLUSÃO

Concluimos que o abuso de EAA pode alterar significativamente o perfil microbiológico e imunológico de seus usuários possivelmente tornando-os mais susceptíveis ao desenvolvimento de doença periodontal. Mesmo em sítios clinicamente saudáveis, a microbiota de usuários de EAA se mostrou mais compatível com doença periodontal uma vez que a porcentagem de microorganismos de complexos compatíveis com doença se mostrou superior e diretamente relacionada com maiores concentrações de IL-1 β nesses pacientes. Dentre usuários de EAA, o biofilme parece ter um aspecto patogênico ainda maior naqueles que fazem o uso de maneira prolongada.

REFERÊNCIAS

- Ajayi AA, Mathur R, Halushka PV. Testosterone increases human platelet thromboxane A2 receptor density and aggregation responses. **Circulation**. 1995;91(11):2742-2747.
- Antonio L, Caerels S, Jardi F, Delaunay E, Vanderschueren D. Testosterone replacement in congenital hypogonadotropic hypogonadism maintains bone density but has only limited osteoanabolic effects. **Andrology**. 2019; 7: 302-306.
- Azad N, Pitales S, Barres WE, Friedman N. Testosterone treatment enhances regional brain perfusion in hypogonadal men. **J Clin Endocrinol Metab**. 2003; 88: 3064–8.
- Badimon L, Padró T, Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. **European Heart Journal Acute Cardiovascular Care**. 2012;1(1):60-74.
- Bain J. Testosterone and the aging male: To treat or not to treat? **Maturitas**. 2010; 66(1):16–22.
- Brusca MI, Verdugo F, Amighini C. et al. Anabolic steroids affect human periodontal health and microbiota **Clin Oral Investig**. 2014; 18:1579.
- Canale D, Vignali E, Golia F, Martino E, Pinchera A, Marcocci C. Effects of hormonal replacement treatment on bone mineral density and metabolism in hypogonadal patients. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2000;(30): 47-51.
- Castejon GL, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion **Cytokine Growth Factor Rev**. 2011; (22): 189-195.
- Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, et al., Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J Clin Periodontol**. 2018; 45 (20):S68–S77.
- Dinareello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**. 1996; 87(6):2095–147.
- Duarte P.M., de Mendonça A.C., Máximo M.B., Santos V.R., Bastos M.F., Nociti F.H. (2009). Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. **J Periodontol**. 2009;80, 234-243. doi:10.1902/jop.2009.070672
- Engeland CG, Sabzehei B, Marucha PT. Sex hormones and mucosal wound healing. **Brain Behav Immun**. 2008; 23(5):629635.

Foss GL, Simpson SL. Oral methyltestosterone and jaundice. **Br Med J.** 1959; 1(5117): 259–263.

Kasaca SC, Soory M. The synthesis of 5α -dihydrotestosterone from androgens by human gingival tissue and fibroblasts in culture in response to TGIF- β and PDGF. **Journal of Periodontal Research.** 1996; 31:213-322. doi: 10.1111/j.1600-1765.1996.tb00498.x

Kanayama G, Kaufman MJ, Pope Jr HG. Public health impact of androgens. **Wolters Kluwer Health.** 2018; 25(3): 218-223.

Korkia P, Stimson GV. Indications of Prevalence. Practice and Effects of Anabolic Steroid Use in Great Britain. **Int J Sports Med.** 1997; 18(07): 557-562.

Laitinen E, Hero M, Vaaralahti K, Tommiska J, Raivio T. Bone mineral density, body composition and bone turnover in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. **International Journal of Andrology.** 2012; 35: 534-540.

Lattimore J-DL, Celermajer DS, Wilcox I. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. **Journal of the American College of Cardiology.** 2003;41(9):1429-1437

Loo SY, Azoulay L, Nie R, et al., Cardiovascular and cerebro vascular safety of testosterone replacement therapy among aging men with low testosterone levels: a cohort study. **The American Journal of Medicine.** 2019; doi: 10.1016/j.amjmed.2019.03.022

McClintock TR, Valovska MTI, Kwon NK et al. Testosterone replacement therapy is associated with an increased risk of urolithiasis. **World J Urol.** 2019; doi:10.1007/s00345-019-02726-6

Michael H, Harkonen PL, Vaananen HK, Hentunen TA. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. **J Bone Miner Res.** 2005; 20:2224–2.

