

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO
E ETANOL: PERDA ÓSSEA ALVEOLAR E
RESPOSTA IMUNE EM RATOS COM PERIODONTITE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cibele Bruno Campagnolo

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO E
ETANOL: PERDA ÓSSEA ALVEOLAR E RESPOSTA IMUNE
EM RATOS COM PERIODONTITE**

Cibele Bruno Campagnolo

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração em Odontologia, ênfase em Periodontia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Karla Zanini Kantorski

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bruno Campagnolo, Cibebe

Terapia fotodinâmica com azul de metileno e etanol: perda óssea alveolar e resposta imune em ratos com periodontite / Cibebe Bruno Campagnolo.-2015.

85 p.; 30cm

Orientadora: Karla Zanini Kantorski

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, RS, 2015

1. terapia fotodinâmica antimicrobiana 2. azul de metileno e etanol 3. periodontite 4. perda óssea alveolar 5. resposta imune I. Zanini Kantorski, Karla II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO E ETANOL:
PERDA ÓSSEA ALVEOLAR E RESPOSTA IMUNE EM RATOS COM
PERIODONTITE**

elaborada por
Cibele Bruno Campagnolo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Odontológicas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Karla Zanini Kantorski, Prof^a Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Raquel Antoniazzi, Prof^a Dr^a (UNIFRA)

Glauca Kommers, Prof^a Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 26 de agosto de 2015.

AGRADECIMENTOS

É humanamente impossível viver e trilhar um caminho sozinho, sem qualquer ajuda ou contribuição. Por isso, é necessário agradecer.

Em primeiro lugar, ao meu grande amigo, aquele a quem sempre procuro, e sempre me atende, DEUS, obrigada por me acompanhar sempre, iluminando meu caminho, e me abençoando com a vida maravilhosa que tenho. Em inúmeros momentos, só tu me confortaste.

À minha amada família, meus pais, ELIO e VILMA, duas jóias raras que com sua humildade e bondade souberam me dar aquilo que há de mais valioso nesta vida: a EDUCAÇÃO, em todos os sentidos. Pai, mãe, agradeço todos os dias a DEUS por ter o privilégio de ser filha de vocês. Vocês merecem todas as bênçãos pelos exemplos de força e perseverança que são. Amo vocês!

Minha irmã Lidiane, mulher guerreira, de fibra, não canso de repetir que tu “és 3 em 1”: minha irmã, amiga e mãe. Só cheguei onde estou hoje por ter convivido contigo, tendo este grande exemplo em minha vida. Se um dia eu for metade do que tu és, já estarei satisfeita. Muito obrigada por tudo.

Da mesma forma, meu irmão Elvio, cunhada Daniela, cunhado Ivan, obrigada pelas palavras de incentivo, vocês também são meus grandes exemplos de pessoas trabalhadoras, que lutam dia após dia para terem uma vida digna, após muitos anos de estudo.

À minha orientadora, Karla, impossível não se emocionar ao te agradecer. Obrigada por me oportunizar a possibilidade de fazer Mestrado, por depositar em mim a confiança necessária para conduzir este e outros trabalhos. Serei eternamente grata por esses dois anos de aprendizado ao teu lado, és uma excelente profissional, tenho uma grande admiração por ti. Espero ter cumprido com meu papel, e alcançado as expectativas. Desejo muita saúde e alegrias a ti em tua função, a qual cumpre com tanto entusiasmo. Muito obrigada!

Às colegas de Mestrado, assim como a “Equipe dos ratos”: Fernanda, Luisa, Marcela, Maritiele, Pati, Silvana. Obrigada por toda ajuda, apoio moral, horas discutindo metodologias, horas dentro de laboratórios, horas de muito trabalho, estudo, dedicação. Mas também, obrigada pelos momentos de descontração, afinal, estes são necessários e imprescindíveis nos intervalos. Vocês não são apenas colegas; considero-as minhas AMIGAS, e eu desejo que todas trilhem caminhos de muito sucesso. Sentirei saudade!

Às demais colegas que tive a felicidade de conhecer e conviver, mesmo que por pouco tempo, pois a correria do dia-a-dia às vezes impede uma maior aproximação: Emília, Leca, Joci, Tici, Danilo, Maisa e Miche. Gosto muito de todo(a)s vocês, obrigada por muitas das ajudas atendidas, vocês são excelentes pessoas e profissionais, e merecem todo sucesso que desejarem!

Ao professor Luis Felipe Valandro, por não medir esforços na ajuda para colocarmos em prática nosso projeto. Sem o seu empenho, nada teria acontecido. A coordenação da Pós-Graduação em Ciências Odontológicas está em ótimas mãos. Tenho uma admiração imensa pelo senhor e sua esposa. Obrigada!

À professora Cristiane Danesi, que junto de minha orientadora, e do Roberto Marinho, profissionais extremamente dedicados e competentes, colocaram um sonho em prática. Através de seu trabalho, não mediram esforços para criar, executar e colher os frutos derivados deste grande projeto. Esta equipe merece todos os aplausos, e que estes frutos se multipliquem cada dia mais. Obrigada por me permitir fazer parte deste grupo!

Aos “anjos” que surgiram ao longo desta caminhada, me “salvando” ao estenderem sua mão me ajudando no experimento: Sérgio Oliveira, da histologia, o que seria de mim sem teus ensinamentos, teu conhecimento técnico, e, é claro, teu senso de humor invejável. Obrigada! Assim como o professor Géder, pela ajuda nos momentos críticos do experimento, serei eternamente grata pela tua bondade e prestabilidade. Da mesma forma, ao Éverton Pitaluga, que conduziu com primor a parte técnica dos cortes e colorações, obrigada! Tu és uma pessoa incrível, admirável, além de muito inteligente. Gosto muito de ti e torço para que teus desejos tornem-se realidade! Sem esquecer de uma pessoa que não participou ativamente deste experimento, mas me ensinou muitas coisas, aguentou minhas visitas inesperadas em seu laboratório, interrompendo seu trabalho: Ailton, da imuno (HUSM): obrigada!

À querida professora Glaucia Kommers. Sem tua ajuda técnica, científica, moral, este trabalho não estaria aqui, exposto com seus devidos resultados. Agradecer é pouco, perto do que fizeste e estás fazendo por nós. Professora, tu és uma pesquisadora nata. O mundo tem muito a aprender contigo! Obrigada!

Ao professor Rafael Figuera, pelas considerações na qualificação deste projeto, assim como por abrir as portas de seu laboratório, juntamente com sua colega, prof. Glaucia. Muito obrigada!

À equipe de pós-graduandos da Medicina Veterinária, Ronaldo, Welden, Tati, Talissa e Taiara. Obrigada por disporem de seus preciosos tempos nos ensinando e ajudando. Desejo sorte e sucesso a todo(a)s vocês!

Ao professor Fabricio Zanatta, pelas contribuições na qualificação deste projeto, assim como seus ensinamentos ao longo do Mestrado. Admiro muito sua dedicação!
Obrigada.

Aos demais professores do PPGCO, Carlos Heitor, Thiago, Martinha. Grandes exemplos de profissionais e seres humanos. Obrigada pelos ensinamentos!

À nossa “super mega power máster” secretária do PPGCO, Jéssica Dalcin, sempre muito dedicada ao seu ofício, não sei de onde tira tanta paciência para suportar essa galera da pós ligando, pedindo, enfim...muito obrigada, é uma excelente profissional!

À minha querida amiga e paciente Gisele Difante, assim como seu esposo, Jairo, e seu filho, Marcos Vinícios, grandes incentivadores para minha busca pela qualificação profissional. Se hoje sou uma pessoa melhor, evoluída espiritualmente, devo muito a vocês, os quais me acolheram como se eu fosse filha de vocês aqui em Santa Maria. Que nossa amizade perdure para sempre. Muito obrigada!

Às minhas amigas que guardo no coração, Ariane Bonato, Michele Del Frari, Mônica Reck, Ariane Rossi, Sofia Silva, dentre tantas outras, que nem mesmo a distância faz com que percamos o contato, obrigada pela amizade verdadeira, pelas palavras de incentivo, pelos momentos maravilhosos que já partilhamos e os muitos que ainda virão. Adoro vocês!

Ao meu companheiro, Fabio Castilho, pela paciência comigo, pela força, pelo exemplo que és. Eu sou uma pessoa de sorte mesmo, pois te conheci em um momento que tinha tudo para darmos errado, e olha aí. Que bom que te encontrei.
Te amo!

À FAPERGS, pela bolsa de estudos.

A todos aqueles que de alguma forma passaram pelo meu caminho nestes dois anos, colaborando de alguma forma, seja com um simples: boa sorte!

Obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Universidade Federal de Santa Maria

TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO E ETANOL: PERDA ÓSSEA ALVEOLAR E RESPOSTA IMUNE EM RATOS COM PERIODONTITE

AUTORA: CIBELE BRUNO CAMPAGNOLO
ORIENTADORA: KARLA ZANINI KANTORSKI
Data e Local de Defesa: Santa Maria, 26 de agosto de 2015.

O objetivo do presente estudo foi avaliar uma formulação de azul de metileno (AM) com etanol para terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), utilizada como coadjuvante ao tratamento mecânico da periodontite experimental induzida em ratos. Quarenta ratos foram randomizados em cinco grupos: sem periodontite (CN); com periodontite e sem tratamento (CP); com periodontite submetidos a três tipos de tratamento: raspagem e alisamento radicular e irrigação com solução salina (RAR); raspagem e alisamento radicular e TFDa com AM diluído em água a 0,01% (TFD/água); raspagem e alisamento radicular e TFDa com AM diluído em etanol 20% (TFDa/etanol). A periodontite foi induzida pela colocação de ligadura no primeiro molar inferior direito por sete dias. A seguir, as ligaduras foram removidas e os tratamentos aplicados. Os animais foram eutanasiados sete dias após o tratamento. O desfecho primário foi a perda óssea na região de furca do primeiro molar avaliada histometricamente. O desfecho secundário foi o número de osteoclastos imuno-histoquimicamente marcados para fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP). Diferenças entre grupos foram avaliadas por *One Way* Anova e *post hoc* Bonferroni. Trinta e sete ratos foram submetidos às análises. Os três grupos de tratamento demonstraram estatisticamente menor perda óssea e menor número de osteoclastos TRAP-positivos, quando comparados ao grupo sem tratamento (CP) ($P < 0.05$). Nenhuma diferença foi verificada para os desfechos entre os grupos de tratamento ($P > 0,05$) e entre os tratamentos e o controle negativo ($P > 0,05$). A perda óssea e atividade osteoclástica não foram alteradas pela TFDa independentemente da inclusão do etanol na formulação do azul de metileno quando comparada a RAR. Portanto, a TFDa não resultou em benefício adicional quando utilizada como método coadjuvante à raspagem e alisamento radicular, considerando os parâmetros avaliados neste estudo.

Palavras-chave: Agentes fotossensibilizantes. Doenças periodontais. Fotoquimioterapia. Osteoclastos.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Dentistry Sciences Post-Graduation Program
Federal University of Santa Maria

PHOTODYNAMIC THERAPY WITH METHYLENE BLUE AND ETHANOL: ALVEOLAR BONE LOSS AND IMMUNE RESPONSE IN RATS WITH PERIODONTITIS

AUTHOR: CIBELE BRUNO CAMPAGNOLO

TUTOR: KARLA ZANINI KANTORSKI

Date and Local of Defense: Santa Maria, 2015, August ²⁶.

The aim of this study was to evaluate a formulation of methylene blue (MB) with ethanol to antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), used as an adjunct to mechanical treatment of experimental periodontitis induced in rats. Forty rats were randomized into five groups: without periodontitis (CN); and periodontitis without treatment (CP); periodontitis underwent three types of treatment: scaling and root planing and irrigation with saline (RAR); scaling and root planing and aPDT with MB diluted in water to 0.01% (aPDT/water); scaling and root planing and aPDT with MB diluted in 20% ethanol (aPDT/ethanol). Periodontitis was induced by placing ligature on the lower right first molar for seven days. Then, the ligatures were removed and the treatments applied. The animals were euthanized seven days after the treatment. The primary outcome was bone loss in the furcation region of the first molar evaluated histometrically. The secondary outcome was the number of osteoclasts immunohistochemically marked for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). Differences between groups were assessed by One Way ANOVA and post hoc Bonferroni. Thirty-seven rats were subjected to analysis. All three treatment groups showed statistically lower bone loss and smaller number of TRAP positive osteoclasts compared to the untreated group (CP) ($P < 0.05$). No difference was observed for the outcomes between treatment groups ($P > 0.05$), and between treatments and the negative control ($P > 0.05$). Bone loss and osteoclastic activity were not changed by aPDT regardless of the inclusion of ethanol in methylene blue formulation when compared to RAR. Therefore, the aPDT did not result in additional benefit when used as adjunctive method to scaling and root planning, considering the parameters evaluated in this study.

Keywords: Osteoclasts. Periodontal diseases. Photosensitizing Agents. Photochemotherapy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM – Azul de Metileno

AT – Azul de Toluidina

RAR – raspagem e alisamento radicular

Gold standard – padrão-ouro

Ad libitum – à vontade

TFDa – Terapia fotodinâmica antimicrobiana

Fs – fotossensibilizador

EROs – espécies reativas de oxigênio

ECR's – ensaios clínicos randomizados

mm – milímetros

µm – micrômetros

µs – micro-segundos

H/E – hematoxilina-eosina

Anti-RANKL – anticorpo ligante do receptor nuclear kappa-B

Anti-OPG – anticorpo osteoprotegerina

Anti-TRAP – anticorpo da enzima fosfatase ácida tartarato-resistente

g – grama

mg/Kg – miligrama por quilograma

CN – controle negativo

CP – controle positivo

RASUB – raspagem e alisamento subgingival

mL – mililitro

mW – miliwatts

nm – nanômetros (10^{-9})

J/ponto – joule por ponto

J/cm² – joule por centímetro quadrado

InGaAIP – Índio, Gálio, Alumínio e Fósforo

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

PBS – solução de tampão fosfato

pH – potencial hidrogeniônico

IC – intervalo de confiança

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

Apresentação.....	10
Introdução	12
1. REVISÃO DE LITERATURA	13
2. ARTIGO.....	29
Relevância clínica.....	30
Resumo.....	31
Introdução.....	32
Materiais e métodos.....	34
Resultados parciais.....	40
Discussão.....	42
Referências.....	45
Lista de ilustrações.....	52
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS	
Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	75
Anexo B – Normas da Revista <i>Journal of Clinical Periodontology</i>.....	76

INTRODUÇÃO

Apresentação

Esta dissertação de Mestrado é proveniente de um projeto de pesquisa “guarda chuva” intitulado “Influência do solvente do fotossensibilizador utilizado na terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da periodontite experimental em ratos diabéticos e não diabéticos”. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (027/2013).

Os grupos experimentais, tanto para o grupo de ratos diabéticos (n=120) quanto para o grupo de ratos não diabéticos (n=120) estão listados abaixo:

Grupo 1: controle negativo – ausência de periodontite (n=15);

Grupo 2: controle positivo - ausência de tratamento (n=15);

Grupo 3: raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação da bolsa periodontal com solução salina (n=30);

Grupo 4: RAR e terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), utilizando como fotossensibilizador azul de metileno dissolvido em água em concentração de 0,01% (n=30);

Grupo 5: RAR e TFDa, utilizando como fotossensibilizador azul de metileno dissolvido em água em uma mistura de água+carboximetilcelulose+etanol (77:3:20), com concentração de 0,01% (n=30).

Os períodos de avaliação consistem em 7, 15, e 30 dias após os tratamentos.

Inúmeros desfechos serão avaliados neste projeto, dentre eles, pode-se destacar:

- Avaliação do infiltrado inflamatório e organização das fibras colágenas, bem como mensurar a perda óssea alveolar e a perda de inserção histológica por meio de avaliação histológica (H/E) e Tricrômico de Masson no primeiro molar inferior;

- Diferenciação de fibras colágenas em tipo I e tipo III através da coloração Picrosirius red;

- Mensuração da expressão de marcadores imuno-histoquímicos associados com o metabolismo ósseo (RANKL e OPG);

- Avaliação da expressão de marcadores imuno-histoquímicos da angiogênese (VEGF);
- Análise de possíveis alterações no perfil hematológico, bioquímico e eletroforético de ratos diabéticos e não diabéticos, em relação aos tratamentos submetidos;
- Avaliação do estresse oxidativo local (tecido gengival) e sistêmico (plasma) nos diferentes grupos.

O presente estudo abordará os resultados parciais (7 dias) do grupo de ratos não diabéticos tendo como desfechos a perda óssea alveolar, osteoclastos imunomarcados para fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) e descrição das características do infiltrado inflamatório na área da furca do primeiro molar inferior.

Introdução

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) vem sendo proposta como método coadjuvante à raspagem e alisamento radicular (RAR) no tratamento das periodontites (WOOD et al., 1999). A TFDa apresenta vantagens, quando comparada aos antimicrobianos de uso sistêmico, devido a sua baixa probabilidade de desenvolver resistência bacteriana (CASSEL & MEKALANOS, 2001; HAMBLIN & HASAN, 2004; YOSHIKAWA, 2002).

