

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

Silvana Martins Rodrigues

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA ADJUVANTE COM
AZUL DE METILENO / ETANOL NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL
EM RATOS DIABÉTICOS: RESPOSTA INICIAL - 7 DIAS**

Santa Maria, RS
2016

Silvana Martins Rodrigues

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA ADJUVANTE
COM AZUL DE METILENO / ETANOL NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL
EM RATOS DIABÉTICOS: RESPOSTA INICIAL - 7 DIAS**

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 obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Zanini Kantorski

Santa Maria, RS

2016

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

Martins Rodrigues, Silvana
TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA ADJUVANTE COM
AZUL DE METILENO / ETANOL NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL
EM RATOS DIABÉTICOS: RESPOSTA INICIAL - 7 DIAS / Silvana
Martins Rodrigues.- 2016.
85 p.; 30 cm

Orientadora: Karla Zanini Kantorski
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Odontológicas, RS, 2016

1. Doença periodontal I. Zanini Kantorski, Karla II.
Título.

Silvana Martins Rodrigues

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA ADJUVANTE
COM AZUL DE METILENO / ETANOL NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL
EM RATOS DIABÉTICOS: RESPOSTA INICIAL - 7 DIAS**

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 obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas**.

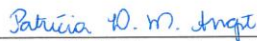
Aprovada em 29 de Julho de 2016:



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



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



Patricia Melchior Angst, Prof^a Dr^a (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

Aos meus dois presentes da vida: meu pequeno amor (canino) Cold e ao meu grande amor, Lucas. Por nunca desistirem de mim. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer com justiça e com o devido merecimento todas as pessoas que estiveram ao meu lado nesta trajetória. A ajuda e o apoio que recebi foram de valor inestimável. Apenas posso me expressar através de meras palavras, e com elas prestar esta humilde, mas sincera homenagem.

Em primeiro lugar, sempre, minha família querida. Meus pais **Antônio e Jussara**, que me deram a oportunidade de estar nesse mundo, por não medirem esforços para me proporcionar condições de chegar a este momento hoje. À vocês que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento. Isso é pra vocês e por vocês.
Que Deus sempre os ilumine!

À minha irmã, minha Mana, é difícil até chamar pelo nome, **Luciane!** Meu exemplo e inspiração, sempre encarou todos os desafios da vida. Fostes essencial nesta reta final, me dando apoio e segurança necessária para concluir mais esta etapa.
Não canso de repetir, quando crescer, quero ser que nem tu! Te amo!

Ao meu mano amado, **Jonathan!** Por me alegrar em momentos difíceis, com sua alma leve e coração aberto. Pelo seu apoio incondicional ao longo deste processo de dissertação. Te amo Mano!

Da mesma forma, meu cunhado **André e sua família**. Pessoas maravilhosas que mesmo de longe, estiveram sempre torcendo pelas minhas conquistas.

À minha pequena **Ana Luísa**, que trouxe só alegrias desde a sua chegada. O melhor presente do ano é poder conviver mais ao teu lado. Dinda vai estar sempre por perto, meu amor.

À minha orientadora, **Profª Karla**. Nunca imaginei que um dia estaria fazendo mestrado. Ainda mais na Periodontia, que pra mim é motivo de orgulho. Isso só foi possível porque você me deu esta oportunidade. Você é uma excelente profissional, com uma linha de pesquisa que admiro e que me sinto lisonjeada em ter participado. Continue focando nesta área, você ainda vai colher muitos frutos do seu esforço e dedicação. E pode sempre contar comigo, mesmo após a minha saída da pós-graduação. Você é um exemplo para mim, espero um dia ter, nem que seja, metade da sua competência e brilhantismo. Espero não tê-la decepcionado (muito), tentei cumprir o meu papel com todo o respeito e admiração que tenho por você e seu trabalho. Serei eternamente grata por essa oportunidade que me destes.
Muito obrigada por tudo!

Às minhas colegas e agora, AMIGAS que o mestrado me deu: Gurias do grupo dos ratos, **Maritiéli, Marcela, Fernanda, Luisa, Juliana**. Vocês foram fundamentais para o conhecimento que adquiri em histologia. Sem a ajuda de vocês, estas análises não teriam saído do papel. E claro, para os momentos de risadas e descontração, porque afinal, nós fizemos por merecer. Gurias, vocês são muito importantes pra mim! Obrigada por todo o apoio!

Aos demais **colegas de mestrado**, obrigada pela convivência e aprendizado. Sucesso à todos!

Aos colegas do **grupo da periodontia**, obrigada pela convivência, discussões científicas e momentos de descontração, apesar do pouco tempo em que estivemos juntos. Desejo à todos muito sucesso nos seus caminhos. Tenho muito orgulho de ter pertencido à este grupo!

À professora **Cristiane Cadermatori Danesi**, e ao pós-doutorando **Roberto Marinho Maciel** que juntamente com a minha orientadora, fizeram este projeto acontecer, com todo o seu rigor metodológico e ética. Realmente foi um sonho realizado ter ajudado a construir uma pequena parte deste grande projeto que espero, continue após mais esta etapa concluída. Vocês são pesquisadores extremamente competentes e capazes. Muito obrigada por todo o apoio!

Aos “anjos” (parafrazeando minha amiga Cibele Campagnolo) que surgiram nesta caminhada e me estenderam a mão, permitindo que este projeto fosse evoluindo: **Sérgio Oliveira**, da histologia com todo o seu conhecimento técnico, experiência e é claro ao seu bom humor que me muitas vezes alegrava meus dias mais cinzentos. Ao professor **Géder Hermann**, da medicina veterinária que com sua bondade e sem pedir nada em troca, me ajudou em um momento crítico. Ao professor **João Marcelo Oliveira** da biologia, que abriu as portas do seu laboratório, permitindo a execução de mais uma análise deste projeto. Da mesma forma, ao **Everton Pittaluga**, que foi o meu grande parceiro nesta etapa final do mestrado. Um ser humano admirável, profissional competente, que conduziu com primor uma etapa delicada da histotécnica, sempre tentando me ajudar da melhor forma possível. Vou sentir muita falta da nossa convivência, mas sei que o mundo ainda vai ouvir falar muito de ti. Serei eternamente grata à todos vocês! Muito obrigada e sucesso sempre!

Ao **PPGCO**, representado pelo **Professor Luis Felipe Valandro** que conduz este grupo. A pós-graduação tem muito a aprender contigo. Admiro muito a sua dedicação e competência! Obrigada por todo o apoio!

À secretária do PPGCO, **Jéssica Dalcin da Silva** por todo o apoio que dá aos pós-graduandos durante a nossa passagem por este programa. O seu profissionalismo, e paciência nos conforta e dá segurança nos processos burocráticos (e não burocráticos!) Obrigada por tudo, és uma excelente profissional.

Ao professores, **Patrícia Melchiors Angst** e **José Mariano da Rocha** pelas considerações na qualificação deste projeto. Com as sugestões de vocês, nós conseguimos conduzir as análises finais. Agradecemos pelo respeito e carinho com os quais avaliaram nosso trabalho. Obrigada!

Aos professores da Periodontia, **Carlos Heitor Cunha Moreira e Fabrício Bastistin Zanatta**. Obrigada pelos ensinamentos e por terem colaborado com a minha formação. Admiro o entusiasmo e sabedoria quase de “enciclopédia” como vocês conduzem a nossa periodontia. Vocês são exemplos de profissionais que um dia eu gostaria de me tornar.

À mestranda **Ana Paula**, pela amizade, convivência e generosidade. Você tem um grande futuro pela frente na pós-graduação. Pode contar sempre comigo Aninha!
Grande beijo!

Ao amigo, **Danilo** pela contribuição neste trabalho. Aprendi a te admirar como pessoa e pesquisador. Você tem um futuro brilhante pela frente. Obrigada por tudo!

À minha amiga, **Cibele** que me inseriu e me conduziu dentro do projeto dos ratos. Admiro a sua determinação e a maneira como encara os desafios. Sem a sua ajuda intelectual e é claro, sua amizade e paciência o caminho seria muito mais difícil.

Você, literalmente, abriu o caminho para que eu pudesse seguir. Nunca vou esquecer todo o apoio que você me proporcionou. Ainda vamos rir muito juntas, fazer festa juntas, tenho certeza! Beijão no teu coração e muito obrigada por tudo!

À minha companheira de caminhada, **Patrícia**. Aprendi muito contigo. Obrigada pelo apoio moral, intelectual, profissional. Tu és uma pessoa incrível, contigo não tem tempo ruim, não tem problema que não se resolva, não tem dia que não melhore. Obrigada pelas risadas, choros e madrugadas em claro. Vou sentir muito a tua falta. Nós chegamos até aqui juntas! Pode sempre contar comigo, pra tudo mesmo. Não quero que a nossa amizade termine com o mestrado. Toda a felicidade do mundo pra ti! Vou te levar sempre no meu coração. Muito obrigada!

Às minhas nenas, **Bárbara Dala Nora e Priscila Kist**. Minha amigas de fé, que me conhecem como ninguém e que participaram de todo este processo de pós-graduação. Obrigada pelo conforto, pelos puxões de orelha, pelo incentivo que sempre me proporcionaram. Vocês são muito especiais pra mim. Amo vocês!

À minhas “Lulus”, **Carolina Dummel, Priscila Campeol, e Vanessa Leal**. Minhas amigas do coração, que mesmo de longe me apoiaram e me incentivaram sempre. Vocês são demais, amo cada uma, são essenciais para a minha vida! Além disso, meu amigo **Renan Marques** que foi fundamental no meu processo de qualificação juntamente com a Carol. Serei eternamente grata pela generosidade deste casal que me enche de orgulho! Grande beijo pra todos vocês!

Às amigas da “velha guarda”, **Catiéli, Bruna e Vanessa**. Da infância para a vida. Vocês são demais, cada uma do seu jeito. Obrigada pelos momentos maravilhosos que já vivemos juntas e os que ainda virão. Beijão no coração.

Ao meu noivo, **Lucas Filipini**. Meu presente da vida, meu companheiro durante todo o mestrado. Palavras são poucas pra agradecer todo o apoio que me destes nestes dois anos. Não é à toa que dedico este trabalho a ti. Obrigada pelo seu amor, paciência, inteligência, tranquilidade e generosidade. Sempre me incentivando a crescer mais. Obrigada por nunca desistir de mim. Obrigada por todos os momentos lindos que já tivemos! Te amo com todo amor que tenho!

À toda **família Filipini** pelo incentivo e apoio de sempre. Tenho muita sorte em poder contar com pessoas como vocês. São minha família também.
Beijão no coração de cada um.

À **CAPES**, pela bolsa de estudos.