Miwa, ACP, Falco PB, Calijuri MC. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Eng. Sanit. Ambient.** 2008; (13):2: 236-242. doi:10.1590/S1413-41522008000200014

Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M, Kojima K. Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. **Arch Oral Biol.** 199;. 44, 535-539.

Mulhall JP, Trost LW, Brannigan RE, Kurtz EG, Redmon JB, Chiles KA, Lightner DJ, Miner MM, Murad MH, Nelson CJ, Platz EA, Ramanathan LV, Lewis RW, Evaluation and Management of Testosterone Deficiency: AUA Guideline, **The Journal of Urology.** 2018; doi:10.1016/ j.juro.2018.03.115

Nelson D, Peterson E, Tilley B, Otallon W, Chao E, Riggs B, Kleerekoper M. Measurement of vertebral area on spine X-rays in osteoporosis: Reliability of digitizing techniques. **J Bone Miner Res**. 1990; (5):707-716.

Ozcelik, O, Haytac MC, and Seydaoglu G. The Effects of Anabolic Androgenic Steroid Abuse on Gingival Tissues. **J. Periodontol**. 2006; 77: 1104-1109.

Park HJ, Ahn ST, Moon DG. Evolution of Guidelines for Testosterone Replacement Therapy. **J Clin Med**. 2019; 8(3): 410.

Parker M, Tabona P, Newman H, Olsen I. IL-6 expression by oral fibroblasts is regulated by androgen. **Cytokine**. 1998; 10(8): 613-619.

Pope Jr HG, Cohane GH, Kanayama G, Siegel AJ, Hudson JI. Testosterone gel supplementation for men with refractory depression: a randomized, placebo-controlled trial. **Am J Psychiatry**. 2003; 160: 105–11.

Rahnema CD, Crosnoe LE, Kim ED. Designer steroids – over-the-counter supplements and their androgenic component: review of an increasing problem. **Andrology**. 2015; 3:10-155. Doi: 10.1111/andr.307

Rahnema CD, Lipshultz LI, Crosnoe LE, Kovac JR, Kim ED. Anabolic steroid–induced hypogonadism: diagnosis and treatment. **Fertility and Sterility**. 2014; 101(5), 1271 – 1279.

Rawlinson A, Dalati MH, Rahman S, Walsh TF, Fairclough AL. Interleukin-1 and IL-1 receptor antagonist in gingival crevicular fluid. **J ClinPeriodontol**. 2000; 27, 738-743.

Sagoe D, McVeigh J, Bjørnebekk A, Essilfie MS, Andreassen CS, Pallesen S. Polypharmacy among anabolic-androgenic steroid users: a descriptive metasyntesis. **Subst Abuse Treat Prev Policy**. 2015; 10:12

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**. 1994;17(4):788-92.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol 2000**. 2002;28:12-55.

Steffens JP, Coimbra LS, Ramalho-Lucas PD, Rossa C, Spolidorio LC. The Effect of Supra- and Subphysiologic Testosterone Levels on Ligature-Induced Bone Loss in Rats — A Radiographic and Histologic Pilot Study. **J Periodontol**. 2012; 83(11):1432–1439.

Steffens JP, Coimbra LS, Rossa C, Jr., Kantarci A, Van Dyke TE, Spolidorio LC. Androgen receptors and experimental bone loss - an in vivo and *in vitro* study. **Bone**. 2015; 81:683-690.

Steffens JP, Herrera BS, Coimbra LS, et al. Testosterone regulates bone response to inflammation. **HormMetab Res.** 2014; 46:193-200.

Steffens JP, Wang X, Starr JR, Spolidorio LC, Van Dyke TE, Kantarci A. Associations Between Sex Hormone Levels and Periodontitis in Men: Results From NHANES III. **J Periodontol.** 2015; 86(10):1116–1125.

Soory M, Viridi H. The uptake of two androgen substrates by cultured human gingival fibroblasts in response to minocycline and metabolic studies using a cell-free system. **Archives of Oral Biology.** 1998; 44(3): 215-222.

Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, et al. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. **J Periodontal Res.** 2009; 45, 148-152. doi: 10.1111/j.1600 0765.2009.01204.x

Vigen R, ODonnell CI, Barón AE, et al. Association of Testosterone Therapy With Mortality, Myocardial Infarction, and Stroke in Men With Low Testosterone Levels. **JAMA.** 2013; 310(17):1829–1836.

Warnavin SVSC, Chaves JDP, Valenga HM, Costa, TBC, Steffens JP. Perfil clínico periodontal de homens usuários de esteroides anabolizantes androgênicos. **Dissertação.** Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2018. 68 p.

APÊNDICE 1 – METODOLOGIA DETALHADA

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O projeto de pesquisa desse estudo foi apresentado inicialmente para o Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (CEP/SD – UFPR) onde foi negado. Após, o projeto foi submetido a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa –CONEP sob o número de protocolo 1.906.729 - 2.443.657 onde foi aprovado.

RECRUTAMENTO DE PARTICIPANTES

O recrutamento de participantes ocorreu especialmente de maneira direta (pessoalmente com os possíveis participantes) em academias, ginásios, campeonatos e outros eventos de fisiculturismo ou afins. Inicialmente foram utilizados panfletos impressos que eram distribuídos em universidades, academias e espaços públicos em que possíveis participantes pudessem frequentar. Devido à dificuldade encontrada pelos pesquisadores em encontrar participantes para a pesquisa, entrevistas e chamadas em estações de rádio e canais locais de televisão foram realizadas. No momento do convite ou no momento da primeira consulta, já na clínica do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), os potenciais participantes eram esclarecidos quanto aos benefícios e possíveis riscos eminentes da participação na pesquisa, bem como os tempos da metodologia proposta. Caso aceitassem participar, deveriam assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Puderam participar da pesquisa homens com no mínimo 18 anos de idade, praticantes regulares de atividades físicas (especialmente musculação) pelo menos 3 vezes na semana, há pelo menos 3 meses e que fossem assumidamente usuários de EAA. Para compor o grupo controle, foram convidados homens com os mesmos hábitos de prática de exercícios físicos que os do grupo caso, mas não fossem nem nunca tivessem sido usuários de EAA. Nenhum dos participantes de nenhum dos grupos era tabagista. Nenhum deles sofria de qualquer condição sistêmica que fosse capaz de gerar alterações em

seus níveis hormonais ou afetar diretamente sua capacidade imunológica. Para participar da pesquisa os participantes não poderiam ter recebido nenhuma forma de tratamento periodontal nos últimos 6 meses e nem ter ingerido qualquer forma de medicamento antibiótico ou anti-inflamatório nesse mesmo período. Por último, deveriam ter ao menos 20 dentes em boca, excluindo-se terceiros molares. Os grupos foram compostos cada um por 15 participantes que foram pareados por idade (± 3 anos de idade).

EXAME CLÍNICO

Anteriormente ao exame clínico, uma ficha de anamnese (a mesma utilizada na disciplina de Periodontia II do Curso de Graduação em Odontologia da UFPR) era preenchida em conjunto com o participante. Informações gerais de saúde, histórico médico e odontológico eram anotados e, no caso de pacientes usuários de EAA, informações sobre a droga (nome, tempo de uso, dosagem e posologia) eram requisitadas ao participante.

Todos os exames clínicos e coletas de amostras foram realizados por um mesmo examinador previamente treinado e calibrado (SVSCW Kappa ± 1 mm = 0,97). Foram avaliados: índice de placa (O'LEARY, 1972), sangramento marginal em quatro sítios por dente, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e nível clínico de inserção em seis sítios por dente. O diagnóstico periodontal dos participantes foi baseado nos critérios adotados pela classificação de condições e doenças periodontais de 2018 da Academia Americana de Periodontia e Federação Europeia de Periodontia. Para o exame clínico foram utilizados roletes de algodão, gazes esterilizadas, espelho clínico, sonda exploradora n°5, pinça clínica e uma sonda periodontal Hu-Friedy®.

Após o fim do exame, todos os participantes receberam instruções de higiene e uma profilaxia. Quando eram constatadas necessidades de tratamento odontológico, os participantes eram encaminhados ao serviço de triagem do curso de Odontologia da UFPR.