Ensaio clínicos randomizados (ECR's) que compararam RAR+TFDa *versus* RAR divergem quanto aos benefícios clínicos da terapia combinada (RAR+TFDa) (AL-ZAHRANI et al., 2009; BETSY et al., 2014; CARVALHO et al., 2015; GE et al., 2011; LUCHESE et al., 2013; GIANNELLI, et al., 2012; MOREIRA et al., 2015). Em metanálise, Sgolastra et al. (2013) verificaram que apesar de diferenças estatísticas significantes a favor da terapia combinada quanto à redução de profundidade de sondagem (média de 0,19 mm, IC 95% 0,07-0,31) e ganho de inserção clínica (média 0,37 mm, IC 95% 0,26-0,47), os benefícios clínicos foram considerados de pequena magnitude.

Há evidência de que o uso de um solvente menos polar do que a água, como o etanol na formulação do AM, pode aumentar a produção e a meia-vida de oxigênio singlete. Como consequência, maior efeito antimicrobiano tem sido verificado *in vitro* quando comparado a formulações contendo água (GEORGE & KISHEN, 2007). Ainda não existem estudos em modelos de periodontite experimental avaliando formulações de AM e etanol.

O objetivo do presente estudo foi comparar o efeito da TFDa utilizando AM diluído em água ou etanol 20%, como coadjuvantes à RAR sobre a perda óssea alveolar e resposta imune na periodontite induzida em ratos.

Nossa hipótese de pesquisa considerou que menor perda óssea e menor expressão de marcadores associados com atividade osteoclástica seriam verificadas, nos animais submetidos à RAR e TFDa usando etanol na formulação, quando comparados aos animais submetidos apenas à RAR ou à associação de RAR e TFDa usando água como solvente.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Terapia fotodinâmica antimicrobiana

1.1.1. Aspectos gerais: histórico, definição, características

O uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) para inativação de microrganismos foi inicialmente descrito por Oscar Raab (1900) ao observar o efeito letal de um corante sobre o protozoário *Paramecia* na presença de luz solar. Em 1907, Von Tappeiner demonstrou a presença de oxigênio nas reações de fotossensibilização, e introduziu o termo Terapia Fotodinâmica, que foi definido como o “processo de fotossensibilização dependente de oxigênio”.

A TFDa é uma modalidade terapêutica não invasiva na qual um fármaco fotossensível, conhecido como fotossensibilizador (Fs), é aplicado em contato com a célula-alvo e ativado por luz proveniente de um laser com comprimento de onda adequado. O Fs ativado, na presença de oxigênio molecular, gera espécies de oxigênio citotóxicas capazes de danificar componentes celulares como membranas (STARK, 2005), proteínas (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004) e ácidos nucleicos (RAVANAT et al., 2000), resultando na morte bacteriana (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; GE et al., 2011; MAISCH, 2007; ROLIM et al., 2012; SOUKOS; GOODSON, 2011).

A TFDa apresenta alta seletividade, pois somente células que são expostas ao Fs e a luz sofrerão efeito citotóxico (KONAN; GURNY; ALLEMANN, 2002). O Fs age produzindo oxigênio singleto, que não possui especificidade por sítio de ação, reagindo com vários substratos biomoleculares, o que torna o desenvolvimento de cepas resistentes improvável (FONTANA et al., 2009). Além disso, o Fs não precisa ser mantido em altas concentrações na área infectada por longos períodos de tempo, como os antimicrobianos convencionais (WILSON et al., 1995).

1.1.2. Mecanismo de ação da TFDa

O mecanismo de ação da TFDa consiste na aplicação local de um Fs, ativado por uma luz de comprimento de onda adequado. Quando o Fs é ativado pela luz, o seu estado fundamental absorve um fóton de energia passando ao estado excitado singleto. Nesta condição, ele pode perder energia por decaimento eletrônico

(fluorescência) ou processo físico (calor) retornando ao seu estado fundamental; ou pode sofrer um re-arranjo eletrônico e passar para o estado tripleto excitado, menos energético, porém mais estável. No estado tripleto excitado, a energia pode ser perdida por decaimento energético (fosforescência) retornando ao seu estado fundamental; ou ele pode transferir sua energia excitacional para outras moléculas do meio por dois mecanismos (Figura 1): Reação tipo I – envolve abstração de hidrogênio ou transferência de elétron entre o Fs e biomoléculas gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), os quais podem iniciar reações redox resultando em dano celular; ou Reação tipo II – envolve a transferência de energia via a colisão do Fs no estado tripleto excitado com o oxigênio molecular, o que resulta na formação de oxigênio singleto, altamente citotóxico devido a sua forte atividade oxidativa (HARRIS et al., 2005). Os produtos gerados a partir das reações tipo I e II são citotóxicos, mas o oxigênio singleto tem sido considerado o principal responsável pelo efeito antimicrobiano da TFDa (GEORGE; KISHEN, 2007). As reações tipo I e tipo II podem ocorrer simultaneamente, e a razão entre elas depende da concentração de substrato e de oxigênio, e do tipo de Fs utilizado (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

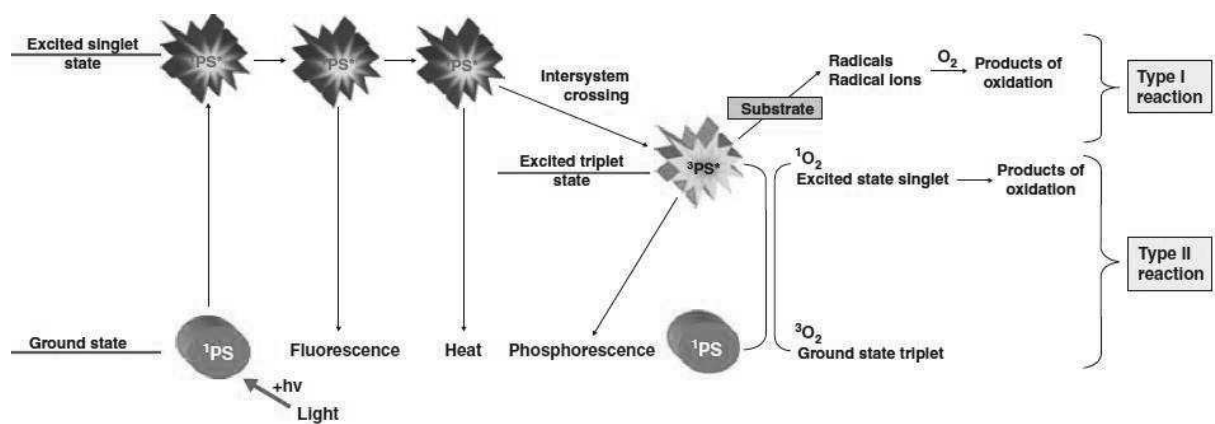


Figura 1. Mecanismo de ação da TFDa; reações Tipo I e Tipo II. (Soukos & Goodson, 2011)

1.1.3. Fotossensibilizadores

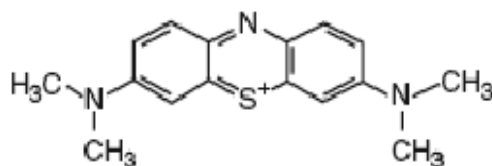
Para aplicação na TFDa, o fotossensibilizador ideal deve possuir um elevado rendimento quântico no estado tripleto para obter grandes concentrações da droga ativada; alta afinidade de ligação aos microrganismos; largo espectro de ação; baixa

afinidade de ligação às células de mamíferos, evitando o risco de foto-destruição de tecidos do hospedeiro; baixa propensão para seleção de bactérias resistentes; baixa toxicidade; risco mínimo de promoção de processos mutagênicos e lipofilicidade (solubilidade relativa em água e lipídeos). Outros fatores mais especializados são desejáveis, como características de absorção de luz, intensidade de absorção, e a eficiência da formação do estado tripleto excitado ou de produção de oxigênio singlete (HARRIS et al., 2005, MEISEL & KOCKER, 2005).

Dentre os fotossensibilizadores utilizados na TFDa, os mais amplamente testados são os derivados de fenotiazinas, como o azul de metileno (AM) e o azul de toluidina (AT). Fenotiazinas possuem fototoxicidade a tumores, bactérias, vírus e outros microrganismos, com potencial de aplicação na área clínica (HARRIS et al., 2005). Além disso, são reconhecidamente seguros para uso em humanos (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1990). Os comprimentos de onda longos e a intensidade de absorção dos Fs derivados de fenotiazinas, acoplado com elevadas eficiências de produção do oxigênio singlete faz desta classe uma alternativa atraente para uso.

1.1.4. Azul de metileno

O azul de metileno é um Fs catiônico, hidrofílico (WAINWRIGHT et al., 1999; 2000), com uma estrutura de baixo peso molecular composta por um anel aromático tricíclico planar (Figura 2), constituindo um sistema altamente conjugado, funcionando como cromóforo deste corante (BUCK, 2009).



Azul de metileno

Figura 2. Estrutura molecular do azul de metileno. Fonte: Buck, S.T.G.

O AM é o protótipo das fenotiazinas, com baixa toxicidade às células humanas, e tem seu pico de absorção em 665 nm, com máxima absorção na faixa

de comprimento de onda entre 600 e 900 nm – janela terapêutica desejável no tratamento de condições humanas (HARRIS et al., 2005).

A carga positiva e a geometria planar do AM permitem sua intercalação com a estrutura do ácido nucleico (DNA), especialmente em regiões ricas em guanina-citosina, levando a uma quebra de cadeia e degradação oxidativa das bases via oxigênio singlete (WAINWRIGHT, 2000; 2002). Adicionalmente, entre os componentes celulares, o AM acumula-se preferencialmente na mitocôndria bacteriana, visto que este corante é atraído pelo ambiente eletroquímico negativo da matriz mitocondrial (SEVERINO et al., 2003).

A ligação do Fs com estruturas biomoleculares bacterianas pode alterar o tipo de interação das moléculas do Fs, com a formação de agregados, assim como na própria formulação do Fs diluído em água pode ocorrer uma agregação formando dímeros (GABRIELLI et al., 2004; SEVERINO et al., 2003; USACHEVA et al., 2001). Severino e colaboradores (2003) demonstraram que as características fotofísicas e fotoquímicas do AM são moduladas pela quantidade e o tipo de dímero formado, atuando na competição pelo estado excitado tripleto do Fs entre transferências eletrônicas (Fs-Substrato) e energéticas (Fs-Oxigênio). As moléculas na forma de dímeros apresentam menor efetividade na captação de energia (PATIL; PAWAR; TALAP, 2002), atuando predominantemente nas reações envolvendo trocas eletrônicas com o substrato (reação tipo I), com menor produção de oxigênio singlete (reação tipo II). Assim, tendo em vista que o oxigênio singlete é o componente citotóxico da TFDa, uma formulação que estabilize a porção monomérica é preferível para fins terapêuticos (GEORGE; KISHEN, 2007).

1.1.5. A mudança do solvente do Fs como estratégia para melhorar a efetividade da TFDa

Vários estudos *in vitro* avaliaram o efeito do AM na TFDa sobre bactérias planctônicas (USACHEVA et al., 2001) e biofilmes (CHAN & LAI, 2003; FONTANA et al., 2009; PELOI et al., 2008; PFITZNER et al., 2004). Periodontopatógenos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* foram suscetíveis a TFDa utilizando AM (CHAN; LAI, 2003). Redução microbiana também foi observada nos microrganismos bucais

em biofilmes mono- (GEORGE; KISHEN, 2007) ou multi-espécies (FONTANA et al., 2009).

Ensaio clínicos randomizados avaliaram o efeito da RAR versus RAR+TFDa no tratamento das periodontites utilizando como Fs o AM (BETSY, et al., 2014; BALATA et al., 2013; CAMPOS et al., 2013; GE et al., 2011; GIANELLI et al. 2012), ou o AT (ARWEILER et al. 2013; 2014; BASSIR et al., 2013; POURABBAS et al., 2014; RÜHLING et al., 2010; THEODORO et al., 2012).

Luchesi et al. (2013) verificaram que a TFDa não promoveu benefícios clínicos adicionais quando comparada a RAR no tratamento de lesões de furca grau II. Contudo, a redução de periodontopatógenos e de citocinas inflamatórias locais foi maior quando a TFDa foi aplicada.

Em casos de periodontite crônica os estudos divergem. A TFDa como coadjuvante a RAR falhou em obter benefícios clínicos como ganho de inserção e redução da profundidade de sondagem quando comparado a RAR em alguns estudos (BALATA et al. 2013; BASSIR et al. 2013; CHRISTODOULIDES et al. 2008; POURABBAS et al. 2014; THEODORO et al. 2012), e demonstrou benefícios adicionais para estes parâmetros em outros estudos (BETSY et al. 2014; GIANNELLI et al. 2012). Ge et al. 2011 demonstraram que TFDa associada com RAR resultou em redução significativa de sangramento à sondagem em bolsas inicialmente de 5 mm ou mais quando comparada à RAR somente. Theodoro et al. (2012) verificaram que TFDa associada à RAR reduziu significativamente alguns patógenos periodontais, embora nenhum benefício nos desfechos clínicos tenha sido verificado.

Em pacientes fumantes com periodontite crônica, Queiroz et al. (2014, 2015) falharam em demonstrar benefício clínico ou microbiológico da TFDa associada com RAR quando comparada somente a RAR.

Em casos de periodontite agressiva, a TFDa foi comparada ao uso de antibióticos sistêmicos (ARWEILER et al. 2013, 2014). Ambas as modalidades de tratamento foram usadas como coadjuvantes a RAR. Os autores concluíram que a TFDa não pode ser considerada uma alternativa ao uso de antibióticos sistêmicos visto que estes promoveram maior redução de profundidade de sondagem e maior ganho de inserção clínica. Recente revisão sistemática avaliou o papel da TFDa no tratamento da periodontite agressiva (VOHRA et al. 2015). Sete estudos foram incluídos. Em cinco estudos, a TFDa foi realizada como coadjuvante à RAR. Um

estudo mostrou melhora significativa nos parâmetros periodontais para indivíduos que receberam TFDa como coadjuvante à RAR, em comparação com RAR apenas no acompanhamento. No entanto, parâmetros periodontais similares foram relatados nas mesmas condições terapêuticas em outro estudo. Um estudo mostrou resultados comparáveis quando foi comparada a TFDa *versus* RAR. Em dois estudos, a administração de antibióticos associados à RAR mostraram resultados significativamente melhores quando comparados a aplicação de uso coadjuvante de TFDa + RAR. O autor conclui que, apesar de alguns resultados favoráveis à TFDa no tratamento de periodontite agressiva, mais ECR's com grupos controle bem definidos são necessários para justificar seu uso (VOHRA et al. 2015).

Durante a manutenção periodontal, a TFDa associada com RAR foi comparada como o tratamento mecânico. Alguns autores não encontraram benefício clínico da terapia combinada (CHONDROS et al. 2009; RÜHLING et al. 2010), enquanto outros demonstraram maior redução de profundidade de sondagem (CAMPOS et al. 2013).

Em metanálise, Sgolastra et al. (2013) verificaram que apesar de diferenças estatísticas significantes a favor da terapia combinada quanto à redução de profundidade de sondagem (média de 0,19 mm, IC 95% 0,07-0,31) e ganho de inserção clínica (média 0,37 mm, IC 95% 0,26-0,47), os benefícios clínicos foram considerados de pequena magnitude. Assim, a TFDa como coadjuvante ao tratamento periodontal não deveria ser indicada (SGOLASTRA et al., 2013).

Os estudos clínicos que avaliaram a TFDa utilizaram como Fs o AM ou AT diluído em água. Há evidências de que esta formulação resulta em limitada produção de oxigênio singlete, associada com curta meia-vida (MEISEL; KOCHER, 2005) e baixo potencial de difusão do mesmo (OCHSNER, 1997).

O efeito antimicrobiano do Fs pode ocorrer pela produção de quantidade suficiente de oxigênio singlete próximo à membrana externa das bactérias, de maneira que este possa se difundir para o interior celular produzindo danos letais (DAHL et al., 1987, 1989). Como consequência, o Fs deve estar em íntimo contato com a célula-alvo para que o oxigênio singlete gerado possa exercer seu efeito antimicrobiano, visto que apresenta pequena distância de difusão (20 nm) e curta meia-vida (OCHSNER, 1997; MEISEL; KOCHER, 2005). O solvente utilizado na formulação do Fs pode modificar a meia-vida do oxigênio singlete, sendo

consideravelmente maior em etanol (20 μ s) do que em água (4 μ s) (MEISEL, KOCHER, 2005).

George & Kishen (2007), demonstraram que a inclusão do etanol na formulação do AM aumentou o efeito antimicrobiano da TFDa frente a biofilmes de *Enterococcus faecalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Dutra et al. (2013) demonstraram que a produção de espécies reativas de oxigênio oriundas da reação tipo I e tipo II foi maior em formulação de AM contendo etanol em comparação à água somente. Esses achados foram atribuídos à maior produção de oxigênio singlete e aumento da sua meia vida (20 μ s), e a menor agregação molecular do AM na presença de etanol, o mantendo na forma monomérica.