À todos aqueles, que de alguma forma, torceram e me incentivaram nesse dois anos, **Muito Obrigada!**

*“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida,
a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força,
muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e
com muita fé em Deus, que um dia você chega lá.
De alguma maneira você chega lá.”
Ayrton Senna.*

RESUMO

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA ADJUVANTE COM AZUL DE METILENO / ETANOL NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS DIABÉTICOS: RESPOSTA INICIAL - 7 DIAS

AUTORA: Silvana Martins Rodrigues
ORIENTADORA: Karla Zanini Kantorski

Evidências *in vitro* sugerem que o azul de metileno (AM) diluído em etanol melhora o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica (TFDa). Nossa hipótese é que TFDa com AM dissolvido em etanol à 20% poderia limitar a destruição periodontal provocada por ligadura em ratos diabéticos quando comparado com RAR e TFDa usando AM/água. Quarenta ratos machos adultos receberam injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ). Após 14 dias, 5 animais foram alocados no grupo Controle Negativo (CN), e 35 animais receberam ligadura no primeiro molar inferior. Após 7 dias, a ligadura foi removida e os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: Controle Positivo (CP) (sem tratamento); e RAR, TFDa/água (RAR e TFDa com 100 µg/ml de AM dissolvido em água), e TFDa/etanol (RAR e TFDa com 100 µg/ml de AM dissolvido em água, etanol e carboximetilcelulose (77: 20: 3)). Os animais foram sacrificados após sete dias. Valores histométricos e hematológicos foram analisados estatisticamente. O percentual de animais que apresentaram infiltrado inflamatório moderado a severo foi: 10% e 40% para RAR; 20% e 30% para TFDa/água; e 50% e 0% para a TFDa/etanol, respectivamente. O grupo RAR apresentou estatisticamente maior contagem de glóbulos brancos, linfócitos e monócitos do que todos os outros grupos. Para a perda óssea, não se observou diferença estatística entre TFDa/etanol ($0,08 \pm 0,03$) e TFDa/água ($0,21 \pm 0,15$); e entre a TFDa/água e RAR ($0,30 \pm 0,18$). A perda óssea para o grupo TFDa/etanol foi significativamente menor do que RAR. A TFDa, independentemente das formulações, mostrou perda óssea estatisticamente semelhante ao dos animais sem periodontite. Os animais do grupo TFDa/etanol apresentaram teor de colagênio significativamente maior do que os animais não tratados (CP), e apresentaram valores médios mais elevados do que os animais sem periodontite, mesmo assim as diferenças não foram estatisticamente significativas. Coletivamente, os nossos resultados mostraram que TFDa/etanol apresentou resultados mais promissores, seguido pela TFDa/água e RAR.

Palavras-chave: Doença periodontal. Lasers. Perda óssea alveolar. Raspagem e alisamento radicular.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY ADJUVANT WITH METHYLENE BLUE / ETHANOL IN PERIODONTITIS EXPERIMENTAL DIABETIC RATS: INITIAL RESPONSE - 7 DAYS

AUTHOR: SILVANA MARTINS RODRIGUES
ADVISOR: KARLA ZANINI KANTORSKI

In vitro evidences suggested methylene blue (MB) diluted in ethanol improves the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) effect. We hypothesized that aPDT with MB dissolved in ethanol 20% could limit periodontal destruction provoked by ligature in diabetic rats when compared to SRP and aPDT using MB/water. Forty adult male rats received intraperitoneal injections of streptozotocin. After 14 d, 5 animals were allocated in the CG, and 35 animals received ligature at the first mandibular molar. After 7 d, the ligature was removed and the animals were randomized into 4 groups: LG (without treatment); and SRPG (SRP), aPDTW (SRP and aPDT with MB 100µg/ml dissolved in water), and aPDTEt (SRP and aPDT with MB 100µg/ml dissolved in water, ethanol and carboxymethylcellulose (77:20:3)). Animals were euthanized at 7 d. Histometric and hematological values were statistically analyzed. The animals percentage presented mild and severe inflammatory infiltrate was: 10% and 40% for SRPG; 20% and 30% for aPDTW; and 50% and 0% for aPDTEt, respectively. SRPG presented statistically higher count of WBC, lymphocytes and monocytes than all the other groups. For bone loss (BL), no statistical difference was observed among aPDTEt (0.08 ± 0.03) and aPDTW (0.21 ± 0.15); and among aPDTW and SRPG (0.30 ± 0.18). aPDTEt BL was significantly lower than SRPG. aPDT, independently of the formulations, showed BL statistically similar to the animals without periodontitis. aPDTEt animals showed collagen content significantly higher than untreated animals (LG), and presented higher mean values than animals without periodontitis, even so the differences don't were statistically significant. Collectively, our findings showed aPDTEt presented most promising results, followed for the aPDTW and SRP. We concluded that adjunctive aPDT using MB solubilized ethanol could be an alternative to periodontal treatment in patients who has diabetes. Then, we suggest further studies with more complex animals models and with higher follow-up to confirm our initial findings.

Key Words: Alveolar bone loss. Lasers. Periodontal disease. Scaling and root planning.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM - Azul de Metileno
AT - Azul de Toluidina
DM - Diabetes Mellitus
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DP - Doença periodontal
ECRs - Ensaio clínico randomizado
EROs - Espécies reativas de oxigênio
Fs - Fotossensibilizador
Gold standard - Padrão ouro
H/E - Hematoxilina-eosina
IC - Intervalo de confiança
IP - Intraperitoneal
IV - Intravenoso
mm - Milímetros
mg/Kg - Miligrama por quilo
nm - nanômetros
OMS - Organização Mundial da Saúde
RAR - Raspagem e alisamento radicular
STZ - Estreptozotocina
TFDa - Terapia fotodinâmica antimicrobiana
 α - Alfa
 β - Beta
 μ s - micro-segundos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
3 ARTIGO - Adjunctive antimicrobial photodynamic therapy using methylene blue/ethanol formulation in ligature-induced experimental periodontitis in diabetic rats: short-time evaluations	36
Abstract	38
Introduction	39
Material and methods	41
Statistical analysis	45
Results	45
Discussion	47
Acknowledgements	51
References	52
4 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	77
ANEXO B - Normas da Revista <i>Journal of Periodontal Research</i>	78

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória que acomete os tecidos de suporte dos dentes e, caso não tratada pode resultar, ao longo do tempo, na perda do elemento dentário. A periodontite é resultante da interação entre um biofilme periodontopatogênico aderido às superfícies dentárias e um hospedeiro suscetível (KORNMAN, 2008). Apresenta alta prevalência nas populações, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento (ALBANDAR et al., 1999; EKE et al., 2016; SUSIN et al., 2004), tendo importante impacto na qualidade de vida das pessoas (AL-HARTHI et al., 2013).

Diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica crônica caracterizada por níveis elevados de açúcar no sangue resultante ou de uma falta de produção de insulina ou resistência à insulina, alterações estas que impedem que a glicose sanguínea seja absorvida pelas células do organismo, permanecendo disponíveis na corrente sanguínea (MIRZA et al., 2010; SHIP et al., 2003; WILD et al., 2004). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011), o DM tem sido considerado uma das grandes epidemias mundiais do século XXI e um grande problema de saúde pública. As estimativas globais de prevalência do diabetes têm aumentado ao longo dos últimos 15 anos, com 415 milhões de pessoas sofrendo desta doença em 2015 e com a previsão de que essa condição aumentará para 642 milhões em 2040 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF) DIABETES ATLAS, 2015; GUARIGUATA et al., 2014).

O DM é reconhecido fator de risco para periodontite (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1996), sendo associado com uma maior prevalência e severidade desta doença periodontal (TAYLOR et al., 1998) que é considerada a sexta complicação do DM (LÖE, 1993).

A associação entre periodontite e DM promove uma resposta inflamatória local e sistêmica exacerbada do hospedeiro (LALLA et al., 2000), liberando uma maior quantidade de mediadores inflamatórios como interleucinas, prostaglandinas e fator de necrose tumoral alfa (α) (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992) e consequentemente alterando a integridade e estabilidade estrutural do tecido ósseo e conjuntivo (NANCI & BOSSHARDT, 2006; LORENCINI et al., 2009). No colágeno, este processo é intenso o suficiente para iniciar a degradação da matriz colagenosa do tecido conjuntivo (EJEIL et al., 2003; GOGLY et al., 1997; KESLER et al., 2000;

LORENCINI et al., 2009; SILVA et al., 2008). Essa degradação pode ocorrer de forma quantitativa e é característica notável da periodontite (EJEIL et al., 2003; LORENCINI et al., 2009;). Neste contexto, a degradação do colágeno tem sido considerada um marcador da progressão da periodontite (LORENCINI et al., 2009).

O tratamento *gold standard* para as periodontites consiste na raspagem e alisamento radicular (RAR) (COBB, 2002) que tem como objetivo a desorganização mecânica do biofilme subgengival obtendo-se uma superfície radicular biocompatível para a cicatrização tecidual. Em algumas situações clínicas, esta terapia pode não ser completamente efetiva, impedindo o processo de cicatrização (ALWAELI; ALKHATEEB; AL-SADI, 2013). Fatores como tabagismo (BERGSTRÖM; ELIASSON; DOCK, 2000), características anatômicas do sítio como furcas e áreas de concavidades radiculares (ADRIAENS; DE BOEVER; LOESCHE, 1988; MATIA et al., 1986) e periodontites agressivas (ARWEILER, et al., 2014), podem resultar em menor efetividade do tratamento. Em relação ao DM, pacientes com bom controle metabólico respondem a RAR de forma semelhante quando comparado aos indivíduos não diabéticos (MEALEY & MORITZ, 2003; TERVONEN & KARJALAINEN, 1997). Entretanto, diabéticos não controlados apresentam resposta ao tratamento periodontal menos favorável (SEPPALA et al., 1993; TERVONEN & KARJALAINEN, 1997). Nestas situações clínicas, alternativas terapêuticas adjuvantes ao tratamento convencional, como o uso de antibióticos, vêm sendo utilizadas.

Existem na literatura muitos estudos avaliando os efeitos adjuvantes dos antibióticos sistêmicos associados à RAR em comparação com RAR somente em pacientes diabéticos com bom ou inadequado controle metabólico (GAIKWAD et al., 2013, MIRANDA et al., 2014, O'CONNELL et al., 2008, TSALIKIS et al., 2014). A maioria dos autores não observaram diferenças entre as modalidades terapêuticas independentemente do controle glicêmico dos pacientes (GAIKWAD et al., 2013, O'CONNELL et al., 2008; TSALIKIS et al., 2014). Recentes revisões sistemáticas têm apresentado benefícios clínicos limitados em diabéticos submetidos à RAR associada a antibióticos sistêmicos (GRELLMANN et al., 2016; SANTOS et al., 2015).

Além disso, antibióticos administrados sistemicamente podem causar efeitos colaterais com repercussões sistêmicas, como infecções oportunistas em outros sítios e reações de hipersensibilidade. Ainda, o desenvolvimento de resistência

bacteriana vem limitando a aplicação dos antibióticos e tornou-se um problema emergente. Portanto, o benefício clínico da prescrição de antibióticos sistêmicos e os possíveis eventos adversos decorrentes do seu uso no tratamento das periodontites devem ser considerados na tomada de decisão.