COLETA E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO BIOFILME

Após o exame clínico, foram realizadas as coletas de biofilme subgengival e fluido crevicular. Para a coleta de ambos era escolhido o sítio que, ao exame clínico, aparentasse o quadro de doença (inflamação) mais claro (maior profundidade de sondagem e valor de nível clínico de inserção) para retratar o quadro de doença periodontal de cada participante. O mesmo sítio do dente contralateral a esse (ou o mais próximo possível dele) que apresentasse saúde periodontal era escolhido para retratar o quadro de saúde. Eram considerados doentes aqueles sítios que apresentassem profundidade de sondagem superior a 3 milímetros, sangramento à sondagem e nível clínico de inserção (NCI) superior a zero.

Escolhidos os pontos para coleta, as regiões eram isoladas com roletes de algodão e os dentes e gengiva secos com ar. Após removido o biofilme supra gengival da região, uma cureta periodontal Gracey 5-6 (Hu-Friedy®) era inserida até o fundo de sulco ou bolsa periodontal e, com um único movimento da parte ativa da cureta contra o dente para fora do tecido, o biofilme subgengival era removido da região subgengival do sítio.

Imediatamente após a coleta, a ponta ativa da cureta era mergulhada em um Eppendorf previamente preparado contendo 150 μ L de uma solução tampão e 100 μ L de uma solução a 0,5M de hidróxido de sódio (NaOH) eram adicionados. Os Eppendorf eram então imediatamente levados a um freezer -80°C aonde foram armazenados até o momento da análise.

ANÁLISE DO BIOFILME POR *CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION*

A técnica utilizada para realização de teste de *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi por meio da bioluminescência avaliada em um filme radiográfico específico para esse fim. Para tal, foi utilizada uma membrana (filtro) de nylon carregada por cargas positivas. Após devidamente descongeladas, as amostras passaram por um banho em água aquecida de 10 minutos. Em cada amostra e também em duas sondas que serviram como controle para a bioluminescência foi adicionado 800 μ L de acetato de amônia para neutralização do pH. As

amostras foram então pipetadas e depositadas individualmente em cada uma das canaletas do Minislot utilizado. Realizada essa etapa com todas as amostras, o Minislot foi mantido em uma estufa por 20 minutos para a fixação do DNA.

Para a hibridização das sondas de micro-organismos nas amostras, a membrana foi girada em 90° em relação a sua posição no Minislot e então fixada em um Minibloter. Dessa forma, com o giro da membrana, as canaletas do Minibloter (por onde passam a sonda de micro-organismos pré-hibridizados) garantem que cada sonda de cada micro-organismo entre em contato com todas as amostras em um ponto específico para futura leitura e interpretação por bioluminescência. Após colocadas as sondas na membrana, foi armazenada em uma estufa durante o período de uma noite.

Por fim, a membrana passou por processos de lavagem com líquidos adstringentes, bloqueadores de atividade de DNA e por solução de anticorpos. A membrana foi então preparada para ser radiografada, revelada e interpretada. Nesse método é avaliada a presença ou ausência bem como a intensidade de detecção de micro-organismos que englobam todos os complexos bacterianos periodontais. São eles: *A. gerencseriae*, *A. israelis*, *A. naeslundii*, *A. oris* (complexo de actinomicetos); *A. odontolyticus*, *V. parvulla* (complexo roxo); *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. Oralis*, *S. sanguinis* (complexo amarelo); *A.a*, *C. gingivalis*, *C. orchracea*, *C. sputigena*, *E. corrondes* (complexo verde); *C. gracillis*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *F. nucleatum.spp.nucleatum*, *F. nucleatum.spp.polymorphum*, *F. nucleatum.spp.vincentii*, *F. periodonticum*, *P. micra*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *S. constellatus* (complexo laranja); *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* (complexo vermelho); *E. saburreum*, *G. morbillorum*, *L. buccalis*, *P. acens*, *P. melaninogenica*, *N. mucosa*, *S. anginosus*, *S. noxia* e *T. socranskii* (outros) (SOCRANSKY et al., 1994 e SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).