1.2. Periodontite

1.2.1. Etiopatogenia

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória, resultante da interação de um biofilme bacteriano aderido às superfícies dentárias e de um hospedeiro suscetível (PAGE E KORNMAN, 1997). As periodontites acometem os tecidos de suporte dos dentes resultando na perda de osso alveolar, ligamento periodontal e cimento radicular. Caso não tratadas, a perda do elemento dentário consiste no seu desfecho final. Ela apresenta alta prevalência nas populações, tanto em países desenvolvidos (ALBANDAR et al., 1999), como em países em desenvolvimento (SUSIN et al., 2004), tendo importante impacto na qualidade de vida das pessoas (AL-HARTHI et al., 2013).

A progressão deste processo é altamente dependente da reação imuno-inflamatória gerada pelo hospedeiro em resposta às bactérias e seus subprodutos (SCHENKEIN, 2006). Dentre as enzimas liberadas pelas bactérias no biofilme estão proteases que digerem colágeno (colagenases), elastina (elastases), e fibrina (tripsina-like). Microrganismos também apresentam endotoxinas como os lipopolissacarídeos (LPS) que estimulam a resposta inflamatória e imunológica no hospedeiro. As respostas tanto imune quanto inflamatória, na tentativa de proteger os tecidos periodontais da ação bacteriana, estimulam a produção de citocinas, prostaglandinas e metaloproteinases de matriz por parte das células de defesa e

teciduais. Conseqüentemente, estes mediadores inflamatórios sinalizam atividades celulares associadas com a reabsorção óssea e a degradação da matriz extracelular dos tecidos conjuntivos gengivais e do ligamento periodontal, resultando na perda dos tecidos de suporte dos dentes (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992).

1.2.2. O metabolismo ósseo relacionado à periodontite

A reabsorção óssea alveolar é consequência da infecção periodontal. Ela é mediada por osteoclastos e ocorre concomitante com a perda de inserção do tecido conjuntivo durante a progressão da doença. Ou seja, os mecanismos envolvidos na reabsorção óssea respondem a sinais de células inflamatórias e iniciam a degradação óssea com o objetivo de manter uma distância “segura” da periferia do infiltrado inflamatório (LINDHE; HAMP, 1975).

1.2.3. O eixo RANK-RANKL-OPG

A remodelação óssea promove equilíbrio no metabolismo do cálcio e fósforo e repara microdanos no osso permitindo manter sua microestrutura e responder as demandas mecânicas e funcionais (CLARKE, 2008). A remodelação do tecido ósseo apresenta quatro fases: 1. Ativação – pré osteoclastos respondem a estímulos físicos e hormonais e concentram-se sobre a superfície óssea que será reabsorvida. Para isso, fundem-se e transformam-se em osteoclastos multinucleados. 2. Reabsorção - osteoclastos ativados escavam uma cavidade na superfície óssea. 3. Reversão – osteoclastos desaparecem. 4. Formação – osteoblastos sintetizam novo osso.

O processo de remodelação inicia-se com a ligação do fator de estimulação das colônias de macrófagos (M-CSF) ao receptor *c-fms* presente nos pré-osteoclastos estimulando sua proliferação e fusão. Concomitantemente, M-CSF estimula a proteína RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B) presente na membrana de osteoblastos a ligar-se ao receptor RANK (receptor ativador do fator nuclear Kappa B), localizado na membrana dos osteoclastos. Essa ligação permite a diferenciação do pré-osteoclasto em osteoclasto maduro (CLARKE, 2008; COCHRAN, 2008; TAKAYANAGI, 2005).

Em contraste, a osteoprotegerina (OPG), receptor “decoy” de RANKL, produzida por osteoblastos pode ligar-se ao RANKL impedindo sua ligação ao RANK

inibindo a osteoclastogênese (ROUX et al. 2002). Assim, o razão entre RANKL/OPG determina o quanto de osso será reabsorvido (CLARKE 2008; COCHRAN, 2008; GALLAGHER & SAI 2010; LEIBBRANDT & PENNINGER, 2008; TAKAYANAGI, 2005).

Para a reabsorção óssea, o osteoclasto maduro acidifica seu microambiente pela secreção de íons de hidrogênio via H^+ -ATPase, da enzima catepsina K, da TRAP (fosfatase ácida tartarato-resistente) e de metaloproteinases da matriz (MMPs), induzindo a destruição da matriz orgânica e inorgânica (CLARKE 2008; GALLAGHER & SAI 2010; BELIBASAKIS & BOSTANCI, 2012). Após a cavidade óssea estar definida, os pré-osteoblastos são atraídos para a área de reabsorção. Osteoblastos maduros sintetizam novo colágeno e outras proteínas da matriz preenchendo a cavidade de reabsorção com novo osteoide. A deposição do conteúdo mineral inicia-se na interface do novo osteoide com o osso calcificado (CLARKE 2008; BELIBASAKIS & BOSTANCI, 2012; GALLAGHER & SAI 2010).

Na periodontite, níveis elevados de RANKL nos tecidos são observados, e o equilíbrio com a expressão de OPG parece determinar a severidade da doença (GARLET et al., 2004; LIU et al., 2003; MOGI et al., 2004). Dentre os fatores que regulam a quebra da homeostasia dos tecidos conjuntivo e ósseo resultando no processo destrutivo, estão as citocinas inflamatórias. As citocinas inflamatórias são proteínas de baixo peso molecular, produzidas em resposta aos antígenos bacterianos, principalmente pelas células T, envolvidas no início e em diferentes estágios efetores da inflamação, além de regular a amplitude e duração da resposta imune (BALKWILL & BURKE, 1989).

A literatura tem procurado esclarecer as redes de citocinas envolvidas na periodontite crônica, muitas vezes com resultados conflitantes (SEYMOUR & GEMMELL, 2001). Considerando que a destruição dos tecidos periodontais pode ser resultante de um desequilíbrio na regulação da resposta imune, esta disfunção pode envolver e afetar de modo diferente os linfócitos T e B. Como a resposta imune é regulada principalmente pelos linfócitos T helper (Th) ou auxiliares, estes podem estar envolvidos diretamente na patogênese das doenças periodontais (MARTHUR & MICHALOWICZ, 1997). Duas subpopulações distintas de Th têm mecanismos antagônicos. Assim, uma resposta predominantemente Th1 implicaria principalmente de uma resposta imune celular pró-inflamatória, enquanto uma resposta Th2, uma resposta imune humoral antiinflamatória.

Portanto, parece que um desequilíbrio na sua produção com consequente polarização de resposta Th1, Th2 ou Th17 pode estar intimamente ligada ao estabelecimento de lesões periodontais estáveis ou progressivas. Th17 é uma nova subclasse das células T-helper, associada a lesões inflamatórias de natureza crônica. Esta subclasse é um importante regulador da migração de neutrófilos e macrófagos, e subsequente eliminação de patógenos; age sobre osteoblastos aumentando a expressão de RANKL, induzindo diretamente a diferenciação de progenitores de osteoclastos em osteoclastos maduros (BI; LIU; YANG, 2007; KRAMER & GRAFFEN, 2007).

Desta forma, nas lesões periodontais, o balanço entre a expressão dos mediadores oriundos das células Th1, Th2 e Th17 pode ser um fator relevante no desenvolvimento de processos destrutivos, regulando, possivelmente, a proporção RANKL/OPG (GRAVES & COCHRAN, 2003).

1.2.4. Tratamento periodontal: alternativas, vantagens e desvantagens

O tratamento padrão-ouro das periodontites consiste na remoção mecânica do biofilme subgengival e de depósitos mineralizados por meio de raspagem e alisamento radicular (COBB, 2002). Com este tratamento, as superfícies dentárias tornam-se biocompatíveis ocorrendo resolução do processo inflamatório e cicatrização tecidual. Estudos longitudinais têm demonstrado que esta modalidade de tratamento associada com um programa periódico de controle do biofilme permitem a estabilidade dos níveis de inserção periodontal e a manutenção dos dentes ao longo dos anos (AXELSSON et al., 2004; CHECCHI et al., 2002; FARDAL et al., 2004).

No entanto, em algumas situações clínicas, a efetividade do tratamento pode ser limitada. Estudos longitudinais têm relatado que alguns pacientes que receberam tratamento periodontal convencional, mesmo sob manutenção periodontal, apresentaram persistência de microrganismos em alguns sítios, contribuindo com a não-resolução da inflamação e, conseqüentemente, a evolução da doença periodontal (BADERSTEIN; NILVÉUS; EGELBERG, 1990; SERINO et al., 2001).

Fatores de ordem local ou desordens sistêmicas podem modificar a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro frente à doença periodontal, tendo potencial para modificarem a susceptibilidade à doença, a microbiota presente no biofilme

subgengival, a apresentação clínica da doença periodontal, a sua progressão, e até mesmo a resposta ao tratamento (KULKARNI & KINANE, 2014). Hábitos deletérios, como o tabagismo, podem dificultar a cicatrização após o tratamento periodontal. O fumo é um fator de risco significativo para a periodontite, e os pacientes fumantes têm uma diminuição na resposta imunológica e a cicatrização comprometida após o tratamento, quando comparado com os não-fumantes ou ex-fumantes (QUEIROZ et al., 2013). Papantonopoulos (1999) constatou que maior percentual de fumantes necessitou de tratamento adicional seis a oito semanas após o tratamento periodontal convencional (RAR). Em um estudo longitudinal prospectivo, Bergström, Eliasson e Dock (2000) acompanharam 101 indivíduos durante 10 anos. Fumantes apresentaram aumento no percentual de sítios doentes ($PS \geq 4$ mm) e na perda de altura óssea ao longo do tempo quando comparados a nunca fumantes.

Com relação a fatores sistêmicos que podem modificar a resposta ao tratamento periodontal, destaca-se o Diabetes Mellitus. Estudos epidemiológicos em pacientes com diabetes mal-controlada ou com controle glicêmico inadequado demonstraram um aumento na suscetibilidade a infecções, principalmente a periodontite, e um aumento na extensão e severidade desta doença (MEALEY & OATES, 2006; TAYLOR; BURT; BECKER, 1998; TERVONEN & OLIVER, 1993). Tervonen & Karjalainen, em 1997, compararam a resposta um ano após o tratamento periodontal de pacientes diabéticos com bom, moderado e inadequado controle metabólico. Os autores concluíram que pacientes com inadequado controle glicêmico, a longo prazo, têm um risco maior de desenvolver periodontite, além de experimentar um padrão mais severo da doença, quando comparado aos pacientes com adequado controle glicêmico. O estudo também demonstrou que pacientes diabéticos com controle inadequado apresentam recorrência maior e mais rápida da doença em determinados sítios após o tratamento periodontal. Estes resultados vão de encontro com os achados de Sepälä e colaboradores, em 1993, os quais encontraram maior perda de inserção e maior perda óssea alveolar em pacientes diabéticos mal-controlados em torno de 1 a 2 anos após o tratamento periodontal.

Pacientes com periodontite agressiva, doença que geralmente acomete indivíduos mais jovens e com um caráter de destruição dos tecidos periodontais de suporte mais rápido, podem não responder favoravelmente ao tratamento mecânico (ARWEILER, et al., 2014). Em determinados casos, a resposta ao tratamento em termos de resolução da inflamação e redução da profundidade de sondagem falha, e

isso pode ser explicado, em parte, devido a extensa colonização de microrganismos periodontopatogênicos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* (RENVERT et al., 1990; SAGLIE; MARFANY; CAMARGO, 1988).

A inacessibilidade dos instrumentos manuais em regiões de relativa complexidade anatômica, como concavidades, fissuras e até mesmo uma bolsa muito profunda dificultam a adequada descontaminação mecânica das superfícies (WENSTRÖM; DAHLÉN; RAMBERG, 2011). Consequentemente, a carga bacteriana remanescente pode impedir o processo de cicatrização tecidual. (ALWAEELI; AL-KHATEEB; AL-SADI, 2013).

Nestas situações clínicas (pacientes fumantes, diabéticos, casos de periodontite agressiva, lesões de furca de complexa anatomia para realização de controle mecânico do biofilme subgingival), o uso de antimicrobianos vem sendo proposto, tanto na forma local quanto sistêmica. O objetivo é suprimir ou reduzir a carga bacteriana e consequentemente trazer benefícios adicionais à terapia mecânica (SLOTS et al. – Position Paper 2004).

O uso de antimicrobianos sistêmicos associados ao tratamento mecânico tem sido discutido nas últimas décadas na periodontia. Em metanálises, Sgolastra e colaboradores (2012a, 2012b) verificaram diferenças estatisticamente significantes a favor da raspagem e alisamento radicular associada ao uso de antibióticos sistêmicos comparado ao tratamento mecânico apenas. O ganho de inserção clínica foi de 0,21mm (IC 95%, 0,02-0,4) e de 0,42mm (IC 95%, 0,23-0,61) maior com a terapia combinada nas periodontites crônicas e agressivas, respectivamente.

Keestra e colaboradores (2014) avaliaram, através de uma revisão sistemática e metanálise, se existem diferenças entre a eficácia nos diferentes tipos de antibióticos sistêmicos, em combinação com RAR *versus* RAR somente, em pacientes com periodontite crônica. Um ganho estatisticamente significativo no nível de inserção clínica de 0,49mm ($I^2 = 38\%$), 0,42mm ($I^2 = 18\%$), e 0,61mm ($I^2 = 0\%$) a favor da utilização de antibiótico sistêmico associado à RAR foi observado após 3, 6, e 12 meses, respectivamente. A redução do percentual médio de sítios apresentando sangramento a sondagem no grupo que recebeu antibiótico foi 5,39% e 3,80% maior em 3 e 12 meses, respectivamente, quando comparado ao grupo que não recebeu.

Em 2003, Herrera e colaboradores observaram maior ganho de inserção clínica em pacientes que receberam RAR e antibióticos em sítios com maior profundidade de sondagem inicial comparados a pacientes que receberam somente o tratamento mecânico. O autor leva em consideração as limitações ao efetuar uma metanálise sobre o assunto, pois não há uma padronização nas metodologias empregadas, assim como os estudos deveriam estender o período de acompanhamento, além de adicionar variáveis microbiológicas nas avaliações.

Antibióticos administrados sistemicamente podem apresentar repercussões também sistêmicas, como infecções oportunistas em outros sítios e reações de hipersensibilidade. Além disso, o desenvolvimento de resistência de bactérias patogênicas é um problema emergente, consequência do grande volume de prescrições, das prescrições inadequadas, e da falta de adesão dos pacientes em seguir integralmente o regime de tratamento. Bactérias multiplicam-se rapidamente, e aquelas que sofrem mutação na presença de antibióticos para favorecer a sua sobrevivência, podem tornar-se predominantes na população microbiana (CASSELL & MEKALANOS, 2001; HAMBLIN & HASAN, 2004; YOSHIKAWA, 2002). Assim, o benefício clínico do uso de antibióticos sistêmicos no tratamento das periodontites e os possíveis eventos adversos decorrentes do seu uso devem ser considerados na tomada de decisão.

Tendo em vista os aspectos negativos relacionados ao uso de antimicrobianos, a busca por novas terapias que possam oferecer uma alternativa ao uso desses fármacos torna-se necessária. Neste contexto, a TFDa tem sido proposta como alternativa para o tratamento de infecções localizadas, como as periodontites (WOOD et al., 1999), apresentando baixa probabilidade de desenvolver resistência bacteriana. (GOULART et al., 2010; HAMBLIN; HASAN, 2004; MAISCH, 2007; WAINWRIGHT et al., 1997).

1.2.5. O uso da TFDa no tratamento da periodontite em modelos experimentais

Em modelos de periodontite experimental em animais, o uso coadjuvante da TFDa à raspagem e alisamento radicular tem demonstrado benefícios adicionais em comparação ao tratamento mecânico somente. Esses achados têm sido observados como menor perda óssea na região de furca (ALMEIDA et al., 2008; CARVALHO et al., 2011; FERNANDES et al., 2010; GARCIA et al., 2013a, 2013b). O modelo de

periodontite induzida em ratos durante sete dias no primeiro molar inferior vem sendo utilizado para avaliar o efeito da TFDa, como coadjuvante a raspagem e alisamento radicular em ratos sistemicamente normais (ALMEIDA et al., 2008a, CARVALHO et al., 2011, GARCIA et al., 2012, GARCIA et al., 2013a), com diabetes (ALMEIDA et al., 2008b), imunossuprimidos por dexametasona (FERNANDES et al., 2010), imunossuprimidos por tracolimus (BOTTURA et al., 2011), submetidos a nicotina (GARCIA et al., 2011), e em animais ovariectomizados (GARCIA et al., 2013b).

O uso de animais na pesquisa tem aumentado, em função da dificuldade em estudar a resposta do hospedeiro a determinadas condições terapêuticas, assim como a patogênese de doenças em humanos. Ratos (*Rattus norvegicus*) são frequentemente usados em modelos de periodontite experimental, pelo fato de serem fáceis ao manipular, seu custo efetivo e características macroscópicas e microscópicas semelhantes ao ser humano (KLAUSEN, 1991; OZ & PULEO, 2011).