Neste contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) vem tornando-se promissora em estudos em animais (ALMEIDA et al., 2008, GARCIA et al. 2015, KOMERIK, 2003) e em humanos (ALWAELY et al., 2013, ANDERSEN, 2007, BERAKDAR et al., 2012, YILMAZ et al., 2002) como coadjuvante ao tratamento mecânico das periodontites (WOOD et al., 1999). Esta modalidade de terapia tem como vantagem a baixa probabilidade de desenvolver resistência bacteriana. Ensaio clínico randomizado (ECRs) demonstraram efeitos adicionais com a TFDa associada à RAR em comparação com RAR apenas (ALWAELI; AL-KHATEEB; AL-SADI, 2013; BETSY, et al., 2014; BRAUN, et al., 2008; GE et al., 2011; GIANNELLI, et al., 2012). Recentes revisões sistemáticas apontam para resultados estatisticamente significantes a favor da terapia combinada, porém com benefício clínico questionável (SGOLASTRA et al., 2013a; 2013b). Em pacientes diabéticos, ECRs indicaram que a TFDa não proporcionou benefícios adicionais nos parâmetros clínicos (AL-ZAHRANI et al., 2009; MACEDO et al., 2013; RAMOS et al., 2016).

Alternativas para melhorar a efetividade da TFDa vêm sendo pesquisadas. Estudos *in vitro*, verificaram que o efeito TFDa pode ser modificado pelo solvente no qual o fotossensibilizador (Fs) é diluído. A formulação utilizando a água como solvente do Fs azul de metileno (AM) é a mais comumente empregada. De acordo com estudos anteriores, esta formulação resulta em menor produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de oxigênio singleto (GEORGE & KISHEN, 2007), associada a uma curta meia-vida (4 μ s) (MEISEL & KOCKER, 2005), e baixo potencial de difusão entre os tecidos (OCHSNER, 1997) quando comparada à formulações contendo etanol como solvente do AM. Devido a estas alterações nas características fotofísicas e fotoquímicas do AM diluído em etanol, o efeito antimicrobiano TFDa pode ser otimizado (GEORGE & KISHEN, 2007; PROCHNOW et al., 2016). Evidências *in vitro* indicaram que a inclusão de etanol a 20% na formulação do AM aumentou o efeito antimicrobiano da TFDa em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (PROCHNOW et al., 2016), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Enterococcus faecalis* (GEORGE & KISHEN, 2007).

Não existem evidências do efeito da TFDa utilizando uma formulação com AM diluído em etanol sobre desfechos periodontais. O objetivo do presente estudo foi avaliar esta possibilidade em um modelo periodontite experimental induzida por ligadura em ratos diabéticos. Nossa hipótese é de que a TFDa com uma formulação experimental de AM em etanol a 20% poderá limitar a destruição periodontal provocada pela periodontite induzida por ligadura em ratos diabéticos quando comparado à RAR e TFDa usando AM diluído em água.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (TFDA)

2.1.1 Aspectos gerais: histórico, definição, características

O uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) com o objetivo de inativação de microorganismos 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 verificou 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 que consiste na aplicação de uma substância fotossensível, conhecido como fotossensibilizador (Fs), que quando ativado por luz de comprimento de onda apropriado e na presença de oxigênio molecular gera espécies de oxigênio citotóxicas às células-alvo. O Fs ativado é capaz de danificar componentes celulares como membranas (STARK, 2005), proteínas (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004) e ácidos nucleicos (RAVANAT et al., 2001), resultando na morte bacteriana (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; MAISCH, 2007; ROLIM et al., 2012; SOUKOS; GOODSON, 2011).

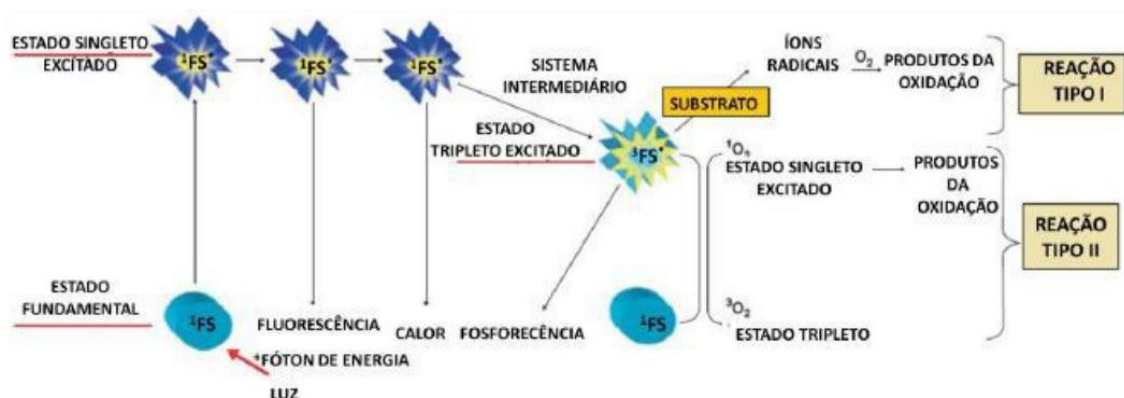
A TFDa apresenta alta seletividade, pois somente células que são expostas ao Fs e a luz sofrerão efeito citotóxico (KONAN; GURNY; ALLEMANN, 2002). O Fs age produzindo oxigênio singleto, que não possui especificidade por sítio de ação, reagindo com vários substratos biomoleculares, o que torna o desenvolvimento de cepas resistentes improváveis (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).

2.1.2 Mecanismo de ação da TFDa

Após o Fs ser ativado pela luz ele absorve energia, passando do seu estado fundamental para o estado singleto excitado. 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 através de dois mecanismos (Figura 1). Reação tipo I - o F_s reage com o substrato do meio ocorrendo abstração de hidrogênio ou transferência de elétrons entre o F_s e biomoléculas gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (OH⁻), os quais podem iniciar reações redox resultando em dano celular; ou Reação tipo II - o F_s reage com o oxigênio molecular em decorrência de uma transferência de energia via colisão entre o F_s no estado tripleto excitado com o oxigênio molecular 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 F_s utilizado (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Figura 1. Mecanismo de ação da TFDa; reações Tipo I e Tipo II.



Fonte: (Adaptado de Soukos & Goodson, 2011).

2.1.3 Fotossensibilizadores

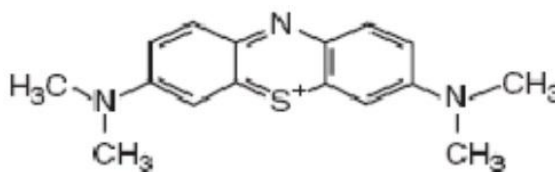
O fotossensibilizador ideal para aplicação na TFDa deve possuir alto rendimento quântico no estado tripleto para obtenção de grande concentração de oxigênio singleto, alta afinidade de ligação aos microorganismos, amplo espectro de ação, baixa afinidade de ligação às células teciduais, evitando riscos aos tecidos do hospedeiro, baixa probabilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana, risco mínimo de promover processos mutagênicos e lipofilicidade (solubilidade relativa em água e lipídeos) e baixa toxicidade. Outros fatores mais específicos 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 singleto (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 toluidina (AT) e o azul de metileno (AM). Fenotiazinas possuem fototoxicidade a tumores, bactérias, vírus e outros microorganismos, com um elevado potencial de aplicação e variedade na área clínica (HARRIS et al., 2005). Fs derivados de fenotiazinas com comprimentos de onda longos e intensidade de absorção, aliados a uma ampla eficiência de produção do oxigênio singleto faz desta classe uma alternativa atraente para uso na TFDa.

2.1.4 Azul de metileno

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

Figura 2. Estrutura molecular do azul de metileno. Fonte: Buck, S.T.G 2009.



Azul de metileno

Fonte: Buck, S.T.G 2009.

O AM é o protótipo das fenotiazinas com baixa toxicidade às células humanas, com máxima absorção na faixa do comprimento de onda entre 600 e 900nm, tendo seu pico de absorção em 665nm, janela terapêutica desejável no tratamento de condições humanas (HARRIS et al., 2005).

A carga positiva e a geometria planar do AM permite sua intercalação com a estrutura do ácido desorribonucleico (DNA), especialmente em regiões ricas em guanina-citosina, levando a uma quebra da cadeia e degradação oxidativa das bases via oxigênio singlete (WAINWRIGHT, 2000; 2002). Entre os componentes celulares bacterianos, o AM acumula-se preferencialmente na mitocôndria visto que este Fs 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, chamados dímeros que ocorrem até mesmo quando o Fs é diluído em água (GABRIELLI et al., 2004; SEVERINO et al., 2003; USACHEVA et al., 2001). Em relação ao AM, as características fotofísicas e fotoquímicas são moduladas pela quantidade e o tipo de dímeros formados, atuando na competição pelo estado tripleto excitado do Fs entre transferências eletrônicas (Fs-Substrato) e energéticas (FS-Oxigênio) (SEVERINO et al., 2003). As moléculas na forma de dímeros apresentam menor efetividade na captação de energia (PATIL; PAWAR; TALAP, 2000) do que na forma de monômero, atuando predominantemente nas reações envolvendo trocas eletrônicas com o substrato (reação tipo I), com menor produção de oxigênio singlete (reação tipo II). Assim, considerando-se 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).

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

Muitos estudos *in vitro* usando TFDa têm sido conduzidos nos últimos anos, comparando seus efeitos na presença de bactérias em suspensão (planctônicas) (USACHEVA et al., 2001), ou em biofilmes (CHAN & LAI, 2003; FONTANA et al., 2009; GEORGE; KISHEN, 2007; 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).

ECRs comparando RAR *versus* RAR associada à TFDa (terapia combinada) utilizando como Fs o AM (BALATA et al., 2013; BETSY et al., 2014; 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) para o tratamento de periodontites vêm sendo realizados.

Em casos de periodontite crônica os estudos mostram resultados divergentes. 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; GE et al., 2011; 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 à 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 clínico tenha sido verificado.

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.

Estudos clínicos avaliando TFDa utilizaram como Fs, AM ou AT diluídos em água. Há evidências de que esta formulação resulta em limitada produção de oxigênio singlete, baixa difusão nos tecidos e curta meia vida do mesmo (HAIDEKKER et al., 2005; MEISEL & KOCHER, 2005).

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

O solvente utilizado na formulação do Fs também pode modificar a meia-vida do oxigênio singlete. George & Kishen (2007), demonstraram *in vitro* que a inclusão de um solvente menos polar do que a água, como o etanol, aumentou o efeito antimicrobiano da TFDa frente a biofilmes de *Enterococcus faecalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Este achado foi atribuído a uma maior produção de oxigênio singlete, aumento da sua meia vida (20 μ s) e a menor agregação molecular (dimerização) do AM na presença de etanol, mesmo em altas concentrações. Este resultado está de acordo com os de MEISEL & KOCHER 2005, que encontraram uma maior meia vida de oxigênio singlete em etanol (20 μ s) do que em água (4 μ s). Prochnow et al. (2015), demonstraram que a inclusão de etanol na formulação do AM aumentou o efeito antimicrobiano da TFDa sobre biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2 PERIODONTITE

2.2.1 Etiopatogenia

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória resultante da interação entre um biofilme bacteriano aderido às superfícies dentárias e um hospedeiro suscetível (KORNMAN, 2008). Esta patologia acomete os tecidos de suporte dos dentes

resultando na perda de cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar e caso não tratada, ao longo do tempo pode resultar na perda do elemento dentário.