COLETA DO FLUIDO CREVICULAR

Os sítios periodontais escolhidos para a coleta de fluido crevicular foram os mesmos utilizados para coleta do biofilme. A coleta foi realizada com a utilização de cones de papel absorvente #30 esterilizados. Os cones eram introduzidos até o fundo de sulco ou bolsa periodontal onde permaneciam por 10 segundos. Quando removidos, os cones de papel eram visualmente avaliados para observar se não havia ocorrido também a absorção de sangue (especialmente nos sítios doentes). Caso o cone apresentasse coloração avermelhada, era imediatamente descartado e uma nova coleta era realizada. Foram utilizados 4 cones de papel por sítio, sendo que cada um deles permanecia em posição por 10 segundo e, após removido um cone, um novo só era introduzido novamente no sulco ou bolsa 3 minutos depois, para normalização do fluxo do fluido crevicular na região (DUARTE et al., 2009). Imediatamente após a coleta os cones tinham suas pontas mergulhadas e mantidas em um Eppendorf contendo 200 μ L de uma solução tampão e NaOH. As amostras também foram armazenadas em um freezer -80°C até futura análise.

ANÁLISE DO FLUIDO CREVICULAR – EXPRESSÃO DE PROTEÍNA TOTAL E DE IL-1 β

Antes de serem realizadas as análises para proteína total e expressão de IL-1 β , as amostras foram descongeladas e misturadas com 200 μ L de uma solução inibidora de protease diluída 10X em água destilada. As amostras foram novamente congeladas até o momento de serem avaliadas. No momento da análise, após descongeladas as amostras passaram então por um processo de centrifugação com rotação e temperatura controlados. Para homogeneização das amostras cada uma delas passou por período de agitação de um minuto em um Vortex.

As amostras de fluido crevicular foram avaliadas quanto a proteína total pelo teste de Bradford (BRADFORD, 1976) e quanto a expressão de IL-1 β com um teste ELISA de alta sensibilidade.

No teste de Bradford a leitura das amostras acontece por meio da emissão de uma luz com comprimento de onda de 595nm emitido por um espectrofotometro. Nesse estudo a proteína total foi avaliada por meio do Kit DC ProteinAssay (BioRad, Hercules, CA, US). Foram preparadas soluções com valores de concentrações conhecidos para servir como uma curva padrão de comparação para os valores obtidos na leitura das amostras. Após realizada a escala, as amostras foram devidamente diluídas, coradas e organizadas em uma placa com 96 poços transparentes específicos para leitura por fotometria de amostras. Os dados obtidos foram organizados em uma planilha.

Para a realização do teste ELISA de alta sensibilidade as amostras de fluido crevicular foram diluídas em 40 vezes de acordo com as recomendações do fabricante do kit (Quantikine HS ELISA kit IL-1 β /IL-1F2, R&D Systems, Houston, TX, US). Para tal diluição, 10 μ L da amostra foi diluída em 390 μ L de um calibrador de diluente fornecido pelo kit. Todos os reagentes, substratos e soluções para lavagem dos poços foram adicionados às amostras conforme os tempos e instruções preconizadas pelo fabricante. Foi realizada uma escala de diluentes com concentrações decrescentes de um reagente padrão gerando soluções com densidades ópticas já conhecidas que serviram como parâmetros de comparação para a leitura das amostras (curva padrão).

Para a leitura e determinação da densidade óptica das amostras foi utilizado o mesmo espectrofotometro utilizado no teste de Bradford, mas dessa vez a luz emitida tinha comprimento de onda calibrada em 450nm. Duas leituras foram efetuadas e os resultados utilizados foram a média das duas leituras tanto da escala padrão como das amostras propriamente ditas.

ANEXO 1 – PARECER DA APROVAÇÃO DA EMENDA DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA – CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Perfil clínico, microbiológico e imunológico da condição periodontal de homens com hipogonadismo

Pesquisador: Joao Paulo Steffens

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 5

CAAE: 59617016.8.0000.0102

Instituição Proponente: Departamento de Estomatologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.443.657