O tempo de ligadura estimado em sete dias é o suficiente para observar perda óssea significativa em ratos sistemicamente normais. Chang e colaboradores, em 2013, descreveram as alterações periodontais que ocorrem em ratos após a indução de periodontite. Ratos sistemicamente normais e diabéticos foram avaliados. Diabetes foi induzida por meio de injeção de estreptozotocina. Periodontite foi induzida pela colocação de ligadura e manutenção da mesma por diferentes períodos: 7, 14 e 21 dias. Análises histológicas, microtomográficas e imunohistoquímicas foram realizadas após esses períodos. Os autores verificaram nos ratos sistemicamente normais que significativa perda óssea ocorre em 7 dias atingindo um platô em 14 dias. Nos ratos diabéticos, progressiva perda óssea foi detectada até 21 dias. O autor considera que o estudo teve uma limitação em relação ao curso clínico do diabetes, pois foi muito curto (28 a 42 dias), e a natureza aguda deste modelo pode não ter reproduzido totalmente as condições patológicas humanas, considerando o caráter crônico do diabetes.

Um estudo recente avaliou a resposta do hospedeiro em diversos modelos experimentais de indução de periodontite. Os autores demonstraram que o modelo de injeção de uma bactéria periodontopatogênica (*P. gingivalis*) e a instalação de uma ligadura constituem os modelos mais representativos de doença periodontal em humanos. Além disso, apenas o modelo de ligadura promove perda óssea alveolar

significante após 7 dias, mantendo esta durante o período de estudo (15 e 30 dias) (DE MOLON et al., 2014).

Garcia e colaboradores, em 2015, através de análises histopatológicas, encontraram uma grande magnitude de resposta inflamatória e severa desorganização tecidual na região de furca, em ratos que não receberam qualquer tipo de tratamento após a remoção da ligadura mantida por 7 dias, tornando evidente que a instalação de ligadura foi efetiva no desenvolvimento da periodontite experimental.

Estes achados vão de encontro com Graves et al. (2008), os quais observaram que a ligadura favorece o acúmulo de placa, a ulceração do epitélio e invasão bacteriana dos tecidos periodontais. As citocinas induzidas pela resposta do hospedeiro a produtos bacterianos estimulam alterações no epitélio e provocam uma reação inflamatória nos tecidos periodontais (GRAVES; OATES; GARLET, 2011). Produtos bacterianos nestes tecidos induzem a resposta do hospedeiro, promovendo inflamação, perda de inserção e perda óssea alveolar em um período de sete dias (THEODORO et al., 2014).

Inúmeros desfechos são utilizados em modelos de periodontite em ratos quando condições sistêmicas, fumo, imunossupressão ou modalidades de tratamento são avaliadas. Dentre estes destacam-se a análise histológica, onde em geral compara-se a resposta inflamatória tecidual com relação ao padrão de organização das fibras colágenas e angiogênese nos diferentes tratamentos (CARVALHO, et al., 2011; FERNANDES et al., 2009; GARCIA et al., 2012b; YANG, et al. 2015), a análise histométrica, através da mensuração da área de perda óssea alveolar (em mm²) na região de furca (BOTTURA et al., 2011; DE ALMEIDA et al., 2008; GARCIA et al., 2011; GARCIA et al., 2015; KIM et al., 2014;), assim como medidas lineares da distância da junção cimento-esmalte à porção mais coronária da crista óssea (ARAL et al., 2015; SAGLAM et al., 2015; TANG et al., 2014; YANG et al., 2015) e a análise imuno-histoquímica, com a marcação de diferentes anticorpos, como o anti-RANKL (ligante do receptor ativador nuclear kappa-B), anti-OPG (osteoprotegerina) e anti-TRAP (fosfatase ácida tartarato-resistente), específicos para avaliar a reabsorção óssea alveolar (GARCIA et al., 2012a; GARCIA et al., 2013, GARCIA et al., 2015; SAGLAM, et al., 2014; TANG et al., 2014; THEODORO et al., 2015). Esta modalidade de análise é um complemento de

extrema valia para visualizar e comparar a resposta imune com a resposta inflamatória tecidual nos diferentes períodos e grupos de tratamento.

2. ARTIGO

Efeito fotodinâmico antimicrobiano de azul de metileno em formulação com etanol sobre perda óssea alveolar e resposta imune na periodontite induzida em ratos

Running title: TFDa com etanol no tratamento da periodontite

Palavras-chave: doenças periodontais; agentes fotossensibilizantes; azul de metileno; fotoquimioterapia; laser; osteoclastos.

Cibele Bruno Campagnolo¹, Silvana Martins Rodrigues¹, Glaucia Kommers², Rafael Fighera³, Roberto Marinho Maciel⁴, Cristiane Cademartori Danesi⁵, Karla Zanini Kantorski⁶

¹ Aluna de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Professora Associada, Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Professor Adjunto, Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴ Médico Veterinário, Doutor em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁵ Professora Adjunta, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁶ Professora Adjunta, Departamento de Estomatologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Autor correspondente:

Karla Zanini Kantorski

Rua Marechal Floriano Peixoto, 1184, 97015-372, Santa Maria, RS, Brasil.

Telefone/Fax: +55.55.3220.9284

Email: kzkantorski@gmail.com

O artigo foi formatado segundo as normas do periódico *Journal of Clinical Periodontology* (junho de 2015).

Relevância clínica

Razões científicas do estudo: Em ensaios clínicos randomizados, a TFDa como coadjuvante à RAR tem falhado em mostrar benefícios clínicos adicionais. Tentativas de otimizar o efeito da TFDa são importantes pois esta pode ser uma alternativa aos antibióticos. *In vitro*, etanol na formulação de AM resulta em melhores propriedades fotoquímicas e antimicrobianas.

Principais achados: A adição do etanol na formulação do AM falhou em promover benefícios adicionais em comparação à formulação contendo água. Nenhuma diferença foi observada entre grupos com TFDa e somente RAR.

Implicações práticas: RAR consiste no padrão-ouro para o tratamento das periodontites. Outras estratégias para otimizar a TFDa devem ser pesquisadas.

Resumo

Objetivos: comparar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) utilizando azul de metileno (AM) diluído em água e etanol 20% como coadjuvantes à raspagem e alisamento radicular (RAR) sobre a perda óssea alveolar e resposta imune na periodontite induzida em ratos.

Materiais e métodos: 40 ratos foram randomizados em 5 grupos: sem periodontite (CN); com periodontite e sem tratamento (CP); com periodontite submetidos a RAR e irrigação com solução salina (RAR/salina); RAR e TFDa com AM diluído em água (TFDa/água); RAR e TFDa com AM diluído em etanol 20% (TFDa/etanol). Periodontite foi induzida por ligadura no primeiro molar inferior direito por 7 dias. Após, as ligaduras foram removidas e os tratamentos aplicados. Decorridos 7 dias, a perda óssea na região da furca foi mensurada por histometria e osteoclastos marcados para TRAP foram quantificados por imuno-histoquímica.

Resultados: Os 3 grupos de tratamento (RAR, TFDa/água, TFDa/etanol) apresentaram estatisticamente menor perda óssea e menor número de osteoclastos TRAP-positivos quando comparados ao controle sem tratamento (CP) ($P < 0,05$). Nenhuma diferença estatística foi verificada entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Conclusão: a adição do etanol na formulação do AM não promoveu benefícios na perda óssea ou nos parâmetros imunoinflamatórios dos ratos com periodontite, quando comparado ao grupo RAR ou TFDa/água, não justificando seu uso como método coadjuvante à raspagem e alisamento radicular, considerando os parâmetros avaliados neste estudo.

Introdução

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória, resultante da interação entre um biofilme periodontopatogênico e um hospedeiro suscetível (Page & Kornman 1997). A reação imuno-inflamatória desta interação causa perda de inserção do tecido conjuntivo e perda óssea alveolar (Socransky & Haffajee 1992).

O sistema RANK-RANKL-OPG é um dos maiores reguladores locais do metabolismo ósseo. O RANKL (proteína ligante do receptor ativador nuclear kappa β) liga-se diretamente ao RANK (receptor) na superfície de células precursoras de osteoclastos, promovendo a maturação osteoclástica, assim como a ativação e inibição da apoptose de osteoclastos maduros. Esta ligação pode ser prevenida pela OPG (osteoprotegerina), inibindo a ativação osteoclástica e controlando a reabsorção óssea (Cochran 2008, Leibbrandt & Penninger 2008, Takayanagi 2005). A razão RANKL-OPG é a maior responsável pela regulação da atividade osteoclástica, e pode ser avaliada pela atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) (Belibasakis & Bostanci 2012).

O tratamento padrão-ouro das periodontites consiste no procedimento de raspagem e alisamento radicular (RAR) (Cobb 2002), que tem por objetivo desorganizar o biofilme subgingival, remover depósitos mineralizados e obter uma superfície radicular biocompatível para a cicatrização tecidual. Em algumas situações clínicas esta modalidade de tratamento pode não ser completamente efetiva. Fatores como Diabetes Mellitus (Tervonen & Oliver 1993), tabagismo (Bergström; Eliasson; Dock 2000), características anatômicas do sítio como furcas e áreas de concavidades radiculares (Wenström; Dahlén; Ramberg 2011), assim como periodontites agressivas (Arweiler et al. 2014), podem resultar em menor efetividade do tratamento.

Neste contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) têm sido proposta como coadjuvante ao tratamento mecânico das periodontites (Wood et al. 1999). Modelos experimentais de periodontite têm demonstrado redução na área de perda óssea na região de furca, redução da marcação para RANKL, aumento da marcação para OPG, e redução no número de células positivas para TRAP em animais tratados com a associação RAR e TFDa quando comparados àqueles tratados apenas com RAR (Garcia et al. 2013; Garcia et al. 2012).

Ensaio clínicos randomizados compararam RAR e RAR associada com TFDa (Alwaeli; Al-Khateeb; Al-Sadi 2013, Arweiler et al. 2013; 2014, Betsy et al. 2014, Braun et al. 2008, Carvalho et al. 2014, Luchesi et al. 2013; Moreira et al. 2015, Pourabbas et al. 2014, Queiroz et al. 2013), obtendo resultados divergentes. Revisões sistemáticas apontam para resultados estatisticamente significantes a favor da terapia combinada, porém clinicamente irrelevantes (Sgolastra et al. 2013a; 2013b, Vohra et al. 2015).

Alternativas para melhorar a efetividade da TFDa vêm sendo estudadas, como diferentes fotossensibilizadores (Usacheva; Teichert; Biel 2003), alterações nas formulações (George & Kishen 2007), adição de carreadores de oxigênio (George & Kishen 2008), e adição de inibidores de proteínas bacterianas associadas com sua resistência à penetração dos fotossensibilizadores (Kishen et al. 2010; Kvist et al. 2008). Essas estratégias, apesar dos resultados promissores *in vitro*, ainda não foram testadas em modelos de indução de periodontite em animais.

A adição de etanol na formulação do AM pode modificar a meia-vida do oxigênio singlete gerado durante a reação fotodinâmica, sendo consideravelmente maior em etanol (20 μ s) do que em água (4 μ s) (Meisel & Koecher 2005). Além disso, a presença de etanol mantém o AM na sua forma monomérica, aumentando sua capacidade de trocas energéticas com o oxigênio molecular aumentando a produção de oxigênio singlete (Severino et al. 2003, George & Kishen 2007). Estas alterações nas propriedades fotofísicas e fotoquímicas do AM quando diluído em etanol tem resultado *in vitro* em maior efeito antimicrobiano (George & Kishen 2007).

Assim, o objetivo deste estudo foi comparar o efeito da TFDa utilizando AM diluído em água ou etanol 20% como coadjuvantes a RAR sobre a perda óssea alveolar e presença de osteoclastos imunomarcados para TRAP no tratamento da periodontite induzida em ratos. a hipótese de pesquisa considerou que menor perda óssea e menor expressão de osteoclastos TRAP-positivos seriam verificados nos animais submetidos à RAR e TFDa usando etanol na formulação quando comparados aos animais submetidos apenas a RAR ou à associação de RAR e TFDa usando água como solvente.

Materiais e Métodos

Animais

Este estudo foi conduzido em 40 ratos machos da linhagem *Wistar*, com 3 meses de idade e massa corporal de 250-300 g. Os animais foram mantidos em sala climatizada, alojados em gaiolas de polipropileno, com acesso a água potável e ração *ad libitum*. Cada caixa continha cinco animais. O período de adaptação dos animais ao biotério foi de 15 dias. Todos os protocolos descritos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (027/2013). Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as normas estabelecidas pelo *Guidelines for Ethical Care of Experimental Animals*, aprovadas pelo *International Animal Care and Use Committee*.

Cálculo Amostral

Utilizando o *software* PS Power and Sample Size Calculations (v. 3.0.43), o tamanho da amostra foi calculado. Considerando ser relevante uma diferença média de 0,40 mm² na área de perda óssea na região da furca entre animais tratados com raspagem e alisamento radicular versus TFDa e desvio padrão de 0,30 (GARCIA et al. 2013), poder de 90% e nível de significância de 5%, nove animais por grupo foram necessários. Devido as possíveis perdas que poderiam ocorrer decorrentes dos procedimentos experimentais, 10 animais por grupo de tratamento (3 modalidades terapêuticas) foram utilizados. Nos dois grupos controle, 5 animais por período foram utilizados.

Protocolo experimental

Para todos os procedimentos, os ratos foram submetidos a um protocolo de analgesia, com administração de cloridrato de tramadol (Tramal[®], ampola de 2mL, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu Guaçu, SP, Brasil), dose de 20 mg/Kg via intramuscular (Rashidpour et al. 2012). Decorridos 15 minutos de

analgesia, os animais foram anestesiados com administração intramuscular de Cetamina 10% (Cetamin, Syntec do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil), na dosagem de 70 mg/Kg associada a 6 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin, Syntec do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil) (Garcia et al. 2012).

Os grupos experimentais estão apresentados na Tabela 1.

Os ratos foram numerados de 1 a 40. Cinco ratos foram aleatoriamente selecionados para compor o grupo controle negativo (ausência de periodontite).

Nos demais 35 ratos, o primeiro molar inferior direito recebeu uma ligadura de algodão (Ethicon 4-0, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) em posição subgingival a fim de induzir doença periodontal. Após 7 dias (Garcia et al. 2013), a ligadura foi removida e os animais foram randomizados em 3 grupos de tratamento (RAR/salina, TFDa/água, TFDa/etanol) e 1 grupo sem tratamento (controle positivo). A sequência de randomização foi gerada no programa Random Allocation Softwar (version 1.0, May 2004). A implementação da randomização foi realizada por um pesquisador (R.M.M) não envolvido na execução dos tratamentos ou análise de dados.

O tratamento foi executado por único operador (D.A.M.D). Somente após realizar os procedimentos de raspagem e alisamento radicular, a seringa com solução salina, ou formulação de AM contendo água e etanol foi entregue pelo pesquisador responsável pela randomização (R.M.M) ao operador para a aplicação no sítio periodontal. O operador foi cego para os grupos TFDa/água e TFDa/etanol.

O tratamento periodontal foi realizado por meio de raspagem e alisamento radicular (RAR), utilizando-se curetas Gracey Mini-Five 1-2 (Hu-Friedy, Chigaco, IL, EUA). Dez movimentos de tração disto-mesial foram realizados nas faces vestibular e lingual. A furca e a área interproximal foram instrumentadas por meio de movimentos de tração cervico-oclusal (Garcia et al. 2012b).

Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

Para realização da TFDa, o fotossensibilizador azul de metileno (AM) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), forma molecular $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$ e massa molecular $373,90 \text{ g.mol}^{-1}$ foi utilizado.

O AM na concentração de 250 μM (0,01%) foi dissolvido em solução aquosa (água ultrapura Milli-Q) – Grupo TFDa/água; ou em uma mistura de água ultrapura Milli-Q, carboximetilcelulose, e etanol (77:3:20) – Grupo TFDa/etanol.

A solução do fotossensibilizador foi lentamente aplicada com seringa (1 mL) e agulha de insulina (BD Ultrafine™, U-100, 0,5ml, 8mmX0.3mm). Decorrido 1 minuto, laser de baixa potência InGaAlp (TheraLase – DMC Equipments, 0.0283 cm^2 , São Carlos, SP, Brasil), comprimento de onda 660nm, modo de emissão contínua, potência útil do emissor de 30mW, foi aplicado em três pontos equidistantes nas faces vestibular e lingual por 4 segundos (0.14J/ponto). Cada ponto de aplicação recebeu uma energia de 0.84J e uma dose de 4.94 J/cm^2 . O dente recebeu uma dose de energia de 29,64 J/cm^2 (Garcia et al. 2013).

Períodos experimentais

Sete dias após a realização dos tratamentos, os animais foram eutanasiados.

Decorridos 15 minutos de analgesia, os animais foram anestesiados com isoflurano (Isoflurano, BioChimico, Itatiaia, RJ, Brasil), e a eutanásia ocorreu através da exsanguinação por punção intracardíaca (Carregaro et al. 2005; Rivera 2010).