A progressão deste processo é altamente dependente da resposta imunoinflamatória gerada pelo hospedeiro aos produtos microbianos (SCHENKEIN, 2006). Esta resposta caracteriza-se por alterações vasculares, celulares e enzimáticas. Os fenômenos vasculares são caracterizados pelo aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e presença de exsudato. As células predominantes são os leucócitos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos. A ativação leucocitária resulta em fagocitose das substâncias nocivas, produção de mediadores que amplificam a reação inflamatória e produção de substâncias que incluem enzimas lisossômicas e espécies reativas de oxigênio (EROs) (KUMAR et al., 2008).

A produção de mediadores inflamatórios como citocinas, prostaglandinas e metaloproteinases da matriz sinalizam atividades celulares associadas com a reabsorção óssea e a degradação da matriz extracelular do tecido conjuntivo gengival e do ligamento periodontal, resultando na perda dos tecidos de suporte dos dentes (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992).

2.2.2 O metabolismo do colágeno relacionado à periodontite

O colágeno é uma macromolécula composta de três cadeias polipeptídicas de aminoácidos, entrelaçadas umas com as outras em uma configuração helicoidal sendo o componente mais importante no reparo de tecidos (THORNTON; BARBUL, 1997). À medida que as moléculas de colágeno se agrupam, sua composição passa a receber denominações diferentes como colágeno, procolágeno, microfibrilas, fibrilas e fibras colágenas (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A matriz do tecido conjuntivo do periodonto apresenta como principal componente estrutural e funcional o colágeno (KESLER et al., 2000) e a sua remodelação é essencial para a manutenção da função normal deste tecido (LINDHE, 1999; REYNOLDS; HEMBRY; MEIKLE, 1994). Na periodontite, ocorre um desequilíbrio entre as ações de produção e degradação da matriz colagenosa do tecido conjuntivo (EJEIL et al., 2003, GOGLY et al., 1997; KESLER et al., 2000; LORENCINI et al., 2009; SILVA et al., 2008). Nesta situação, a destruição do

colágeno tem sido considerada um marcador da progressão desta doença periodontal (LORENCINI et al., 2009).

2.2.3 O metabolismo ósseo relacionado à periodontite

A reabsorção óssea alveolar é mediada por osteoclastos e ocorre concomitante com a perda de inserção do tecido conjuntivo durante a progressão da doença. Osteoclastos são células multinucleadas que se desenvolvem a partir de células progenitoras de osteoclastos e exibem habilidades específicas para degradar componentes orgânicos e inorgânicos do osso. São ativados e regulados por citocinas pró-inflamatórias e/ou pelo sistema RANK/RANKL/OPG (COCHRAN, 2008). Os mecanismos envolvidos na reabsorção óssea respondem a sinais de células inflamatórias e iniciam a degradação óssea com objetivo de manter uma distância “segura” da periferia do infiltrado inflamatório (LINDHE; HAMP; LÖE, 1975).

2.2.4 Tratamento periodontal: alternativas, vantagens e desvantagens

O tratamento *gold standard* das periodontites consiste na remoção mecânica do biofilme subgengival e de depósitos mineralizados por meio de RAR (COBB, 2002). Com esta terapia, 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 permite 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 têm relatado alguns pacientes que receberam tratamento periodontal convencional e mesmo sob manutenção periódica, apresentaram sítios sem resolução da inflamação, com a persistência de periodontopatógenos em altos níveis, e, conseqüentemente, com a evolução da doença periodontal (DP) (LANG et al., 1996; SERINO et al., 2001).

Fatores de ordem local ou sistêmica podem modificar a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro frente DP, tendo potencial para modificarem a suscetibilidade à doença, a microbiota presente no biofilme subgengival, a

apresentação clínica, a progressão da mesma, e até mesmo a resposta ao tratamento (KULKARNI & KINANE, 2014).

Dentre os fatores de ordem local temos o fumo como um fator de risco para a periodontite. Fumantes têm uma resposta imune inferior e apresentam cicatrização comprometida após o tratamento, quando comparado com não fumantes e ex-fumantes (QUEIROZ et al., 2013). Papantonopoulos (1999) constatou que um maior percentual de pacientes fumantes necessitou de tratamento adicional seis à 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 não fumantes.

Com relação a fatores sistêmicos que podem modificar a resposta ao tratamento periodontal, destaca-se o DM. A prevalência e a severidade da periodontite são maiores nos indivíduos diabéticos do que em não diabéticos (JIMENEZ et al., 2012). Esta relação parece ser bidirecional, com diabetes sendo um fator de risco para periodontite e a severidade da periodontite um fator que influencia o controle glicêmico e o desenvolvimento de complicações em pacientes diabéticos (CHAVARRY et al., 2009; LALLA et al., 2011). Além disso, estudos epidemiológicos em pacientes diabéticos não controlados demonstraram um aumento ainda maior na suscetibilidade à periodontite (MEALEY & OATES, 2006; TERVONEN & OLIVER, 1993).

Pacientes com periodontite agressiva, doença que geralmente acomete indivíduos mais jovens e com um caráter de destruição dos tecidos de suporte mais rápido, não apresentam uma boa resposta ao tratamento mecânico somente (ARWEILER, et al., 2014). Em determinados casos, a resolução da inflamação e redução da profundidade de sondagem falham, e isso pode ser explicado, em parte, devido à extensa colonização de microrganismos periodontopatogênicos como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* (RENVERT et al., 1990; SAGLIE; MARFANY; CAMARGO, 1988). Esses microrganismos dificilmente são eliminados apenas com RAR. Neste sentido, a recorrência ou a progressão da doença parece estar mais relacionada a uma resposta exacerbada deste hospedeiro suscetível.

Além disso, a inacessibilidade dos instrumentos manuais em regiões de relativa complexidade anatômica, como concavidades, fissuras, região de furca e até mesmo em bolsa profunda dificultam a adequada descontaminação mecânica das superfícies (ADRIAENS; DE BOEVER; LOESCHE, 1988; MATIA et al., 1986). Consequentemente, a carga bacteriana remanescente pode impedir o processo de cicatrização tecidual. (ALWAEELI; AL-KHATEEB; AL-SADI, 2013).

Nestas situações clínicas, o uso de antimicrobianos vem sendo proposto, de forma local ou sistêmica, como um método adicional à RAR, com o objetivo de reduzir a carga bacteriana e consequentemente trazer benefícios adicionais à terapia convencional (SLOTS et al., 2004).

Em metanálises, Sgolastra e colaboradores (2012a, 2012b) verificaram diferenças estatisticamente significantes a favor da RAR associada ao uso de antibiótico sistêmico comparado a RAR 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 existiam diferenças entre a eficácia nos diferentes tipos de antibióticos sistêmicos, em combinação com RAR versus RAR somente, em pacientes com periodontite crônica. O ganho adicional no nível de inserção clínica foi 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 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.

Grellmann e colaboradores (2016) analisaram através de metanálise se o tratamento com antibióticos sistêmicos como adjuvante à RAR resultaria em benefícios nos desfechos clínicos periodontais em indivíduos diabéticos com periodontite em comparação a RAR somente. A terapia combinada não resultou em benefício clínico quanto ao ganho de inserção clínica (-0,14mm, $p=0,11$, IC 95%, -0,32, 0,03), redução de sangramento à sondagem (-1,91%, $p=0,39$, IC 95%, -6,32, 2,51), e índice de placa (4,01%, $p=0,05$, IC 95%, -0,04, 8,07).

Em metanálise, Santos e colaboradores (2015), compararam o efeito de antibióticos sistêmicos adjuvantes a RAR *versus* RAR sobre em pacientes diabéticos. Benefícios estatísticos a favor da terapia combinada foi observado

redução da profundidade de sondagem (-0,22mm, IC 95%, -0,34,-0,11) e do sangramento à sondagem (4%, IC 95%, -7,-1). Nenhum benefício adicional foi observado na terapia combinada sobre ganho de inserção clínica.

Antibióticos administrados sistemicamente podem apresentar repercussões sistêmicas, como infecções oportunistas em outros sítios e reações de hipersensibilidade. Além disso, o desenvolvimento de resistência de bacteriana 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). O aumento da resistência a antibióticos têm gerado interesse entre as autoridades de saúde, uma vez que a infecção por sorotipos resistentes aos antibióticos leva a falhas no tratamento, aumento dos custos de saúde e pode ser associada com um aumento da mortalidade. O controle na prática de prescrição de antibióticos e o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas são medidas que podem controlar a ascensão da resistência (VALENZUELA & QUADROS, 2009). 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 limitados relacionados ao uso de antibióticos sistêmicos, a busca por novas terapias que possam oferecer uma alternativa ao uso desses fármacos torna-se necessária. Neste cenário, 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).

2.2.5 Uso de modelos de periodontite experimental em animais

Em modelos de periodontite experimental em animais, o uso coadjuvante da TFDa à RAR tem demonstrado benefícios adicionais em comparação ao tratamento mecânico somente, observando-se 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 por meio de ligadura no primeiro molar inferior tem se mostrado suficiente para observar perda óssea 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), ratos submetidos a nicotina (GARCIA et al., 2011), e em animais ovariectomizados (GARCIA et al., 2013b).

Um recente estudo de De Molon e colaboradores (2014) avaliou a resposta do hospedeiro em diversos modelos experimentais de indução de periodontite. Segundo os autores, os modelos de injeção de *P. gingivalis* e a colocação de ligadura constituem os modelos mais representativos de doença periodontal. Sendo que apenas o modelo de ligadura promoveu perda óssea alveolar significativa após 7 dias, mantendo esta durante o período de estudo (15 e 30 dias).

Além disso, Garcia et al. (2015) encontraram através de análises histopatológicas uma grande extensão e severidade da resposta inflamatória e desorganização tecidual na região de furca em ratos após a remoção da ligadura mantida por 7 dias e que não receberam qualquer tipo de tratamento, tornando evidente que a colocação de ligadura foi efetiva no desenvolvimento da periodontite experimental.

Chang e colaboradores (2013) descreveram as alterações periodontais que ocorrem em ratos sistemicamente normais e diabéticos após a indução de periodontite. DM foi induzida por meio de injeção de estreptozotocina e a periodontite pela colocação de ligadura e manutenção da mesma por diferentes períodos: 7, 14 e 21 dias. Análises histológicas, em microtomografia computadorizada e imuno histoquímicas foram realizadas após esses períodos. Os autores verificaram que tanto para ratos sistemicamente normais quanto para os diabéticos significativa perda óssea ocorre em 7 dias.