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

Os hormônios sexuais masculinos (andrógenos) incluem a androstenediona (ASD), androstenediol (ADIOL), testosterona (T) e a dihidrotestosterona (DHT). A T é o principal andrôgeno e está envolvida no desenvolvimento e manutenção da massa muscular; no estímulo à eritropoiese; no aumento da perfusão cerebral, influenciando no humor e cognição; e na saúde óssea através da inibição da ação de osteoclastos e reabsorção óssea e estímulo à atividade osteoblástica e crescimento ósseo. 1 Noventa e cinco por cento da T circulante é produzida pelos testículos, enquanto os 5% restantes são sintetizados localmente nos tecidos-alvo a partir da ASD e ADIOL. Estas duas são sintetizadas a partir da dihidroepiandrosterona (DHEA) ou DHEA-sulfato (DHEAS), as quais são secretadas pelo córtex adrenal. 2 A ação da T no local onde exercerá seu efeito biológico pode se dar diretamente através da ligação a receptores de andrôgenos, ou indiretamente através de sua conversão a DHT ou estradiol (E2). A DHT é formada a partir da enzima 5- α -redutase, é metabolicamente mais ativa que a T e é produzida no fígado, rins, pele e próstata. As enzimas hidroxisteroide-desidrogenase podem converter a DHT reversivelmente aos metabólitos androstano 3,17-diol ou androsterona (ADT). Por outro lado, o E2 é produzido em macrófagos e fibroblastos no fígado, rins, cérebro e tecido adiposo, e acredita-se que é o maior regulador da homeostase óssea no homem. Pode atuar através de receptores de estrôgeno (ER) e ou GPR-30, todos expressos em tecido ósseo. Apesar disto, apenas o ER - parece estar envolvido

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.443.657

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Recurso do Parecer	recurso.pdf	02/12/2017 18:30:17		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_Ponto_a_Ponto.docx	02/12/2017 18:28:18	Joao Paulo Steffens	Aceito
Recurso do Parecer	recurso.pdf	27/11/2017 16:36:09		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_4.docx	27/11/2017 16:33:42	Joao Paulo Steffens	Aceito
Brochura Pesquisa	Cep_Adequado.docx	27/11/2017 16:33:31	Joao Paulo Steffens	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1012615_E1.pdf	31/10/2017 09:48:26		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	31/10/2017 09:45:30	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Emenda.docx	30/10/2017 21:01:03	Joao Paulo Steffens	Aceito
Recurso do Parecer	recurso.pdf	19/12/2016 17:08:31		Aceito
Recurso do Parecer	recurso.pdf	05/10/2016 16:06:31		Aceito
Outros	Termo_Guarda_Material_Biologico.pdf	05/09/2016 18:12:26	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Termo_de_confidencialidade.pdf	05/09/2016 18:12:05	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_inicio_pesquisa.pdf	05/09/2016 18:11:39	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Encaminhamento.pdf	05/09/2016 18:10:48	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Declaracao_uso_especifico_material.pdf	05/09/2016 18:10:16	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Declaracao_tornar_publico_resultados.pdf	05/09/2016 18:09:50	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Declaracao_responsabilidade.pdf	05/09/2016 18:09:27	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Declaracao_Coparticipante_HC.pdf	05/09/2016 18:08:37	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Declaracao_Coparticipante_SEMPR.pdf	05/09/2016 18:08:02	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Concordancia_Servico_Laboratorio.pdf	05/09/2016 18:07:35	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Concordancia_Servico_Departamento.pdf	05/09/2016 18:07:03	Joao Paulo Steffens	Aceito

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.443.657

Outros	Concordancia_Servico_Clinica_Odonto.pdf	05/09/2016 18:06:16	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Analise_de_Merito.pdf	05/09/2016 18:05:34	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Check_list.pdf	02/09/2016 12:59:42	Joao Paulo Steffens	Aceito
Outros	Extrato_de_ata.pdf	02/09/2016 12:32:07	Joao Paulo Steffens	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

BRASILIA, 17 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

ANEXO 2 – NORMAS DA REVISTA *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 generalized 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.

For tips on Search Engine Optimization (SEO) and article discovery, please see our [SEO guide](#).

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, Houry 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: <https://www.cdc.gov/oralhealth/conditions/periodontal-disease.html>.

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

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

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

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

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

PRODUCT IDENTIFICATION

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

REVISED MANUSCRIPTS

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

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

REVIEW PROCESS

Peer Review

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

MANUSCRIPT ACCEPTANCE

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

Copyright Transfer Agreement (CTA)

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

OnlineOpen

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

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

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

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

Reprints

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

Funding Agency Requirements

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