A hemi-mandíbula de cada animal foi seccionada e colocada individualmente em frascos contendo 50 ml de formaldeído a 10% tamponado com tampão fosfato (pH 7,2) por 48 horas (Garcia et al. 2012).

Procedimentos Laboratoriais

As mandíbulas foram desmineralizadas em solução de EDTA (Química Moderna Ind. e Com. LTDA, São Paulo, SP, Brasil) a 10% tamponado com hidróxido de sódio (pH 7,4) (Química Moderna Ind. e Com. LTDA, São Paulo, SP, Brasil) por 8 semanas (Garcia et al. 2012). As amostras foram fixadas, diafanizadas, clarificadas e parafinizadas no processador de tecidos (PT-05, Lupetec® tecnologia aplicada, Lupe Indústria Tecnológica de Equipamentos para Laboratório LTDA, São Carlos, SP, Brasil). A seguir, as amostras foram incluídas em parafina e secções de 3 μm foram obtidas no sentido mesio-distal. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E) (Figura 2) para a análise da perda óssea na região de furca.

Para a reação imuno-histoquímica, os cortes histológicos de 3µm em lâminas silanizadas foram submetidos à desparafinização em xilol e reidratação com diferentes concentrações de álcool etílico. Na recuperação antigênica, as lâminas foram colocadas em recipiente com 500 ml de Tris-EDTA (pH 9.0). A seguir, o recipiente foi levado ao microondas por 4,5 minutos, sem chegar ao ponto de ebulição, sendo posteriormente resfriado por aproximadamente 40 minutos. As lâminas foram lavadas novamente por 5 minutos em água corrente e 1 minuto em água destilada.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes passaram por um banho de 10 minutos com solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes a 3%, enquanto que o bloqueio das proteínas foi feito através de bloqueador de proteína (Easy Path, São Paulo, SP, Brasil). Este reagente foi gotejado nos cortes, segundo orientação do fabricante por 10 minutos.

As lâminas foram retiradas do PBST e o anticorpo primário anti-TRAP (1:100, Garcia et al. 2013) proporcionado com um diluente de anticorpos universal (Easy Path, São Paulo, SP, Brasil), incubado por 1 hora em câmara úmida à temperatura de 37°C em estufa.

A amplificação com o polímero anti- IgG de cabra próprio para tecido de rato (N-Histofine, Nichirei Biosciences, Japan) foi feita seguindo as orientações do fabricante (pingou-se quantidade suficiente para cobrir o corte, e incubou-se por 30 min a 25°C). A reação foi revelada usando o líquido DAB (Easy Path, São Paulo, SP, Brasil), que foi aplicado sobre os cortes e deixado no escuro por 5 minutos. A reação foi parada em água.

As lâminas foram, então, contracoradas com Hematoxilina de Harris. Os controles negativos passaram por todas as etapas da reação, mas sem o uso do anticorpo primário no corte (apenas diluente universal).

Análise Histométrica

A perda óssea na região de furca (mm) foi avaliada com uma ampliação de 50x (objetiva de 5x, zoom óptico de 10x) (Garcia et al. 2011) e determinada histometricamente utilizando um sistema de análise de imagens (Axiovision, Carl Zeiss MicroImagnig, Jena, Alemanha). Duas secções seriadas de cada bloco na região da entrada de furca foram selecionadas. As imagens foram capturadas com

câmera digital acoplada ao microscópio de luz (AxioStar PluSS, Carl Zeiss) e visualizadas com o auxílio de um computador com processador Pentium 4, com 3.00 GHz, 512Mb de memória RAM - Sistema Operacional Microsoft Windows XP - Monitor LG modelo FLATRONezT710SH, 64M, 17 polegadas colorido, associado a um microscópio óptico binocular OLYMPUS, modelo BX51/BX52, com câmara de vídeo OLYMPUS, modelo OLY-200 acoplada.

A perda óssea na região de furca foi estabelecida traçando-se uma linha vertical na imagem capturada (Herrera et al. 2015, Yang et al. 2015), com início no teto da furca, em sua porção mais coronária, até o limite mais coronário no topo da crista óssea (Figura 1). Um examinador cego para os grupos experimentais selecionou as lâminas (C.B.C.) e um examinador cego e calibrado (S.M.R.) realizou as mensurações.

Análise imuno-histoquímica para fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP)

Osteoclastos maduros apresentando três ou mais núcleos foram considerados células positivas para TRAP (Hassumi et al., 2009). Essas células foram avaliadas e contadas no tecido ósseo na região da furca, sob aumento de 400x. O limite coronário dessa área foi a crista óssea na furca, expandindo-se até a porção mais apical na altura radicular (Figura 2) (Garcia et al. 2013). Análise quantitativa foi realizada em duas lâminas de cada animal, sendo um corte na porção vestibular da entrada da furca, e outro na porção central do dente.

Um examinador cego para os grupos experimentais selecionou as lâminas (S.M.R.) e um examinador cego e calibrado (C.B.C.) realizou as mensurações.

Calibragem intraexaminador

A perda óssea foi avaliada por um examinador (S.M.R). Células imuno-marcadas para TRAP foram quantificadas por outro examinador (C.B.C). Calibragem intra-examinador foi realizada para cada desfecho em 10 lâminas com intervalo de uma semana. O coeficiente de correlação intra-classe foi de 0,85 e 0,90 para perda óssea e células imuno-marcadas, respectivamente.

Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada com os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os dados de perda óssea na região da furca e número de células positivas para TRAP estão apresentados como média, desvio padrão e intervalos de confiança (95%).

Diferenças inter-grupo para perda óssea na região da furca e para células positivas para TRAP foram testadas por *One-way* ANOVA seguida por *Post-hoc* Bonferroni.

O nível de significância foi de 5%. O programa SPSS software, v.13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) foi utilizado para as análises.

Resultados parciais

A Figura 3 apresenta o fluxograma do experimento. Três ratos foram perdidos após o procedimento de anestesia prévio a instalação da ligadura.

Análise histopatológica

No grupo controle positivo (Figura 4B) o tecido conjuntivo da região da furca apresentou intenso infiltrado inflamatório. Nos grupos RAR/salina, TFDa/água e TFDa/etanol, as características histopatológicas foram similares ao grupo controle negativo (Figuras 4A, C, D e E). O infiltrado inflamatório foi leve ou ausente. O tecido conjuntivo apresentou considerável número de fibroblastos e vasos sanguíneos, entrelaçados com uma delicada rede de fibras colágenas.

O tecido ósseo na região interradicular (crista óssea) dos grupos RAR/salina e TFDa/água mostrou-se composto de osso trabecular com o contorno externo irregular (Figuras 4C, D), em função da presença de lacunas de reabsorção com osteoclastos maduros (Fig. 4C, 4D, 5C, 5D). No grupo TFDa/etanol, este contorno externo apresentou-se menos irregular, com menor presença de osteoclastos maduros (Figura 4E, 5E).

Análise histométrica

Os dados de perda óssea estão apresentados na Tabela 2. O grupo controle positivo apresentou perda óssea estatisticamente maior do que os demais grupos. Nenhuma diferença estatística foi verificada entre as modalidades de tratamento. Todos os tratamentos resultaram em perda óssea estatisticamente semelhante ao grupo controle negativo.

Análise imuno-histoquímica

Os resultados para a imuno-marcação do anticorpo TRAP estão apresentados na Tabela 2. Número estatisticamente maior de osteoclastos maduros (TRAP positivo) foi detectado no controle positivo em comparação aos demais grupos (Figura 5). Apesar do grupo TFDa/etanol ter apresentado o menor valor médio de

osteoclastos maduros ($2,30 \pm 1,25$), esta diferença não foi estatisticamente significativa quando comparada aos demais grupos de tratamento (RAR/salina: $3,91 \pm 1,75$; TFDa/água: $4,33 \pm 2,03$). Os grupos de tratamento não apresentaram diferença estatística em comparação ao grupo controle negativo.

Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do etanol em uma formulação de azul de metileno utilizada para terapia fotodinâmica antimicrobiana, como coadjuvante à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite experimental em ratos. Os resultados obtidos demonstraram que a inclusão do etanol 20% na formulação não trouxe benefícios em relação a perda óssea ou presença de osteoclastos TRAP positivos quando comparada a formulação com água, refutando a hipótese inicial. Além disso, os resultados demonstraram que a terapia fotodinâmica antimicrobiana, independente da formulação, foi semelhante à raspagem e alisamento radicular, ratificando esta modalidade como padrão-ouro para o tratamento das periodontites.

O modelo de periodontite experimental (manutenção de ligadura por 7 dias) utilizado neste estudo vem sendo utilizado para avaliar o efeito da TFDa, como coadjuvante à raspagem e alisamento radicular em ratos sistemicamente normais (Almeida et al., 2008, Carvalho et al., 2011, Garcia et al., 2012, Garcia et al., 2013, Theodoro et al. 2015), com diabetes (Almeida et al. 2008b), imunossuprimidos por dexametasona (Fernandes et al. 2010), imunossuprimidos por tracolimus (Bottura et al. 2011), submetidos a nicotina (Garcia et al. 2011), e em animais ovariectomizados (Garcia et al. 2013b).

No presente estudo, o tempo de ligadura de 7 dias foi suficiente para observar perda óssea significativa em ratos sistemicamente normais. Isso pode ser observado na comparação entre os grupos controle negativo (ausência de doença) e controle positivo, no qual a periodontite foi induzida e não tratada. Esses achados ratificam estudos prévios (Chang et al. 2012, De Molon et al. 2014). Chang e colaboradores, em 2012, induziram periodontite em ratos sistemicamente normais pela colocação e manutenção de ligadura em diferentes períodos: 7, 14 e 21 dias. Significante perda óssea ocorreu em 7 dias, aumentando até 14 dias, a partir do qual manutenção do nível ósseo foi verificada.

Ainda, no grupo controle positivo deste estudo, a periodontite foi induzida por 7 dias e a ligadura foi removida. A remoção da ligadura não resultou no reparo ósseo nos 7 dias subsequentes, considerando que o grupo controle positivo apresentou significativamente maior perda óssea do que todos os demais grupos

nesse período. Isso significa que o processo etiopatogênico da doença foi estabelecido e mantido, mesmo removendo-se o agente retentivo de biofilme (ligadura). O rato tem, reconhecidamente, um metabolismo veloz quando comparado ao homem, e um auto-reparo poderia ter ocorrido com a remoção da ligadura. Portanto, considerando que: 1. os grupos de tratamento apresentaram perda óssea semelhante ao grupo controle negativo; 2. e que a remoção da ligadura não resultou em completo reparo do tecido ósseo; pode-se concluir que o reparo ósseo observado nos grupos de tratamento ocorreu pela efetividade dos tratamentos.

Vários estudos que testaram a TFDa como coadjuvante à raspagem e alisamento radicular em modelo de periodontite em ratos observaram menor perda óssea associada a esta terapia quando comparada ao tratamento mecânico somente (Carvalho et al. 2011, Fernandes et al. 2010, Garcia et al. 2012, Garcia et al. 2013, Theodoro et al. 2015). No presente estudo, nenhuma diferença foi verificada entre os tratamentos testados, o que parece convergir para os resultados dos estudos clínicos, que falham em demonstrar benefícios para o uso da TFDa em pacientes com periodontite crônica (Balata et al. 2013, Bassir et al. 2013, Christodoulides et al. 2008, Luchesi et al. 2013, Pourabbas et al. 2014, Queiroz et al. 2014, Theodoro et al. 2012) ou durante a manutenção periodontal (Carvalho et al. 2015, Chondros et al. 2009, Rühling et al. 2010), assim como, tem sido apontado em revisões sistemáticas (Azarpazhooh et al. 2010, Sgolastra et al. 2013).

Nossos resultados demonstraram menores valores médios de perda óssea e células TRAP-positivas no grupo TFDa/etanol, mas sem diferença estatística quando comparado aos demais tratamentos. Embora, *in vitro*, a adição de etanol na formulação de azul de metileno resulte em maior produção de oxigênio singlete e maior efeito antimicrobiano sobre biofilmes, quando comparada à formulação contendo apenas água (George & Kishen 2007), isso não foi reproduzido clinicamente no modelo de periodontite em ratos. Assim, a falha da TFDa *in vivo* pode estar associada: 1. à dificuldade do Fs alcançar o biofilme em toda sua extensão (Stewart, 1998); 2. à concentração do Fs que interage com a parede celular bacteriana; 3. à ação de proteínas da parede celular “*efflux pump*” (Foley & Gilbert 1996, Kishen et al. 2010; Kourtesi et al. 2013); 4. à disponibilidade de oxigênio no meio (George & Kishen 2008).

Uma das limitações deste estudo consiste no curto tempo de cicatrização em que os desfechos foram avaliados (7 dias). Em geral, os estudos de tratamento da

periodontite em ratos apresentam resultados de 7, 15 e 30 dias após a remoção da ligadura e aplicação das terapias (Almeida et al. 2008a, 2008b, Fernandes et al. 2010, Garcia et al. 2011, Garcia et al. 2013, Theodoro et al. 2015). Nestes estudos, diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos são encontradas nos períodos de 7 e 15 dias. Em 30 dias, há uma tendência de igualdade entre os grupos de tratamento, devido ao rápido metabolismo do rato (Chang et al. 2013, de Molon et al. 2014). No presente estudo, observou-se em 7 dias que os grupos de tratamento apresentaram perda óssea estatisticamente semelhante entre si e quando comparados ao grupo sem periodontite. Isto significa que em 7 dias os tratamentos foram efetivos em reduzir a perda óssea e que provavelmente esse resultado se manteria em maiores tempos de observação.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o uso do etanol na formulação do AM não trouxe benefícios com relação à perda óssea e atividade osteoclástica, quando comparado ao uso de água na formulação ou quando somente o tratamento mecânico foi utilizado. Portanto, os resultados apresentados ratificam a raspagem e alisamento radicular como a modalidade padrão-ouro para o tratamento das periodontites, nas condições deste experimento.

Referências

Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J. H., Oshiiwa, M., Garcia, V. G. (2008a) In Vivo Effect of Photodynamic Therapy on Periodontal Bone Loss in Dental Furcations. *Journal of Periodontology* **79**, 1081-1088.

Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J. H., Oshiiwa, M., Garcia, V. G. (2008b) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *Journal of Periodontology* **79**, 2156-2165.

Alwaeli, H. A., Al-Khateebi, S. N., Al-Sadi, A. (2013) Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Lasers in Medical Science* **30**, 801-807.

Arweiler, N. B., Pietruska, M., Pietruski, A. S., Dolinska, E., Heumann, C., Ausschill, T. M., Sculean, A. (2014) Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. *Clinical Oral Investigations* **18**, 2129-35.

Azarpazhooh, A., Shah, P. S., Tenenbaum, H. C., Goldberg, M. B. (2010) The Effect of Photodynamic Therapy for Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Periodontology* **81**, 4-14.

Ballata, M. L., Andrade, L. P., Santos, D. B. N., Cavalcanti, A. N., Tunes, U. R., Ribeiro, E. D. P., Bittencourt, S. (2013) Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Applied Oral Science* **21**, 208-214.

Bassir, S. H., Moslemi, N., Jamali, R., Mashmouly, S., Fekrazad, R., Chiniforush, N., Shamshiri, A.R., Nowzari, H. (2013) Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **40**, 65–72.

Belibasakis, G. N., Bostanci, N. (2012) The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 239–248.

Bergström, J., Eliasson, S., Dock, J. (2000) A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *Journal of Periodontology* **71**, 1338-47.

Betsy, J., Prasanth, C. S., Baiju, K. V., Prasanthila, J., Subhash, N. (2014) Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **41**, 573–581.

Bottura, P. E., Milanezi, J., Fernandes, L. A., Caldas, H. C., Abbud-Filho, M., Garcia, V. G., Baptista, M. A. S. F. (2011) Nonsurgical Periodontal Therapy combined with Laser and Photodynamic Therapies for Periodontal Disease in Immunosuppressed Rats. *Transplantation Proceedings* **43**, 2009-2016.

Braun, A., Dehn, C., Krause, F., Jepsen, S. (2008) Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 877–884.

Carregaro, A. B., Castro, M. B., Martins, F. S. (2005) Estudo da ação inflamatória aguda do tiopental intraperitoneal em ratos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* **57**, 191-5.

Carvalho, A. S., Napimoga, M. H., Coelho-Campos, J., Silva-Filho, V. J., Thedei, G. (2011) Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomedicine and Laser Surgery* **29**, 735-740.

Carvalho, V. F., Andrade, P. V. C., Rodrigues, M. F., Hirata, M. H., Hirata, R. D. C., Pannuti, C. M., De Micheli, G., Conde, M. C.. (2015) Antimicrobial photodynamic effect to treat residual pockets in periodontal patients: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **42**, 440–447.