Estes achados concordam com os de Graves et al. (2008). Os autores observaram que a ligadura favorece o acúmulo de placa, a ulceração do epitélio e invasão bacteriana dos tecidos periodontais. As citocinas produzidas pela resposta do hospedeiro frente aos produtos bacterianos estimulam alterações no epitélio e

provocam uma reação inflamatória nos tecidos periodontais (GRAVES; OATES; GARLET, 2011), promovendo inflamação, perda de inserção e perda óssea alveolar em um período de 7 dias (THEODORO et al., 2015).

Inúmeros desfechos são utilizados em modelos experimentais de periodontite em ratos quando condições sistêmicas, fumo, imunossupressão ou modalidades de tratamento são avaliadas. Dentre estes, destacam-se a análise histológica, onde se compara a resposta inflamatória tecidual com relação à organização padrão das fibras colágenas e angiogênese nos diferentes tratamentos (CARVALHO, et al., 2011; FERNANDES et al., 2009; GARCIA et al., 2012b), 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), além de 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 beta), 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).

2.3 DIABETES MELLITUS (DM)

2.3.1 Conceito, classificação, complicações

Diabetes mellitus (DM) descreve uma desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica que acarreta alterações do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas resultante de defeitos na ação ou secreção da insulina, ou ambos. Os sintomas da hiperglicemia acentuada no paciente diabético incluem poliúria (aumento do volume urinário) polidipsia (aumento da ingestão hídrica), polifagia (aumento da ingestão alimentar) e significativa perda de peso (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

A classificação atual do DM baseia-se na etiologia e não no tipo de tratamento, devendo-se extinguir os termos “diabetes insulino-dependente” e “diabetes insulino-independente” (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD), 2011b). A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Associação Americana de

Diabetes (American Diabetes Association - ADA) propõem a classificação em classes clínicas: Tipo 1, Tipo 2, Gestacional e Outros Tipos Específicos. Existe ainda outra condição clínica chamada pré-diabetes ou, modernamente, sob o título de categoria de risco aumentado de DM, que engloba as condições anteriormente denominadas “glicemia de jejum alterada” e “tolerância diminuída à glicose” (SBD, 2011a; SBD, 2011b).

O DM Tipo 1 corresponde 5% a 10% dos casos e, caracteriza-se pela destruição das células beta (β) pancreáticas, resultando na deficiência absoluta de secreção de insulina. Na maioria dos casos, essa destruição é mediada por autoimunidade (DM1 autoimune), porém há casos em que não existem evidências de processo autoimune (DM1 idiopático) (SBD, 2011b). O DM Tipo 2 é o tipo mais comum e corresponde de 90% a 95% dos casos e, caracteriza-se por defeitos na ação (resistência à ação da insulina) e na secreção da insulina. Em geral, ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, podendo haver predomínio de um deles (SBD, 2011b).

O DM, se não tratado, pode levar a múltiplas complicações que incluem retinopatia com possíveis danos à visão, nefropatia podendo levar à insuficiência renal, neuropatia periférica com risco de ulcerações no pé e amputações. Pacientes com diabetes têm risco aumentado de incidência de aterosclerose e doença arterial periférica, uma vez que o metabolismo lipídico está alterado (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011), o DM tem sido considerado uma das grandes epidemias mundiais do século XXI e um grande problema de saúde pública. As estimativas globais de prevalência do diabetes têm aumentado ao longo dos últimos 15 anos, com 415 milhões de pessoas sofrendo desta doença em 2015 e com a previsão de que essa condição aumentará para 642 milhões em 2040 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF) DIABETES ATLAS, 2015; GUARIGUATA et al., 2014). O Brasil ocupa hoje o quarto lugar no ranking mundial em relação ao número de portadores desta desordem metabólica, abrigando cerca de 14,3 milhões de diabéticos e com estimativas de alcançar 23,3 milhões em 2040 (IDF DIABETES ATLAS, 2015). Este panorama é notoriamente relevante por atingir proporções alarmantes, com altos índices de mortalidade e morbidade e, ainda, implicando em alto custo financeiro por cuidados médicos e queda de produtividade (GILMER et. al., 2005).

2.3.2 Periodontite e diabetes mellitus

A periodontite, que é a infecção oral mais comum em seres humanos e uma das principais causas de perda de dentes em adultos, tem sido considerada uma complicação do diabetes mellitus (LÖE., 1993; PIHLSTROM; MICHALOWICS; JOHNSON, 2005). Grande número de investigações fornecem evidências de que diabetes tipos 1 e 2 aumentam o risco, severidade e extensão da periodontite (COLE et al., 2008; EMRICH; SHLOSSMAN; GENCO, 1991; LALLA et al., 2006; O'CONNEL et al., 2008; PAPAPANOU, 1996; TERVONEN & KARJALAINEN, 1997). A explicação para isso é fornecida por um número de alterações celulares e moleculares que ocorrem no periodonto como uma consequência de hiperglicemia prolongada (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1996), causando efeitos sobre a resposta inflamatória, sistema inume e reparo tecidual. Estas alterações têm potencial para modificar a suscetibilidade à doença, microbiota da placa bacteriana, apresentação clínica da periodontite, progressão e resposta ao tratamento.

A associação de periodontite e DM é capaz de reduzir a função de quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e a síntese e maturação do colágeno (via ação de metaloproteinases); e promover a formação de produtos finais de glicolisação avançada (AGEs) aos quais ligam-se aos receptores (RAGEs) em diversas células. Como consequência, as células expressam fenótipos hiper inflamatórios e sintetizam maior quantidade de mediadores inflamatórios (interleucinas, prostaglandinas e fator de necrose tumoral α), cujos efeitos podem resultar em ativação de osteoclastos e colagenases, modulando a destruição dos tecidos ósseo e conjuntivo (BEIKLER et al. 2002, BOWERSOX, 1986; CAHILL, 1985). Estes mecanismos podem resultar em diminuição na resistência do hospedeiro, cicatrização prejudicada, e resposta inflamatória exagerada, exacerbando a destruição periodontal em pacientes com diabetes (LALLA et al., 2000). Estes efeitos, contudo, variam de acordo com o tipo, duração, controle metabólico da doença, cuidados com os dentes e hábitos, como por exemplo, o tabagismo (LINDHE; LANG; KARRING, 2010; TERVONEN & KARJALAINEN, 1997).

Indivíduos diabéticos com complicações sistêmicas mais avançadas como retino e neuropatia, apresentam periodontite mais grave e com maior frequência

(BACIC e tal., 1988; GLAVIND et al., 1968; KARJALAINEN et al., 1994; ROSENTHAL et al., 1988; RYLANDER et al., 1986).

Evidências indicam que existe uma associação entre o DM não controlado e a periodontite. Tervonen & Karjalainen (1997), compararam após um ano a resposta ao tratamento periodontal em diabéticos com bom, moderado e inadequado controle metabólico. Pacientes com inadequado controle glicêmico apresentaram um padrão mais severo da doença, quando comparado aos pacientes com bom controle glicêmico, além de uma rápida recorrência da doença em determinados sítios. Além disso, a perda de inserção periodontal tem sido encontrada mais frequentemente em diabéticos não controlados, do que em indivíduos com a glicemia controlada (WESTFELT et al., 1996). Estes resultados vão de encontro com os achados de Seppala e colaboradores, em 1993, os quais encontraram maior perda de inserção e maior perda óssea alveolar em diabéticos não controlados em torno de 1 a 2 anos após o tratamento periodontal.

2.3.3 Modelo experimental de diabetes mellitus em animais

Os modelos animais de diabetes têm sido usados extensivamente na obtenção do esclarecimento sobre esta doença (KIRSTEN et al., 2010). A indução de diabetes experimental em modelos animais é realizada através do uso de substâncias que destroem seletivamente as células β do pâncreas, produtoras de insulina. As substâncias mais utilizadas para indução do diabetes em roedores são a aloxana e a estreptozotocina (SZKUDELSKI, 2001). Estas drogas são citotóxicas e análogas à glicose (LENZEN, 2008). A dose destes fármacos para indução do diabetes depende da espécie do animal e do seu peso (SZKUDELSKI, 2001).

Roedores são os animais mais utilizados para diabetes mellitus experimental, devido ao fácil acesso, manuseio e habitação, e menor custo em comparação com outras espécies (CHEN & WANG, 2005).

Ambos os agentes diabetogênicos, aloxana e estreptozotocina, induzem uma deficiência da produção de insulina pela morte das células β . A aloxana tem sido considerada de inadequada seletividade de ação (SZKUDELSKI, 2001). A estreptozotocina apresenta maior estabilidade química quando comparada à aloxana e tem sido o agente mais utilizado para reprodução do diabetes em roedores (LENZEN, 2008). Além disso, Schnedl et al. em 1994 demonstraram que a

toxicidade e especificidade (JUNOD et al., 1967, 1969) da STZ dirigida para células β é maior devido à sua molécula apresentar similaridade com a da glicose .

A estreptozotocina (STZ) é um agente antimicrobiano, glicosamina-nitrosureia, isolado do fungo *Streptomyces achromogenes* sendo utilizado tanto para induzir diabetes tipo 1 como tipo 2, dependendo da dose, via de administração e concentração (NEGRI, 2005; SZKUDELSKI, 2001). Em ratos, a STZ provoca o bloqueio de forma irreversível da produção de insulina nas células β do pâncreas, causando grave hiperglicemia, induzindo o DM semelhante ao tipo 1. Uma dose única no rato recém-nascido pode produzir um modelo experimental de DM tipo 2, caracterizado por uma deficiência na síntese de insulina no pâncreas, diminuindo sua liberação em resposta à glicose (MARLES & FARNSWORTH, 1995).

Em relação à dosagem de STZ, em doses altas, de 160 a 250 mg/kg, apresenta efeito citotóxico direto nas células β de camundongos causando dano no ácido desoxirribonucleico (DNA). Em doses sub-diabetogênicas de 40mg/kg, por exemplo, a STZ pode produzir insulinite pancreática, ocasionando inflamação com morte progressiva das células β levando também ao diabetes mellitus (VAREDA, 2013). A diferença entre as dosagens é que em doses baixas de STZ o aparecimento da lesão inflamatória nas ilhotas pancreáticas ocorre através da reação imune mediada por células T (LENZEN, 2008), ao invés do dano direto ao DNA devido à ação citotóxica nas células β observado em doses elevadas (RAYAT GR, 2000; HAGEMAN, BUSCHARD, 1994.). É importante ressaltar que a STZ apresenta um modelo mais tóxico quando administrada em dose única e elevada e por ser um fármaco carcinogênico pode induzir o desenvolvimento de tumores no rim, fígado e pâncreas de ratos (BOLZAN & BIANCHI, 2002; SZKUDELSKI, 2001). Para não colocarmos em risco a sobrevivência dos roedores, dosagens pequenas e consecutivas, se necessárias, também são capazes de induzir diabetes por insulinite em camundongos (LIKE & ROSSINI, 1976).

A via de administração de STZ para indução de diabetes experimental pode ser tanto por via endovenosa (EV) (DELFINO et al., 2002; KIM et al., 2014) quanto intraperitoneal (IP) (BAHMANZADEH et al., 2016; SILVA et al., 2015; SIMON & WEST, 1992). Por via EV (veia sublingual ou caudal), a dose de 60mg/Kg promove diabetes severo e estável por 40 semanas (DELFINO et al., 2002). Além disso, Kim et al., 2014 observaram que a dose de 50mg/Kg EV foi suficiente para induzir diabetes por 20 dias. A administração de STZ via IP em ratos Wistar, encontrou

diabetes leve e instável na dose de 45mg/Kg, porém na dose 60mg/Kg encontrou-se diabetes em 100% dos animais e foi duradouro (SIMON & WEST, 1992). Estudos mais recentes como o de Bahmanzadeh et al., 2016 e Silva et al., 2015 induziram DM com uma dose IP de 80mg/Kg e 90mg/Kg, respectivamente. Bahmanzadeh et al., 2016 observou que três dias após a administração, os animais já apresentavam glicemia superior à 270mg/dL, assim como Silva et al., 2015 que após um único dia, já verificou um quadro diabético. Devido a esta discordância encontrada entre os estudos, recomenda-se a via IP pela sua natural facilidade (DELFINO et al., 2002).

Existem na literatura, diferentes protocolos experimentais para a indução do DM e posterior indução da DP (ALMEIDA et al., 2008b; CHANG et al., 2013; NISHIKAWA et al., 2012). Almeida e colaboradores (2008b), induziu DM e após 7 dias induziu periodontite em ratos Wistar, ao contrário de Nishikawa e colaboradores (2012), que induziu DM e após 14 dias induziu periodontite em ratos Sprague-Dawley. Entretanto, no estudo de Chang et al. (2013), a DM foi induzida e somente após 21 dias a doença periodontal foi induzida. Com o objetivo da perpetuação do estado diabético durante todo o período experimental, a indução do DM e após 14 dias a indução da DP (NISHIKAWA et al., 2012) parece ser uma alternativa segura e equilibrada para o estabelecimento e manutenção do modelo experimental de DM em roedores.

3 ARTIGO - ADJUNCTIVE ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY USING METHYLENE BLUE/ETHANOL FORMULATION IN LIGATURE-INDUCED EXPERIMENTAL PERIODONTITIS IN DIABETIC RATS: SHORT-TERM EVALUATIONS.

Este artigo será submetido ao periódico *Journal of Periodontal Reserach*, Wiley Online Library, ISSN: 1600-0765, Fator de impacto = 2.474; Qualis A2. As normas para publicação estão descritas no Anexo B.

Adjunctive antimicrobial photodynamic therapy using methylene blue/ethanol formulation in ligature-induced experimental periodontitis in diabetic rats: short-term evaluations

Running title: MB/ethanol formulation in diabetic rats

Silvana Martins Rodrigues¹, Cibele Bruno Campagnolo¹, Patricia Cabral Passos¹, Danilo Antônio Milbradt Dutra¹, Roberto Marinho Maciel², Cristiane Cadernatori Danesi², Karla Zanini Kantorski¹

¹ Graduate Program in Oral Science, Periodontology Unit, School of Dentistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil.

² Graduate Program in Oral Science, Pathology Department, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil.

Corresponding author:

Karla Zanini Kantorski, PhD, Associate Professor.

School of Dentistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil.

Marechal Floriano Peixoto Street 1184, Santa Maria, Rio Grande do Sul, CEP: 97015-372, Brazil.

Tel: +55.55.3220.9284

email: kzkantorski@hotmail.com

Keywords: alveolar bone loss; periodontal disease; scaling and root planning; lasers

Abstract

Background and Objective: *In vitro* evidences showed methylene blue (MB) dilution in ethanol improves the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) effect on bacterial-biofilm. We hypothesized that aPDT with MB dissolved in ethanol 20% could limit periodontal destruction provoked by ligature in diabetic rats when compared to scaling and root planing (SRP) and aPDT using MB/water.

Material and Methods: Forty male Wistar rats received streptozotocin intraperitoneal injections. After 14 days, 5 animals were allocated in the non-ligate group (CG), and 35 animals received ligature at the first mandibular molar. After 7 days, the ligature was removed. Animals were randomized into 4 groups: LG (without treatment), SRPG (SRP), aPDTW (SRP and aPDT-0.01% MB in water), and aPDTEt (SRP and aPDT-0.01% MB in water/ethanol/carboxymethylcellulose). Animals were euthanized at 7 days. Histometric and hematological data were statistically analyzed ($p < 0.05$).

Results: Animals percentage that presented mild and severe inflammatory infiltrate was: 10% and 40% for SRPG; 20% and 30% for aPDTW; and 50% and 0% for aPDTEt, respectively. SRPG presented statistically higher count of WBC, lymphocytes and monocytes than all the other groups. Bone loss (BL) of aPDTEt animals (0.08 ± 0.03) was significantly lower than SRPG animals (0.30 ± 0.18). No statistical difference was observed between aPDTEt and aPDTW (0.21 ± 0.15); and between aPDTW and SRPG. aPDT showed BL statistically similar to the animals without periodontitis (0.05 ± 0.02). aPDTEt showed collagen content significantly higher than LG and presented higher mean values than CG. Collectively, our findings showed aPDTEt presented promising results.

Conclusion: We concluded that adjunctive aPDT using MB solubilized ethanol could have potential for the periodontal treatment in diabetic patients. We suggest further studies with more complex animal models and with higher follow-up to confirm our initial findings.

Introduction

Diabetes mellitus is a global public health problem. The worldwide estimative of diabetes prevalence has increased throughout 15 years. In 2015, 415 million people suffered from this illness and with the possibility that this condition will magnify for 642 million in 2040 (1). Diabetes predisposes to complications such as nephropathy, neuropathy, retinopathy, vascular disease and impaired wound healing (2).

Data from the Global Burden of Disease Study in 2010 showed that the global burden of periodontal disease, oral cancer and caries increased markedly from 1990 to 2010, in parallel with the major non-communicable diseases like diabetes. Oral diseases and non-communicable diseases are interlinked through common risk factors and underlying infection- and inflammatory-pathways (3).

Studies showed diabetes mellitus is modifying factors for periodontal diseases, particularly in patients with poor glycemic control (4, 5, 6, 7, 8, 9). A number of mechanisms have been proposed for the role of diabetes into periodontal disease. Endothelial dysfunction (10), decreased chemotaxis (11), reduced phagocytosis (12), increased production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 (13, 14), and amplified superoxide's production by increasing the oxidative stress (15) comprise the vascular- and cellular- changes. Diabetic patients have reduced collagen synthesis, imbalance between tissue matrix metalloproteinase and inhibitor of matrix metalloproteinase, and retarded the synthesis of glycosaminoglycans. The impaired healing verified in patient's diabetes, has implications for the outcomes of periodontal therapy (2).

Despite scaling and root planing (SRP) to be the *golden standard* treatment for periodontitis (16), this therapy may be ineffective in some clinical conditions such as diabetes mellitus (2), particularly in patients with poor glycemic control (17). Systematic antibiotics adjunctive therapy has showed limited benefits in diabetic patients who have periodontitis (18, 19). Moreover, the need to overcome conventional antimicrobials due to multidrug-resistance among pathogenic microorganisms has triggered exploration for novel and unconventional approaches to control microbial infections.

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been investigated as adjunctive therapy to the SRP. aPDT involves delivering visible light of the appropriate wavelength to excite a photosensitizer (Ps) molecule for its excited

singlet state. This excited state may then undergo intersystem crossing to the slightly lower energy, but longer lived, triplet state, which may react further by one or both of two pathways: Type 1: it involves electron-transfer reactions from Ps triplet state with the participation of a substrate to produce radical ions that can react with oxygen to produce reactive oxygen species; and Type 2: it involves energy transfer from Ps triplet to molecular oxygen to produce singlet oxygen (20, 21). These products oxidize biological molecules and cause lethal damage to bacteria.

Past animal studies observed that aPDT successfully controlled the progression of experimental periodontitis in rats, reducing the local inflammatory infiltrate and the bone loss (BL) (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31). But, the outcomes of clinical trials are inconsistent. Systematic reviews suggested the adjunctive aPDT provides modest benefits and not stable over the time when comparing to SRP (32, 33, 34). Clinical trials showed the benefits from adjunctive aPDT are doubtful in healthy systemically-, smokers-, and diabetic- patients (35, 36, 37). Recently, one study showed adjunctive aPDT promotes advantage on reducing moderate pockets in single rooted teeth in diabetic patients (38). Therefore, strategies to optimize the aPDT effect on periodontal outcomes are necessary.

In vitro studies found the aPDT effect could be modulated by solvent in which the Ps is dispersed. The formulations commonly employed water use (water) as solvent for MB. Previous studies observed these formulations result in lower reactive oxygen species and singlet oxygen production (39), reduced half-life (4 μ s) (40), and low diffusion potential (41) when compared to experimental formulations containing ethanol. Owing to these changes in the photophysical and photochemical characteristics of MB diluted in ethanol, its presence may enhance the aPDT antimicrobial effect (39, 42). *In vitro* evidences showed the 20% ethanol inclusion in the MB formulations reduced the *Pseudomonas aeruginosa*- (42), *Actinomyces actinomycetemcomitans*- and *Enterococcus faecalis*- biofilms (39) viability.

To the best of knowledge, there is no evidence of the aPDT effect using formulations with MB and ethanol on periodontal outcomes. Then, we propose to evaluate this possibility in a ligature model to induce experimental periodontitis in diabetic rats. In this study, we hypothesized that aPDT with an experimental formulation of MB/ethanol could limit periodontal destruction provoked by ligature in diabetic rats when compared to SRP and aPDT using MB/water.

Material and methods

Ethical considerations

The experimental protocols followed ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines and were approved by Committee on Animal Research of the Federal University of Santa Maria, Brazil (027/2013). Figure 1 presents the schematic drawing study.

Sample size

A sample of 9 rats/group was estimated to be necessary to show a mean significant difference of 0.40 mm² in the BL area (28, 29) among treatments, assuming a standard deviation of 0.30, power 80%, and significant level of 5%. One rat was added per treatment group for possible loss during the follow-up. For ethical reasons, 5 animals were used for groups that did not receive treatment.

Animals

Forty rats (male, *Rattus norvegicus albinus*, Wistar) which were 90 days old (250-300 g) were housed (5 animals per cage) with food and distilled water *ad libitum*. The room presented controlled temperature (23±1°C), relative air humidity close to 60% and exhaust air, noise control (maximum 85 decibels), and standard light-dark cycle (12 hours each). Before the experimental procedures, the animals were allowed to acclimatize to the laboratory environment for a 2- week - period.