Chang, P. C., Chien, L. Y., Yeo, J. F., Wang, Y., Chung, M., Chong, L. Y., Kuo, M. Y., Chen, C., Chiang, H., Ng, B. N., Lee, Q. Q., Phay, Y. K., Ng, J. R., Erk, K. Y. (2013) Progression of Periodontal Destruction and the Roles of Advanced Glycation End Products in Experimental Diabetes. *Journal of Periodontology* **84**, 379-388.

Chondros, P. (2009) Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers in Medical Science* **24**, 681–688.

Christodoulides, N., Nikolidakis, D., Chondros, P., Becker, J., Schwarz, F., Rössler, R., Sculean, A. (2008) Photodynamic Therapy as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Treatment: A Randomized, Controlled Clinical Trial. *Journal of Periodontology* **79**, 1638-1644.

Cobb, C. M. (1996) Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann Periodontology* **1**, 443-490.

Cochran, D. L. (2008) Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology* **79**, 1569-1576.

De Molon, R. C., de Avila, E. D., Nogueira, A. V. B., de Souza, J. A. C., Avila-Campos, M. J., de Andrade, C. R., Cirelli, J. A. (2014) Evaluation of the Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice. *Journal of Periodontology* **85**, 465-477.

Fernandes, L. A., Martins, T. M., Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Garcia, V. G. (2010) Radiographic assesment of photodynamic therapy as na adjunctive treatment on induced periodontitis in immunosuppressed rats. *Journal of Applied Oral Science* **18**, 237-243.

Foley, I. & Gilbert, P. (1996) Antibiotic resistance of biofilms. *Biofouling* **10**, 331–346.

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

Garcia, V. G., Junior, E. C. G., Fernandes, L. A., Bosco, A. F., Nagata, M. J. H., Casatti, C. A., Ervolino, E., Theodoro, L. H. (2012a) Adjunctive Antimicrobial Photodynamic Treatment of Experimentally Induced Periodontitis in Ovariectomized Rats. *Journal of Periodontology* **84**, 556-565.

Garcia, V. G., Longo, M., Fernandes, L. A., Junior, E. C. G., Santinoni, C. S., Bosco, A. F., Nagata, M. J. H., Theodoro, L. H. (2012b) Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers and Medical Science* **28**, 143-150.

Garcia, V. G., Longo, M., Junior, E. C. G., Bosco, A. F., Nagata, M. J. H., Ervolino, E., Theodoro, L. H. (2013) Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research* **49**, 584-594.

George, S. & Kishen, A. (2008) Augmenting Antibiofilm Efficacy of LAD with Emulsified Oxidizer and Oxygen Carrier. *Journal of Oral Endodontics* **34**, 1119-1123.

George, S. & Kishen, A. (2007) Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *Journal of Biomedical Optics* **12**, 29-34.

Herrera, B. S., Coimbra, L. S., Silva, A. R., Teixeira, S. A., Costa, S. K. P., Wallace, J. L., Spolidorio, L. C., Muscara, M. N. The H₂S-releasing naproxen derivative, ATB-346, inhibits alveolar bone loss and inflammation in rats with ligature-induced periodontitis. *Medical Gas Research* (2015) 5:4 DOI 10.1186/s13618-015-0025-3

Johnson, I. H. (1975) Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research* **10**, 332-345.

Kim, Y. D., Kim, S. S., Hwang, D., Kim, S., Kwon, Y., Shin, S., Kim, U., Kim, J., Chung, I. K. (2007) Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers in Surgery and Medicine* **39**, 441–450.

Kishen, A. et al. Upadya, M., Tegos, G. P., Hamblin, M. R. (2010) Efflux Pump Inhibitor Potentiates Antimicrobial Photodynamic Inactivation of *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Photochemical and Photobiology* **86**, 1343–1349.

Kourtesi, C., Ball, A. R., Huang, Y., Jachak, S. M., D. Vera, M. A., Khondkar, P., Gibbons, S., Hamblin, M. R., Tegos, G. P. (2013) Microbial Efflux Systems and Inhibitors: Approaches to Drug Discovery and the Challenge of Clinical Implementation. *The Open Microbiology Journal* **7**, (Suppl 1-M3) 34-52.

Kvist, M., Hancock, V., Klemm, P. (2008) Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology* **74**, 7376-82.

Leibbrandt, A.; Penninger, J. M. (2008) RANK/RANKL: Regulators of Immune Responses and Bone Physiology. *Ann New York Academy of Science* **1143**, 123–150.

Luchesi, V. H., Pimentel, S. P., Kolbe, M. F., Ribeiro, F. V., Casarin, R. C., Nociti, F. H., Sallum, E. A., Casati, M. Z. (2013) Photodynamic therapy in the treatment of class II furcation: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **40**, 781–788.

Moreira, A. L., Novaes Jr., A. B., Grisi, M. F., Taba Jr., M., Souza, S. L., Palioto, D. B., de Oliveira, P. G., Casati, M. Z., Casarin, R. C., Messoria, M. R. (2015) Antimicrobial Photodynamic Therapy as an Adjunct to Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: A Split-Mouth Randomized Controlled Trial. *Journal of Periodontology* **86**, 376-386.

Page, R. C., Kornman, K. S. (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000* **14**, 9-11

Pourabbass, R., Kashefimehr, A., Rahmanpour, N., Babaloo, Z., Kishen, A., Tenenbaum, H. C., Azarpazhooh, A. (2014) Effects of Photodynamic Therapy on Clinical and Gingival Crevicular Fluid Inflammatory Biomarkers in Chronic Periodontitis: A Split-Mouth Randomized Clinical Trial. *Journal of Periodontology* **85**, 1222-1229.

Queiroz, A. C., Suaid, F. A., de Andrade, P. F., Oliveira, F. S., Novaes Jr., A. B., Taba Jr., M., Palioto, D. B., Grisi, M. F. M., Souza, S. L. S. (2013) Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. *Lasers and Medical Science* **30**, 617-625.

Queiroz, A. C., Suaid, F. A., de Andrade, P. F., Novaes Jr., A. B. Taba Jr., M., Palioto, D. B., Grisi, M. F. M., Souza, S. L. S. (2014) Antimicrobial photodynamic therapy associated to nonsurgical periodontal treatment in smokers: Microbiological results *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **141**, 170–175.

Rashidpour, M. et al. (2012) Effect of Tramadol (μ -opioid receptor agonist) on orthodontic tooth movements in a rat model. *Journal of Dentistry* **9**, 83-89.

Rivera, E. A. B. (2010) Analgesia, anestesia e eutanásia em roedores, lagomorfos, cães e suínos. In: Feijó AGS, Braga LMGM, Pitrez PMC (Organizadores). Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos. Porto Alegre: ediPUCRS, p.198-216.

Rühling, A., Fanghänel, J., Houshmand, M., Kuhr, A., Meisel, P., Schwahn, C., Kocher, T. (2010) Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients—a clinical study. *Clinical and Oral Investigations* **14**, 637–644.

Severino, D. et al. (2003) Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. *Photochemical and Photobiology* **77**, 459-468.

Sgolastra, F., Petrucci, A., Severino, M., Gatto, G. F., Monaco, A. (2013a). Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology* **40**, 514–526.

Sgolastra, F., Severino, M., Gatto, R., Monaco, A. (2013b) Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers in Medical Science* **28**, 669-682.

Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1992) The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. *Journal of Periodontology* **63**, 322-331.

Stewart, P. S. (1998) A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnology Bioengineering* **59**, 261-72. Review.

Takayanagi, H. (2005) Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *Journal of Periodontal Research* **40**, 287–293.

Tervonen, T.& Oliver, R. C. (1993) Long-term control of diabetes mellitus and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **20**, 431-435.

Theodoro, L. H., Caiado, R. C., Longo, M., Novaes, V. C. N., Zanini, N. A., Ervolino, E., de Almeida, J. M., Garcia, V. G. (2015) Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. *Lasers in Medical Science* **30**, 1209–1218.

Theodoro, L. H., Silva, S. P., Pires, J. R., Soares, G. H. G., Pontes, A. E. F., Zuza, E. P., Spolidório, D. M. P., de Toledo, B. E. C., Garcia, V. G. (2012) Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers in Medical Science* **27**, 687–693.

Usacheva, M. N.; Teichert, M. C.; Biel, M. A. (2001) Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Efficacy Against Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms. *Lasers and Surgical Medicine* **29**, 165-173.

Wennström, J. L., Dahlén, G., Ramberg, P. (2011) Subgingival debridement of periodontal pockets by air polishing in comparison with ultrasonic instrumentation during maintenance therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 820-827.

Wood, S., Nattress, B., Kirkham, J., Shore, R., Brookes, S., Griffiths, J., Robinson, C.. (1999) An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *Journal of Photochemical and Photobiology B.* **50**, 1-7.

Yang, X.; Zhang, H.; Wang, J.; et al. (2015) Puerarin decreases bone loss and collagen destruction in rats with ligature-induced periodontitis. *Journal of Periodontal Research* doi: 10.1111/jre.12261.

Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais.

Grupo experimental	Descrição	Amostra
CN	Controle negativo. Ratos sem periodontite.	n=5
CP	Controle positivo. Ratos com periodontite e sem tratamento.	n=5
RAR/salina	Ratos com periodontite, tratados com RAR, seguido de irrigação da bolsa com solução salina.	n=10
TFDa/água	Ratos com periodontite, tratados com RAR seguida de TFDa, com AM diluído em água, em concentração de 0,01%.	n=10
TFDa/etanol	Ratos com periodontite, tratados com RAR seguida de TFDa, com AM diluído em etanol a 20%, em concentração de 0,01%.	n=10

RAR: raspagem e alisamento radicular; TFDa: terapia fotodinâmica antimicrobiana; AM: azul de metileno.

Tabela 2. Média, desvio padrão e intervalos de confiança (95%) dos dados referentes à perda óssea e número de células positivas para o anticorpo TRAP na região de furca do primeiro molar inferior direito para cada grupo experimental.

Grupos	Perda óssea na região de furca (mm)	TRAP
CN (n=5)	0,16 (0,14) ^a IC (0,00 – 0,35)	1,80 (1,30) ^a IC (0,18 – 3,41)
CP (n=5)	0,56 (0,22) ^b IC (0,28 – 0,83)	10,80 (7,04) ^b IC (2,04 – 19,55)
RAR/salina (n=8)	0,29 (0,13) ^a IC (0,18 – 0,40)	3,91 (1,75) ^a IC (2,44 – 5,38)
TFDa/água (n=9)	0,22 (0,47) ^a IC (0,18 – 0,26)	4,33 (2,03) ^a IC (2,77 – 5,89)
TFDa/etanol (n=10)	0,20 (0,53) ^a IC (0,16 – 0,23)	2,30 (1,25) ^a IC (1,40 – 3,19)

CN: controle negativo; CP: controle positivo; RAR/salina: raspagem e alisamento radicular; TFDa/água: raspagem e alisamento radicular e terapia fotodinâmica antimicrobiana com azul de metileno diluído em água; TFDa/etanol: raspagem e alisamento radicular e terapia fotodinâmica antimicrobiana com azul de metileno diluído em etanol.

One-way ANOVA e teste de Bonferroni. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre grupos ($P < 0,05$).

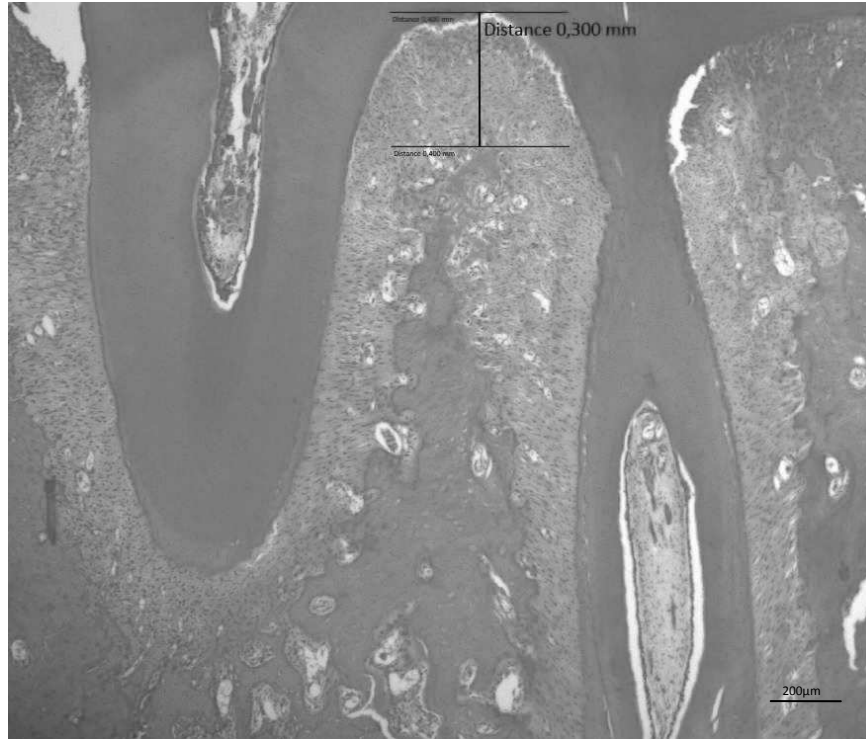


Figura 1. Imagem representativa da análise histométrica para a perda óssea alveolar na região de furca. A linha vertical indica a distância da porção mais coronária da região de furca à porção mais coronária da crista óssea. Aumento original de 5x.

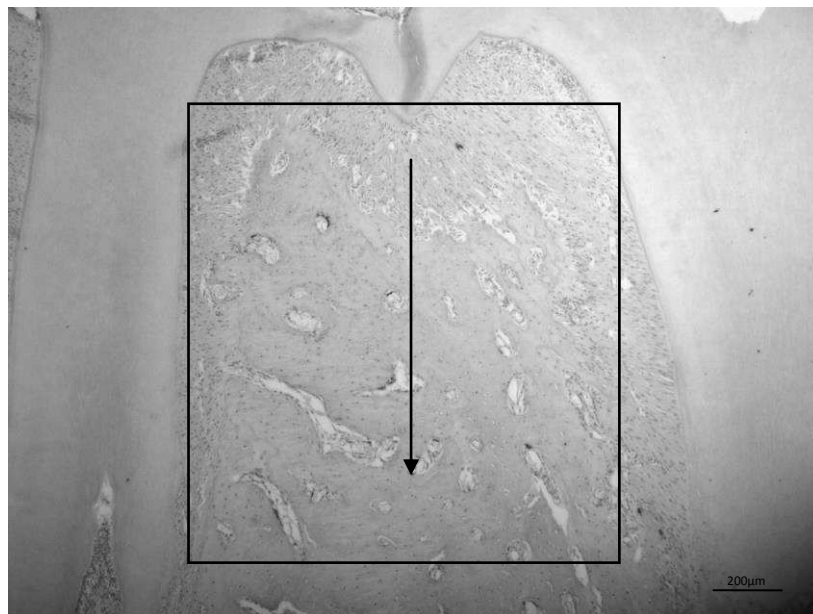


Figura 2. Representação esquemática da região em que foi realizada a análise imuno-histoquímica para TRAP. O quadro desenhado delimita a região da crista óssea, expandindo-se a avaliação apicalmente (seta indicando a direção apical). Aumento original de 5x.

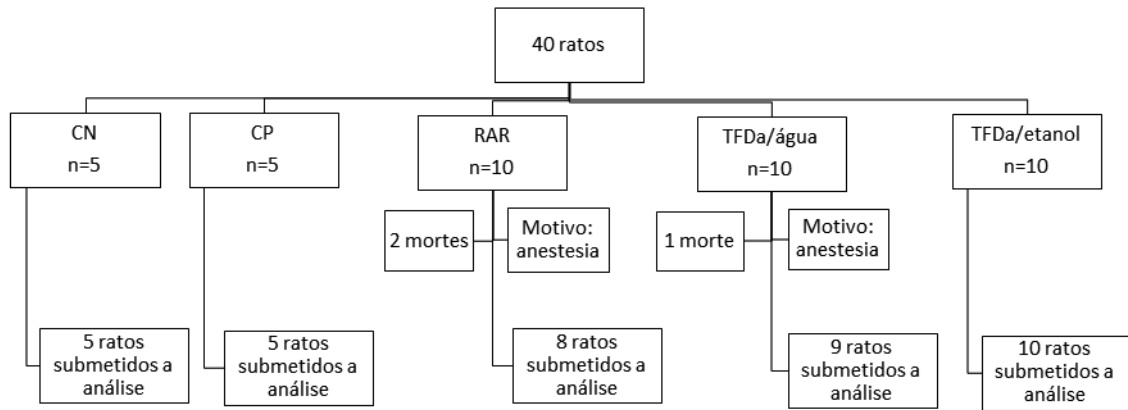


Figura 3. Fluxograma do experimento.

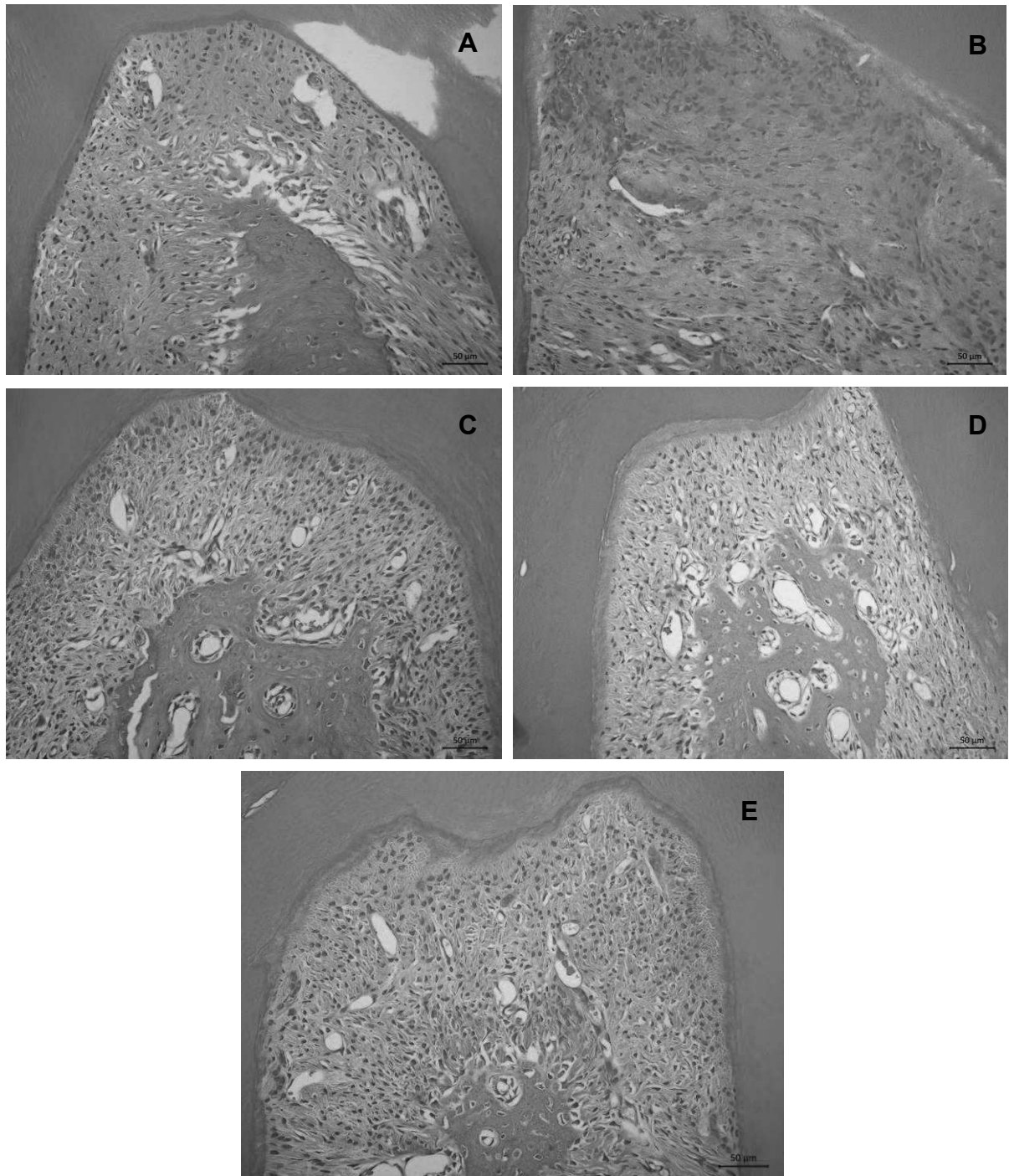


Figura 4. Fotomicrografias ilustrando os cortes de 3 μm com a coloração em H/E do primeiro molar inferior direito na região de entrada da furca para os grupos: Controle negativo (A), Controle positivo (B), RAR/salina (C), TFDa/água (D), e TFDa/etanol (E) (aumento original de 20x).

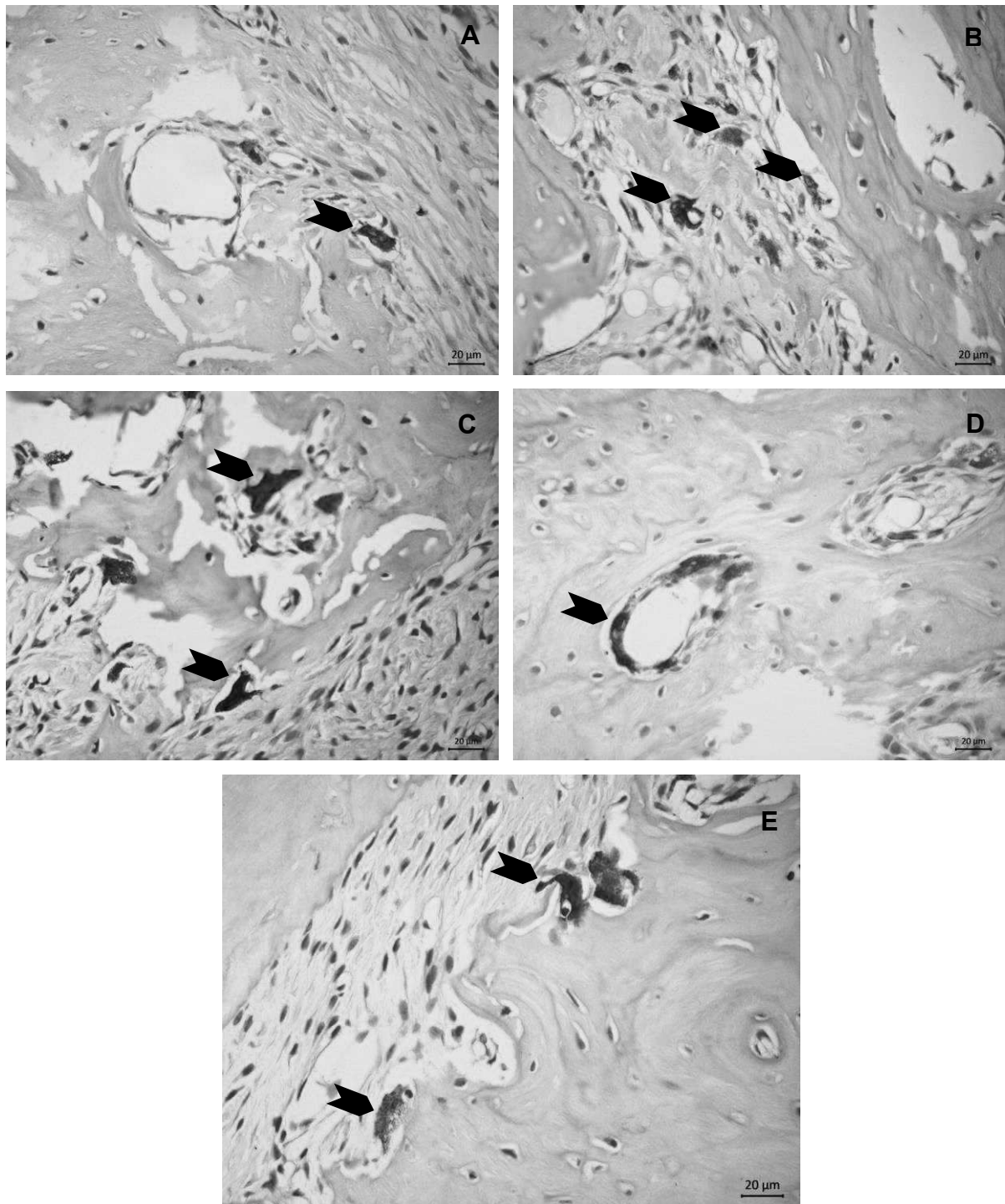


Figura 5. Fotomicrografias ilustrando a imunomarcção de células positivas para o anticorpo TRAP em áreas de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior direito para os grupos: controle negativo (A), controle positivo (B); RAR/salina (C), TFDa/água (D), e TFDa/etanol (E). As setas pretas indicam osteoclastos maduros (≥ 3 núcleos) (aumento original de 40x).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo primou pelo rigor metodológico, usando todos os recursos disponíveis para o controle de viéses, tentando reproduzir uma condição crônica que acomete o ser humano, assim como alternativas de tratamento para melhorar a efetividade do tratamento periodontal.

Desta forma, podemos concluir que o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana, independentemente da formulação, foi semelhante à raspagem e alisamento radicular, ratificando esta modalidade como padrão-ouro para o tratamento das periodontites.

A inclusão do etanol a 20% na formulação do AM não trouxe benefícios relevantes em termos de redução da perda óssea alveolar, nem melhora na resposta imune, quando comparada à formulação contendo água. Assim sendo, o uso desta modalidade de terapia como método coadjuvante à raspagem e alisamento radicular não se justifica, considerando os parâmetros avaliados neste estudo.

Alternativas que impulsionem a resultados favoráveis à TFDa como método coadjuvante à RAR vem sendo pesquisadas, como o uso do nanoencapsulamento de moléculas de AM; porém, os resultados dos estudos *in vitro* ainda não foram reproduzidos em um modelo *in vivo*. Esta nova perspectiva pode trazer benefícios clínicos que nós não encontramos em nosso estudo, com o intuito de otimizar o efeito da terapia periodontal como um todo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANDAR, J. M.; BRUNELLE, J. A.; KINGMAN, A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 1, p. 13-29, 1999.

AL-HARTHI, L. S. et al. The impact of periodontitis on oral health-related quality of life: a review of the evidence from observational studies. **Australian Dental Journal**, v. 58, n. 3, p. 274-277, 2013.

ALWAEELI, H. A.; AL-KHATEEB, S. N.; AL-SADI, A. Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 2, p. 801-807, 2013.

ALMEIDA, J. M. et al. In Vivo Effect of Photodynamic Therapy on Periodontal Bone Loss in Dental Furcations. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 6, p. 1081-1088, 2008a.

ALMEIDA, J. M. et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 11, p. 2156-2165, 2008b.

ANDRADE, P. F. et al. Adjunct effect of the antimicrobial photodynamic therapy to an association of non-surgical and surgical periodontal treatment in modulation of gene expression: A human study. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 126, p. 119–125, 2013.

ARAL, K.; ALKAN, B. A.; SARAYMEN, R. et al. Therapeutic Effects of Systemic Vitamin K2 and Vitamin D3 on Gingival Inflammation and Alveolar Bone in Rats With Experimentally Induced Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 5, p. 666-673, 2015.

ARWEILER, N. B. et al. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 9, p. 2129-2135, 2014.

ARWEILER, N. B. et al. Nonsurgical treatment of aggressive periodontitis with photodynamic therapy or systemic antibiotics. Three-month results of a randomized, prospective, controlled clinical study. **Research and Science**, v. 123, p. 531-538, 2013.

AXELSSON, P.; NYSTROM, B.; LINDHE, J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 9, p. 749–757, 2004.

BADERSTEIN, A.; NILVÉUS, R.; EGELBERG, J. Scores of plaque, bleeding, suppuration and probing depth to predict probing attachment loss. 5 years of observation following nonsurgical periodontal therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 17, n. 2, p. 102–107.

BALLATA, M. L. et al. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Applied Oral Science**, v. 21, n. 2, p. 208-214, 2013.

BASSIR, S. H. et al. Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. 1, p. 65–72, 2013.

BELIBASAKIS, G. N.; BOSTANCI, N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 3, p. 239–248, 2012.

BERGSTRÖM, J.; ELIASSON, S.; DOCK, J. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 8, p. 1338-47, 2000.

BETSY, J. et al. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 41, n. 6, p. 573–581, 2014.

BI, Y.; LIU, G.; YANG, R. Th17 cell induction and immune regulatory effects. **Journal Cell Physiology** v. 211, n. 2, p. 273-278, 2007.

BINSHTOK, A. M. et al. Co-application of Lidocaine and the Permanently Charged Sodium Channel Blocker QX-314 Produces a Long-lasting Nociceptive Blockade in Rodents. **Anesthesiology**, v. 111, n. 1, p. 127–137, 2009.

BOTTURA, P. E. et al. Nonsurgical Periodontal Therapy combined with Laser and Photodynamic Therapies for Periodontal Disease in Immunosuppressed Rats. **Transplantation Proceedings**, v. 43, n. 5, p. 2009-2016, 2011.

BRAUN, A. et al. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 10, p. 877–884, 2008.

BUCK, S. T. G. Relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em terapia fotodinâmica. Dissertação (Mestrado – Química) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009.

CAMPOS, G. N. et al. The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 1, p. 317–324, 2013.

CARREGARO, A. B.; CASTRO, M. B.; MARTINS, F. S. Estudo da ação inflamatória aguda do tiopental intraperitoneal em ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 191-5, 2005.

CARVALHO, A. S. et al. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 11, p. 735-740, 2011.

CASSEL, G. H.; MEKALANOS, J. Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. **JAMA**, v. 285, n. 5, p. 601-5, 2001.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.1, n. 4, p. 279-293, 2004.

CHAN, Y.; LAI, C. H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**; v. 18, n. 1, p. 51–55, 2003.

CHANG, P. C. et al. Progression of Periodontal Destruction and the Roles of Advanced Glycation End Products in Experimental Diabetes. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 3, p. 379-388, 2013.

CHECCHI, L. et al. Retrospective study of tooth loss in 92 treated periodontal patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 7, p. 651–656, 2002.

CHITSAZI, M. T. et al. Clinical and Microbiological Effects of Photodynamic Therapy Associated with Non-surgical Treatment in Aggressive Periodontitis. **JODDD**, v. 8, n. 3, p. 153-159, 2014.

CHONDROS, P. et al. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. **Lasers in Medical Science** v. 24, p. 681–688, 2009.

CHRISTODOULIDES, N. et al. Photodynamic Therapy as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Treatment: A Randomized, Controlled Clinical Trial. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 9, p. 1638-1644, 2008.

CLARKE, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. **Clinical Journal of American Society of Nephrology**,. 3(Suppl 3): S131–S139, 2008.

COBB, C. M. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, s. 2, p. 6-16, 2002.

COCHRAN, D. L. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8, p. 1569-1576, 2008.

DE MOLON, R. C.; DE AVILA, E. D.; BOAS NOGUEIRA, A. V. et al. Evaluation of the Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 3, p.465-477, 2014.

DUTRA, D. A. M. et al. Avaliação do fotossensibilizador azul de metileno em diferentes formulações para uso em terapia fotodinâmica antimicrobiana. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

FARDAL, Ø.; JOHANNESSEN, A. C.; LINDEN, G. J. Tooth loss during maintenance following periodontal treatment in a periodontal practice in Norway. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 7, p. 550–555, 2004.

FERNANDES, L. A. et al. Radiographic assesment of photodynamic therapy as na adjunctive treatment on induced periodontitis in immunosuppressed rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 18, n. 3, p. 237-243, 2010.

FOLEY, I.; GILBERT, P. Antibiotic resistance of biofilms. **Biofouling**, v. 10, n. 4, p. 331–346, 1996.

FONTANA, C. R. et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 6 , p. 751–759, 2009.

GABRIELLI, D. et al. Binding, Aggregation and Photochemical Properties of Methylene Blue in Mitochondrial Suspensions. **Photochemical and Photobiology**, v. 79, n. 3, p. 227-232, 2004.

GALLAGHER, J. C. & SAI, A. J. Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis. **Maturitas** v. 65, n. 4, p. 301–307, 2010.

GARCIA, V. G. et al. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 12, p. 1106–1114, 2011.

GARCIA, V. G. et al. Adjunctive Antimicrobial Photodynamic Treatment of Experimentally Induced Periodontitis in Ovariectomized Rats. **Journal of Periodontology**, v. 84, n.4, p. 556-565, 2012a.

GARCIA, V. G. et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 1, p. 143-150, 2012b.

GARCIA, V. G. et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, n. 5, p. 584-594, 2013.

GARCIA, V. G.; KNOLL, L. R.; LONGO, M.; et al. Effect of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, doi: 10.1111/jre.12274, 2015.

GARLET, G. P. et al. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 8, p. 671-679, 2004.

GE, L. et al. Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planning in the treatment of chronic periodontitis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2011.

GEORGE, S.; KISHEN, A. Augmenting Antibiofilm Efficacy of LAD with Emulsified Oxidizer and Oxygen Carrier. **Journal of Oral Endodontics**, v. 34, n. 9, p. 1119-1123, 2008.

GEORGE, S.; KISHEN, A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. **Journal of Biomedical Optics**, v. 12, n. 3, p. 29-34, 2007.

GIANNELLI, M. F. et al. Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. A randomized split-

mouth clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v.39, n. 10, p. 962–970, 2012.

GOULART, R. C. et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 1, p. 53-60, 2010.

GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. The Contribution of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor to Periodontal Tissue Destruction. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 3, p. 391-401, 2003.

GRAVES, D. T.; FINE, D.; TENG, Y. T.; VAN DYKE, T. E.; HAJISHENGALLIS, G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 2, p. 89–105, 2008.

GRAVES, D. T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **Journal of Oral Microbiology**, v. 3, p.5304, 2011.

HAIDEKKER M. A., et al. Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes. **Bioorganic Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 415–425, 2005.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-50, 2004.

HARRIS, F. et al. Phenothiazinium Based Photosensitisers – Photodynamic Agents with a Multiplicity of Cellular Targets and Clinical Applications. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 5, p. 615-627, 2005.