Experimental protocols

Diabetes was induced, after six hours fasting, by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) 50 mg/kg diluted in citrate buffer under 0.01M (43) and pH 4.5 (44). Fasting blood was drawn from the tail veins of all animals on the same day prior to STZ injection (Baseline), after 7 days to confirm the higher glucose level, and on days of -periodontitis induction, -periodontitis treatment, and -euthanasia. Blood glucose levels were measured using a glucose monitor (Accu-check Active, Roche Diagnosis, Sandhofer, Germany). Animals with glucose levels better than 250 mg/dL were considered diabetic (44).

After 14 days of intraperitoneal injection of STZ (45), 5 animals, which did not receive any intervention, were allocated in the control group (CG). Thirty-five were anesthetized (ketamine 70 mg/Kg/10% and xylazine 6 mg/Kg/2%, via intramuscular) and a 4-0 silk ligature (Ethicon 4-0, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) was inserted into the gingival sulcus of the right mandibular first molar for 7 days (28, 30). Then, the ligatures were removed and the animals were randomized into the 4 groups (LG, SRPG, aPDTW, aPDTEt). The experimental groups are presented in Table 1. The animals of control group were manipulated in the same fashion as the other groups.

Randomization and blinding operator

A computer program (Random Allocation Software, version 1.0, May 2004) was used to randomly allocate ligate-animals to experimental groups. One study team member (RMM) performed the randomization process. An operator (DAMD) performed the SRP and aPDT procedures. After the SRP procedures, the operator was informed if the animals received the additional irrigation with saline solution or aPDT. The formulations used for aPDT presented the same coloration and equal syringes. The animals were treated in the order of the randomization sequence generated. Thus, the operator was masked to the treatments groups during the SRP procedures.

Scaling and root planing treatment

The right molar was subjected to SRP with manual 1-2 mini five curettes (Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, USA) through 10 distal-mesial traction movements in both the buccal and lingual aspects. The furcation and interproximal areas were scaled with the same curettes through cervico-occlusal traction movements (28, 29).

Antimicrobial photodynamic therapy treatment

aPDT employed the methylene blue (MB) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), molecular formula $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$ and molecular weight of the 373,90 g.mol⁻¹. The MB (0,01%) was solubilized in ultra-pure water (Milli-Q) for aPDTW group; and in ultra-pure water (Milli-Q), ethanol (Cromoline®, Diadema, SP, Brazil), and carboxymethylcellulose (Sigma Aldrich) in the proportion of 77:20:3, respectively, for the aPDTEt group. The laser used was an Indio-Gallium-Aluminum-Phosphorous

(InGaAlP, Thera Lase - DMC, São Carlos, SP, Brazil) with a wavelength of 660 nm, a fiber spot size of 0.02827 cm², and continuous emission mode.

The MB formulation (1 mL) was slowly poured into the periodontal pocket around the right mandibular first molar using a syringe (1 mL) and an insulin needle (8 mm x 0.3 mm). After 1 minute, the laser was applied to three equidistant points at each buccal and lingual aspect perpendicularly and in contact with the gingivae (27). The laser was activated at a power of 30 mW for 4 s per point (energy of 0.14 J/point, and energy density of 4.94 J/cm²). The tooth received 0.84J of energy and a total energy density of 29.64 J/cm² (27).

Blood collection and euthanasia

Seven days after treatment, the animals were anesthetized with isoflurane 2-3%, inhaled (Isoflurano, BioChimico, Itatiaia, RJ, Brasil). Blood was collected by cardiocentese (22G1 needle and 5 mL syringe) in EDTA anticoagulant tubes. Euthanasia was performed by total exsanguinations.

Hematological profile

White blood cell (WBC) total count was evaluated using an automatic hematological analyzer (Auto Hematology Analyz, BC-2800 Vet–Mindray). For leukocytes count (neutrophil, lymphocytes, and monocytes), a blood smear was prepared and the slides were stained with Diff-Quick. The WBC count was performed in groups of 100 leukocytes, and then examined under oil immersion by optical microscope (x1000 magnification).

Laboratory procedures

The mandibular specimens were immediately fixed with 10% neutral buffered formalin (pH 7.2) for 48 hours (26) and then decalcified with ethylenediamine tetraacetic acid 10% (EDTA) buffered with sodium hydroxide (pH 7.4) for 13 weeks. The decalcified mandibule tissues were neutralized, after which they were dehydrated, embedded in paraffin, and serially sectioned using a microtome.

Serial paraffin sections (4µm) were obtained in the mesial-distal direction. After excluded the first section that the furcation region was evident, serial sections were obtained and dyed with hematoxylin and eosin (HE), Masson's trichrome (MT), and picrosirius red (PRed).

Histometric analysis

All histometric evaluations were performed in the furcation region of the right mandibular first molar. This region was defined as the area not occupied by bone tissue between the top of the interradicular bone septum and the cementum surface (46, 47).

Sections dyed with HE were used to evaluate the presence and degree of inflammatory cell response. Sections were viewed and graded using a 4-point scoring system (0=absent, 1=mild or discrete, 2=moderate, and 3=intense or severe) (48) with x100 magnifications.

The area (mm^2) of BL in the furcation region was evaluated according to a method previously reported at x 50 magnifications (47) using sections staining with MT (26, 28, 29). This area was histometrically determined using an image analysis system (Axiovision; Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany) (Fig. 2)

Collagen fiber percentage in the furcation region was evaluated using two different methodologies. First, from sections staining with MT image inside an interest region (ROI) was selected at x 50 magnification using image-processing software (Zen lite 2012 blue edition, Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany). The selected images were then transferred to another images software (ImageJ v1.50i, National Institutes of Health, USA) in which they were binarized, and the percentage of collagen fiber within the ROI was calculated (46, 47). Secondly, from sections dyed with PRed, furcation region image was digitalized at x 400 magnification (46, 47) using polarization microscopy (Leica, model DM2000, v. 4.0, Germany). Collagen fiber images that displayed red hue inside the microscopic field of view were selected using an image processing software (Leica, model DFC295, Germany). The selected images were then binarized, and the percentage of area filled by collagen fibers was calculated using software ImageJ v1.50i (47).

All the histometric analyses were performed from one examiner (SMR), who was blinded, to the experimental groups. The degree evaluations of inflammatory cell response and periodontal BL were measured twice in different days to reduce variations in the data. The mean values were averaged and compared statistically.

Intra-examiner reproducibility

The examiner (SMR) was calibrated via double measurements of ten specimens with a-week interval. The values of intra class correlation coefficient and

of Kappa were of 0.86 to area BL, and of 0.95 for degree of inflammatory cell response, respectively.

Statistical analysis

The animal was the analysis unit. Data normality were analyzed using the Shapiro-Wilk test. Blood glucose level data, white blood cells counts, degree of inflammatory cell response, area BL, and percentage of collagen fiber in the PRed were parametric and presented as mean and standard deviation (SD). The intergroup analysis were performed with One-way ANOVA and post hoc Bonferroni's test. Data of collagen fiber percentage in the MT dye were non-parametric, and were presented as median and inter-quartile range (IQR). Intergroup differences were analyzed by Kruskal-Wallis test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The program *Statistics 8.0* was used for all analysis.

The distribution frequencies of scores (0 to 3) of the inflammatory cell response degree were calculated for all experimental groups.

The BL and the collagen fiber mean percentage of the animals with periodontitis and without treatment (LG) were considered as a reference to evaluate the size effect of the treatments. Then, the percentage of BL and the percentage of collagen increase, considering the treatment groups (SRPG, aPDTW, aPDTEt) in relation to the LG were calculated.

Results

One rat died during the anesthesia in the treatment day (aPDTW), and another rat was excluded from the study due to diabetes complications (aPDTEt). Diabetes was successfully induced in animals via STZ injection. All the animals presented glucose levels better than 250 mg/dL (Table 2). The mean weight of the animals at baseline, and on days of periodontitis-induction, treatment, and euthanasia was of 327.7 ± 4.0 , 295.6 ± 6.6 , 280.1 ± 8.4 , 262.4 ± 13.3 g, respectively.

Absence of local inflammatory infiltrate was observed only in the aPDT groups. Mild or discrete inflammatory infiltrate was observed in 10%, 20%, and 50% of the SRPG, aPDTW and aPDTEt, respectively. Intense or severe inflammatory infiltrate was not verified in aPDTEt, but it was observed in 30% and 40% in the aPDTW and SRPG, respectively (Fig. 3). The means (SD) of the inflammatory cell response scores were: 2 (0.7), 2.4 (0.5), 2.3 (0.6), 1.66 (1), 1.1 (0.7) for CG, LG,

SRPG, aPDTW, aPDTEt, respectively. Statistical difference was verified between aPDTEt and SRPG. Systemically, SRPG presented higher statistically total counts of WBC, lymphocytes and monocytes when compared to all the other groups (Table 3).

The ligature model was effective in causing BL, since the LG (0.33 ± 0.15) showed higher significantly BL than the CG (0.05 ± 0.02). None statistical difference was observed between aPDTEt (0.08 ± 0.03) and aPDTW (0.21 ± 0.15); and between aPDTW and SRPG (0.30 ± 0.18). Animals treated with aPDTEt displayed a statistically lower BL than animals submitted to the SRP alone. Only animals treated with aPDT, independently of the formulations, showed BL statistically similar to the animals without periodontitis (Fig. 4A).

Adjunctive aPDTEt was the only treatment type that showed statistical difference when comparing the LG regard to collagen fiber percentage in PRed (24.9 ± 8.3 versus 9.6 ± 2.9) and in MT (27.6 IQR 29 versus 1.48 IQR 3.1), respectively. Animals treated with aPDTEt presented higher mean values of collagen fiber than animals without periodontitis, even so the differences were not statistically significant. This finding indicates a protective effect of aPDT with MB/ethanol formulation on collagen metabolism (Fig. 4B, 4C). Collagen fiber data in MT and PRed were: 11.7 IQR 15.4 and 18.7 ± 8.2 for CG; 8.8 IQR 12.4 and 16.2 ± 6.8 for SRPG; and 13.6 IQR 19 and 18.21 ± 8.1 for aPDTW, respectively.

In the evaluation of collagen fiber, aPDTEt was the treatment that provided the higher increase in the collagen content when comparing to the LG. In percentage, aPDTEt was approximately four and two times more effective to protect the bone reabsorption in the furcation area than SRPG and aPDTW, respectively (Fig. 5).

Discussion

This study examined the effect of the aPDT using an experimental formulation of MB with ethanol as an adjunctive therapy to SRP in ligature-induced experimental periodontitis in diabetic rats on BL, inflammatory cell response degree, collagen fiber content, and WBC counts. Our findings indicated that diabetic animals, which received aPDTEt presented reduced BL, lower local inflammatory infiltrate, and lower WBC counts when compared to those that received SRP alone. Animals treated with aPDTW did not show differences when compared to the animals treated with SRP alone, with exception of WBC count. aPDTEt benefits when comparing to aPDTW were not statistically significant. Then, our initial hypothesis was partially accepted. Collectively, our findings showed aPDTEt presented the most promising results, followed by the aPDTW and SRP by evaluated outcomes.