HASSUMI, M. Y., et al. PPAR-gamma agonist rosiglitazone prevents inflammatory periodontal bone loss by inhibiting osteoclastogenesis. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 10, p. 1150-1158, 2009.

HERRERA, D. et al. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. **Journal of Clinical Periodontology** v. 29, n. 3, p. 136–159, 2002.

KAWAI, T. et al. B and T Lymphocytes Are the Primary Sources of RANKL in the Bone Resorptive Lesion of Periodontal Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 3, p. 987-998, 2006.

KEESTRA, J. A. J. et al. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Periodontal Research**, v. 50, n. 3, p. 294-314, 2014.

KHOSLA, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5050–5055, 2001.

KIM, Y. D. et al. Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. **Lasers in Surgical Medicine**, v. 39, n. 5, p. 441–450, 2007.

KIM, J-H; LEE, D-E; CHA, J-H et al. Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand and Sclerostin Expression in Osteocytes of Alveolar Bone in Rats With Ligature-Induced Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 11, p. 370-378, 2014.

KISHEN, A. et al. Efflux Pump Inhibitor Potentiates Antimicrobial Photodynamic Inactivation of *Enterococcus faecalis* Biofilm. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 6, p. 1343–1349, 2010.

KLAUSE, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **Journal of Periodontology**, v. 62, p. 59–73, 1991.

KOLBE, M. F. et al. Photodynamic Therapy During Supportive Periodontal Care: Clinical, Microbiologic, Immunoinflammatory, and Patient-Centered Performance in a Split-Mouth Randomized Clinical Trial. **Journal of Periodontology**, v. 85, p. 277-286, 2014.

KONAN Y. N.; GURNY R.; ALLÉMANN E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemical and Photobiology. B, Biology**, v. 66, n. 2, p. 89-106, 2002.

KRAMER, J. M., GRAFFEN, S. L. Interleukin-17: A New Paradigm in Inflammation, Autoimmunity, and Therapy. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 6, p. 1083-1093, 2007.

KULKARNI, C.; KINANE, D. Host response in aggressive periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 65, n. 1, p. 79–91, 2014.

KVIST, M.; HANCOCK, V.; KLEMM, P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. **Applied Environmental Microbiology** v. 74, n. 23, p. 7376-82, 2008.

LEIBBRANDT, A.; PENNINGER, J. M. RANK/RANKL: Regulators of Immune Responses and Bone Physiology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1143, p. 123–150, 2008.

LINDHE, J.; HAMP, S-E.; LÖE, H. Plaque-induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometric study. **Journal of Periodontal Research**, v. 10, n. 5, p. 243-255, 1975.

LIU, D. et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 11, n. 1, p. 17-21, 2003.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontology**, v. 36, p. 177-187, 1965.

LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B. Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas. **Revista Clínica de Pesquisa Odontológica**, v. 6, n. 3, p. 249-57, 2010.

LUCHESI, V. H. et al. Photodynamic therapy in the treatment of class II furcation: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. 8, p. 781–788, 2013.

MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers in Medical Science**, v, 22, n. 2, p. 83-991, 2007.

MARTHUR, A.; MICHALOWICZ, B. S. Cell-mediated immune system regulation in periodontal disease. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p.76-89, 1997.

MEALEY, B. L.; OATES, T.W. Diabetes mellitus and periodontal diseases. **Journal of Periodontology**, v. 77, n. 8, p. 1289-1303, 2006.

MEISEL, P.; KOCHER, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology** v. 79, n. 2, p. 159-170, 2005.

MOGI, M. et al. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. 2, p. 166-9, 2004.

MOREIRA, A. L. et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy as an Adjunct to Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: A Split-Mouth Randomized Controlled Trial. **Journal of Periodontology**, v. 86, p. 376-386, 2015.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Executive summary of safety and toxicity information for methylene blue trihydrate. U.S. **Department of Health and Human Services**, 7220-79-3, 1990.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-18, 1997.

OZ, H. S.; PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p.754857, 2011.

PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontology 2000**, v. 14, p. 9-11, 1997.

PAPANTONOPOULOS, G. H. Smoking influences decision making in periodontal therapy: a retrospective clinical study. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 10, p. 1166-73, 1999.

PATIL, K.; PAWAR, R.; TALAP, P. Self-aggregation of methylene blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu₄ NBr and urea. **Physical Chem Chem Phys**, v. 2, n. 19, p. 4313–4317, 2002.

PELOI, L. S. et al. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **Journal of Biosciences**, v. 33, p. 231–237, 2008.

PFITZNER, A. et al. Killing of Periodontopathogenic Bacteria by Photodynamic Therapy. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 10, p. 1343-1349, 2004.

POURABBASS, R. et al. Effects of Photodynamic Therapy on Clinical and Gingival Crevicular Fluid Inflammatory Biomarkers in Chronic Periodontitis: A Split-Mouth Randomized Clinical Trial. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 9, p. 1222-1229, 2014.

QUEIROZ, A. C. et al. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 2, p. 617-625, 2013.

RAAB O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. **Z Biology**, v. 39, p. 524–546, 1900.

RASHIDPOUR, M. et al. Effect of Tramadol (μ -opioid receptor agonist) on orthodontic tooth movements in a rat model. **Journal of Dentistry**, v. 9, n. 2, p. 83-89, 2012.

RAVANAT J. L.; DI MASCIO P.; MARTINEZ G. R.; MEDEIROS M. H. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 276, n. 8, p. 40601-4, 2001.

RENVERT, S. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 17, n. 6, p. 345–350, 1990.

RIVERA, E. A. B. Analgesia, anestesia e eutanásia em roedores, lagomorfos, cães e suínos. In: Feijó AGS, Braga LMGM, Pitrez PMC (Organizadores). Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos. Porto Alegre: ediPUCRS, p.198-216, 2010.

ROLIM, J. P. M. L. et al. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 106, p. 40-46, 2012.

ROUX, S. et al. RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B) and RANK Ligand Are Expressed in Giant Cell Tumors of Bone. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 117, p. 210-216, 2002.

RÜHLING, et al. Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients—a clinical study. **Clinical Oral Investigations**, v. 14, n. 6, p. 637–644, 2010.

SAGLIE, F. R.; MARFANY, A.; CAMARGO, P. Intragingival occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in active destructive periodontal lesions. **Journal of Periodontology**, v. 59, n. 4, p. 259–265, 1988.

SEPPALA, B.; SEPPALA, M.; AINAMO, J. A longitudinal study of insulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 20, n. 3, p. 161-165, 1993.

SERINO, G. et al. Initial outcome and long-term effect of surgical and non-surgical treatment of advanced periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28, n. 10, p. 910–916, 2001.

SEVERINO, D. et al. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **Photochemical and Photobiology**, v. 77, n. 5, p. 459-468, 2003.

SEYMOUR, G. J.; GEMMELL, E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 59, p. 167 –173, 2001.

SGOLASTRA, F. et al. Effectiveness of Systemic Amoxicillin/Metronidazole as Adjunctive Therapy to Scaling and Root Planing in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 10, 2012a.

SGOLASTRA, F. et al. Effectiveness of Systemic Amoxicillin/Metronidazole as an Adjunctive Therapy to Full-Mouth Scaling and Root Planing in the Treatment of Aggressive Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Periodontology**, v. 83, n. 6, 2012b.

SGOLASTRA, F. et al. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 669-682, 2013.

SHENKEIN, H. A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 40, p. 77–93, 2006.

SLOTS, J. Research, Science and Therapy Committee. Systemic antibiotics in periodontics. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 11, p. 1553-65, 2004.

SOCRANSKY, S. S. & HAFFAJEE, A. D. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. **Journal of Periodontology**, v. 63, n. 4, p. 322-331, 1992.

SOUKOS, N. S.; GOODSON, M. J. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontology 2000**, v. 55, p. 143-146, 2011.

STARK G. Functional consequences of oxidative membrane damage. The **Journal of Membrane Biology**, v. 205, n. 1, p. 1-16, 2005.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Review of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199-210, 2008.

SUSIN, C. et al. Periodontal attachment loss in an urban of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral and environmental risk indicators. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 7, p. 1033-1041, 2004.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **Journal of Periodontal Research**, v. 40, p.287–293, 2005.

TANG, H.; MATTHEOS, N.; YAO, Y.; et al. In vivo osteoprotegerin gene therapy preventing bone loss induced by periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, doi:10.1111/jre.12224, 2014.

TAPPEINER H. V, JODLBAUER A. Über Wirkung der photodynamischen (fluoriseszierenden) Stoffe auf Protozoan und Enzyme. **Dtsch Arch Klin Med**, n. 80, p. 427-487, 1904.

TAYLOR, G. W. et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. **Journal of Periodontology**, v. 69, n. 1, p. 76-83, 1998.

TAYLOR, N. E. et al. Activation of D1 dopamine receptors induces emergence from isoflurane general anesthesia. **Anesthesiology**, v. 118, n. 1, p. 30–39, 2013.

TERVONEN T.; KARJALAINEN, K. Periodontal disease related to diabetic status. A pilot study of the response to periodontal therapy in type 1 diabetes. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, n. 7, p. 505-510, 1997.

TERVONEN, T.; OLIVER, R. C. Long-term control of diabetes mellitus and periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 20, n. 6, p. 431-435, 1993.

THEODORO, L. H. et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. **Lasers in Medical Science**, v. 27, p. 687–693, 2012.

THEODORO, L. H.; CAIADO, R.C.; LONGO, M. et al. Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 4, p.1209–1218, 2015.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Efficacy Against Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms. **Lasers Surgical Medicine**, v. 29, n. 2, p. 165-173, 2001.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. Methylene Blue--a therapeutic dye for all seasons? **Journal of Chemotherapy**, v. 14, n. 5, p. 431-43. Review, 2002.

WAINWRIGHT M. Methylene blue derivatives--suitable photoantimicrobials for blood product disinfection?. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 4, p. 381-94, 2000.

WAINWRIGHT, M. et al. Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant *Enterococcus spp.* **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 823-825, 1999.

WAINWRIGHT, M.; et al. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 75-80, 1997.

WENNSTRÖM, J. L.; DAHLÉN, G.; RAMBERG, P. Subgingival debridement of periodontal pockets by air polishing in comparison with ultrasonic instrumentation during maintenance therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 9, p. 820-827, 2011.

WILSON M.; BURNS T.; PRATTEN J.; PEARSON G. J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 5, p. 569-74, 1995.

WOOD, S. et al. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 1999.

YANG, X.; ZHANG, H.; WANG, J.; et al. Puerarin decreases bone loss and collagen destruction in rats with ligature-induced periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, doi: 10.1111/jre.12261, 2015.

YOSHIKAWA, T. T. Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? **Journal of American Geriatric Society**, v. 50, n. 7, p. 226-9. Review, 2002.

ANEXOS

Anexo I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Influência do solvente fotossensibilizador utilizado na terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento de periodontite experimental em ratos diabéticos e não diabéticos"

Número do Parecer: 027/2013

Pesquisador Responsável: Prof. Dra. Cristiane Cadermatori Danesi

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 05/09/2013

Santa Maria, 05 de setembro de 2013.

Prof. Dr. Alexandre Krause
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM

Anexo II – Normas para preparação de artigos da Revista *Journal of Clinical Periodontology*.

Author Guidelines

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

Relevant Document: Sample Manuscript

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

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



1. GENERAL

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

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

2. ETHICAL GUIDELINES

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

2.1. Authorship and Acknowledgements

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

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

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

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

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

2.2. Ethical Approvals

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

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

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

2.3 Clinical Trials

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

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

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

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

2.5 Conflict of Interest and Sources of Funding

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

2.6 Appeal of Decision

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

2.7 Permissions

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

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts.

Complete instructions for submitting a paper is available on the submission site. Further assistance can be obtained from the Editorial Office Assistant, Verity Butler, at cpeedoffice@wiley.com.

3.1. Manuscript Files Accepted

Main manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected). The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, clinical reference, main text, references, acknowledgement, statement of source of funding and any potential conflict of interest, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference any figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc. to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded.

Figure files should be uploaded separately to the main text. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing.

Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.2. Blinded Review

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

3.3. Suggest a Reviewer

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

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

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

3.5. E-mail Confirmation of Submission

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

3.6 Resubmissions

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

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

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

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

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

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

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected.

Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. It is preferred that manuscript is professionally edited. Please refer to English Language Editing Services offered by Wiley at <http://wileyeditingservices.com/en/>.

Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

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

5.2. Structure

All articles submitted to *Journal of Clinical Periodontology* should include:

- Title Page
- Conflict of Interest and Source of Funding
- Clinical Relevance
- Abstract
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- References
- Tables (where appropriate)
- Figure Legends (where appropriate)
- Figures (where appropriate and uploaded as separate files)

All manuscripts should emphasize clarity and brevity. Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly.

Technical jargon should be avoided as much as possible and be clearly explained where its use is unavoidable.

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

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

See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's Editorial on Conflict of Interest and Source of Funding and www.icmje.org/#conflicts for generally accepted definitions.

Abstract: is limited to 200 words in length and should not contain abbreviations or references. The abstract should be organized according to the content of the paper.

For Original Research Articles the abstract should be organized with **aim, materials and methods, results and conclusions**.

For clinical trials, it is encouraged that the abstract finish with the clinical trial registration number on a free public database such as clinicaltrials.gov.

Clinical Relevance: This section is aimed at giving clinicians a reading light to put the present research in perspective. It should be no more than 100 words and should not be a repetition of the abstract. It should provide a clear and concise explanation of the rationale for the study, of what was known before and of how the present results advance knowledge of this field. If appropriate, it may also contain suggestions for clinical practice.

It should be structured with the following headings: **scientific rationale for study, principal findings, and practical implications**.

Authors should pay particular attention to this text as it will be published in a highlighted box within their manuscript; ideally, reading this section should leave clinicians wishing to learn more about the topic and encourage them to read the full article.

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

5.3. Original Research Articles

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

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

Main Text of **Original Research Articles** should be organized with

- Introduction,
- Materials and Methods,
- Results and Discussion.
- References (Harvard, see section 5.7)

The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Please see Sample Manuscript.

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

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

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

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

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

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

authors directly.

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

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

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

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

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

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

Summary of key finding

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

Strengths and Limitations of the Study

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

Interpretation and Implications in the Context of the Totality of Evidence

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

Controversies Raised by This Study Future Research Directions

- * For this particular research collaboration

* Underlying mechanisms

* Clinical research

5.4. Clinical Innovation Reports

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

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

The main text of Clinical Innovation Reports should be organized with

- Introduction,
- Clinical Innovation Report,
- Discussion and Conclusion
- References (Harvard, see section 5.7)

5.5. Case Reports

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

The main text of Case Reports should be organized with

- Introduction,
- Case report,
- Discussion and Conclusion
- References (see section 5.7)

5.6. Reviews

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected.

Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

The word limit for reviews is 4000 words.

The main text of Reviews should be organized with

- Introduction,
- Review of Current Literature,
- Discussion and Conclusion
- References (Harvard, see section 5.7)

5.7. References

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

Reference style (Harvard):

References in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Brown & Smith 1966). Three or more authors should always be referred to as, for example, Brown et al. 1966.

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors, (1975), p. 36. London: The Royal Society of Medicine.

- a) The arrangement of the references should be alphabetical by first author's surname.
- b) The order of the items in each reference should be:
 - (i) for journal references: name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.
 - (ii) for book references: name(s) of author(s), year, chapter title, title of book in italics, edition, volume, page number(s), town of publication, publisher.
- c) Authors' names should be arranged thus: Smith, A. B., Jones, D. E. & Robinson, F. C. Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Authors' names when repeated in the next reference are always spelled out in full.
- d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1967).
- e) The title of the paper should be included without quotation marks.
- f) The journal title should be written in full, italicised (single underlining in typescript), and followed by volume number in bold type (double underlining on typescript) and page numbers.

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

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

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

URL: Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text. Example: Smith A. (1999) Select Committee Report into Social Care in the Community [WWW document].

URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report0394498.html> [accessed on 7 November 2003]

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

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

5.8. Tables, Figures and Figure Legends

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

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

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

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper

histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size. Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by thin spaces (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

Preparation of Electronic Figures for Publication

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

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

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

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

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

5.9. Supplementary Material

Supplementary material, such as data sets or additional figures or tables that will not be published in the print edition of the Journal but which will be viewable in the online edition, can be uploaded as 'Supporting information for review and online publication only'.

Please see <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp> for further information on the submission of Supplementary Materials.

6. AFTER ACCEPTANCE

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

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

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

allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Production Tracking

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

6.4 Accepted Articles

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

Accepted articles will be indexed by PubMed; therefore the submitting author must carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript, as it will not be possible to alter these once a paper is made available online in Accepted Article format.

7. OnlineOpen

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

http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

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

8. Copyright Assignment

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into 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.

For authors signing the copyright transfer agreement

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 below:

CTA Terms and Conditions: http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing 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 OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

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 Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant selfarchiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.aspx and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear either as Early View articles in a matter of weeks or in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.