Beneficial effect of the aPDTEt when comparing to the SRP and aPDTW could be explained from stronger local antimicrobial effect, which can be attributed to the higher production of singlet oxygen. The presence of ethanol in the formulation resulted in lower MB molecular aggregation, i.e., a higher proportion of monomers in relation to dimmers (39). Dimmers are less effective in capturing energy (49), acting predominantly in reactions involving electronic exchanges with the substrate (type I), with less production of singlet oxygen (type II reaction). Products formed from type I and II reactions promote oxidative damages to the bacterial cells, but singlet oxygen has been considered the main responsible by bacterial photo-destruction. Then, a formulation that stabilizes the monomers is preferable for therapeutic purposes (39). Besides, the increase of the singlet oxygen half-life in the ethanol presence when comparing to water (40), could provide more interaction time with bacterial cells.

aPDT, independently of the formulations, presents a low-level laser biostimulating effect, which leads to a cascade of photobiological events that could have advantageous effects on periodontal healing. Studies showed low-level laser therapy (LLLTL) accelerates tissue repair (50), increases collagen deposition, stimulates the proliferation of cultured gingival fibroblast (51, 52), inhibits the production of inflammatory mediators by gingival fibroblast (53), favors cellular chemotaxis, and promotes local vasodilatation and angiogenesis (54, 55). Then, the higher blood vessel counts in animals treated with aPDT could increase oxygen diffusion through the tissue, favoring the healing process, since collagen secretion by fibroblasts occurs only in the presence of high rates of oxygen pressure (56).

Recently, Fahimipour et al. (2016) (57) verified that oral mucosa wound of diabetic rats treated with LLLT presented lower number of polymorphonuclear cells, and higher fibroblast- and new blood vessel- counts after 7 days when compared to the animals that did not undergo LLLT. Such observations probably explain the differences in the inflammatory cells response degree and collagen behaviors between aPDT treatments and SRP alone verified in the present study.

In diabetic rats, one previous study (22) evaluated the aPDT effect as an adjuvant treatment to the SRP in induced periodontitis. Authors observed lower significantly BL in animals treated with aPDT when compared to animals treated with SRP alone, at all experimental periods (7, 15 and 30 days after treatment). We did not find statistical differences between SRP alone and conventional aPDT with the Ps solubilized in water. The differences between our study and Almeida's et al. may be related to differences in the Ps type. While we use MB, Almeida et al. uses Toluidine blue (TB). TB and MB are considered as an effective membrane destructive agent. TB is more hydrophobic than MB, and interacts more easily with the bacterial membrane than MB. MB presents hydrophilicity that favors its passage for intracellular environment causing damages in the bacterial cell DNA and mitochondrial structure (58).

In the current study, we selected MB as Ps due to: (i) its safety for use in humans (59), (ii) its utilization in the majority of clinical studies that evaluated adjunctive aPDT to SRP. The MB concentration was based in the previous findings of Komine & Tsujimoto (2013) (60). The authors showed that the largest amount of singlet oxygen was generated from 0.01% excited MB when comparing to 0.0001%-1.0% range.

We considered two control groups. The first control group was filling for animals without periodontitis, since there is an increase in the BL associated with animals aging (62), which are not in any way related to the biofilm presence (62). BL observed in the non-ligate animals (non-ligate) is associated more with physiological than pathological process. Then, control group (non-ligate animals) was necessary to estimate the portion of physiological BL on entire BL observed into ligate animals. The second control group was filling for animals that received the ligature, and had not received any treatment. This experimental group was important considering the rapid metabolism of the rats in their healing process. Then, we can observe if the data of BL in the treatment groups were associated only the treatment effect or if they

were basically from physiological healing of the rats after of the ligature removal. Therefore, the lower BL observed in the treatment groups when compared to the ligate group indicates that this protective effect on BL was associated with the treatments.

Experimental periodontitis model (submerging a silk ligature into the gingival sulcus during 7 days) has been used to evaluate the adjunctive effect of the aPDT in health systemically- (22, 25, 27, 28, 29, 30), diabetic- (22), dexamethasone-immunosuppressed- (23), tacrolimus-immunosuppressed- (24), nicotine-modified- (26, 31), and ovariectomized-rats (29). Previous study observed detectable periodontal BL after 3 days of ligature placement (63) and progressive BL was reported for as long as 15-30 days (61). Observations using micro-computed tomography showed after 7 days of the ligature placement, significant BL was demonstrated in health systemically- and diabetic- rats, with its duration reaching a plateau on day 14 in the health systemically rats and on day 21 in the diabetic rats (44). At the later stages, the progression of BL was expected to slow down. STZ was used, in the current study, to destroy pancreatic beta cells and achieve elevation of blood glucose; and time period among the diabetes- and the periodontitis- induction was 14 days (45). Other authors used time periods of 7 (22, 43) and 21 days (44). We analysed the initial response to the periodontal treatments (7 days). Almeida et al. (2008) (22) verified that the differences between SRP and aPDT in diabetic rats, which were identified after 7 days remained after 15 and 30 days.

Our study has some limitations: (i) diabetes and periodontitis were induced in a short period and the acute nature of these models might not fully reflect the chronic pathological conditions in human; (ii) short period (7 days) to analyze the periodontal healing; (iii) reduced number of animals impaired the statistical power and increasing the possibility of Type II error. In this case, there is failing to detect an effect that is present. The non-appearance of statistical difference between aPDTEt and aPDTW for BL is probably associated to the lack statistical power (Fig. 3A).

Thus, the findings presented for us must be interpreted with caution. Considering the promising effect of the aPDTEt when comparing to SRP or aPDTW, particularly on BL, we suggest future research with more complex animal models, higher animal numbers, and with higher follow-up.

We concluded that adjunctive aPDT with MB (0.01%) solubilized in ultra-pure water/ ethanol/carboxymethylcellulose (77:20:3) can have potential to periodontal treatment in patients who have diabetes.

Acknowledgements

This study was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The authors declare no conflict of interest.

References

1. International diabetes atlas (IDF). *IDF Diabetes Atlas*. 2015;**7**:51.
2. Knight ET, Liu J, Gregory JS, Faggion Jr CM, Cullinan MP. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2016;**71**:22-51.
3. Jin LJ, Lamster IB, Greenspan JS, Pitts NB, Scully C, Warnakulasuriya S. Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health. *Oral Dis*. 2015.
4. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2002;**30**:182-192.
5. Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A, Batayha WQ. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complic*. 2006;**20**:59-68.
6. Lim LP, Tay FBK, Sum CF, Thai AC. Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 2007;**34**:118-123.
7. Salvi GE, Carollo-Bittel B, Lang NP. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *J Clin Periodontol*. 2008;**35**:398-409.
8. Garcia D, Tarima S, Okunseri C. Periodontitis and glycemic control in diabetes: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*. 2014;**86**:499-506.
9. Eke PI, Wei L, Thornton-Evans GO, et al. Risk Indicators for Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2009 - 2012. *J Periodontol*. 2016:1-18.
10. Allen EM, Matthews JB, O'Connor R, O'Halloran D, Chapple ILC. Periodontitis and type 2 diabetes: is oxidative stress the mechanistic link? *Scott Med J*. 2009;**54**:41-47.
11. McMullen JA, Va Dyke TE, Horoszewicz HU, Genco RJ. Neutrophil chemotaxis in individuals with advanced periodontal disease and a genetic predisposition to diabetes mellitus. *J Periodonto*. 1981;**52**:167-173.
12. Ueta E, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T. Prevalence of diabetes mellitus in odontogenic infections and oral candidiasis: an analysis of neutrophil suppression. *J Oral Pathol Med*. 1993;**22**:168-174.
13. Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE2, IL-1b, and TNF-a responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol*. 1998;**3**:40-50.

14. Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. Hyperglycemia, glycooxidation and receptor for advanced glycation endproducts: Potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes associated periodontitis. *Periodontol 2000*. 2000;**23**:50-62.
15. Omori K, Ohira T, Uchida Y, et al. Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase. *J Leukoc Biol*. 2008;**84**:292-301.
16. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidencebased perspective of scaling and root planing. *J Clin Periodontol*. 2002;**29**:6-16.
17. Tervonen T, Karjalainen, K. Periodontal disease related to diabetic status. A pilot study of the response to periodontal therapy in type 1 diabetes. *J Clin Periodontol* 1997;**24**:505-510.
18. Santos CM, Lira-Junior R, Fischer RG, Santos AP, Oliveira BH. Systemic Antibiotics in Periodontal Treatment of Diabetic Patients: A Systematic Review. *PLoS One*. 2015;**10**:1-11.
19. Grellmann AP, Sfreddo CS, Maier J, Lenzi TL, Zanatta FB. Systemic antimicrobials adjuvant to periodontal therapy in diabetic subjects: A meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2016;**43**:250-260.
20. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004;**3**:436-450.
21. Soukos NS, Goodson MJ. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*. 2011;**55**:143-146.
22. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol*. 2008;**79**:2156-2165.
23. Fernandes LA, Martins, TM, Almeida JM, Theodoro LH, Garcia VG. Radiographic assesment of photodynamic therapy as na adjunctive treatment on induced periodontitis in immunosuppressed rats. *J Appl Oral Sci*. 2010;**18**:237-243.
24. Bottura PE, Milanezi J, Fernandes LA, et al. Nonsurgical Periodontal Therapy combined with Laser and Photodynamic Therapies for Periodontal Disease in Immunosuppressed Rats. *Transplant Proc*. 2011;**43**:2009-2016.
25. Carvalho AS, Napinoga MH, Coelho-Campos Jr. J, Silva-Filho JV, Thedei Jr. G. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomed Laser Surg*. 2011;**29**:735-740.

26. Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, et al. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol.* 2011;**38**:1106-1114.
27. Garcia VG, Gualberto EC Jr., Fernandes LA, et al. Adjunctive Antimicrobial Photodynamic Treatment of Experimentally Induced Periodontitis in Ovariectomized Rats. *J Periodontol.* 2012;**84**:556-565.
28. Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2013a;**28**:143-150.
29. Garcia VG, Longo M, Gualberto EC JR., 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. *J Periodont Res.* 2013b;**49**:584-594.
30. Theodoro LH, Caiado RC, Longo M, et al. Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. *Lasers Med Sci.* 2015;**30**:1209-1218.
31. Gualberto EC Jr., Theodoro LH, Longo M, et al. Antimicrobial photodynamic therapy minimizes the deleterious effect of nicotine in female rats with induced periodontitis. *Lasers Med Sci.* 2016;**31**:83-94.
32. Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Graziani F, Gatto GF, Monaco A. Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2013a;**40**:514-526.
33. Sgolastra F, Severino M, Gatto R, Marzo G, Monaco, A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2013b;**28**:669-682.
34. Vohra F, Akram Z, Safii SH, et al. Role of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of aggressive periodontitis: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;**13**:139-147.
35. Al-Zahrani MS, Bamshmous SO, Alhassani AA, Al-Sherbini MM. Short-term effects of photodynamic therapy on periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. *J Periodontol.* 2009;**80**:1568-1573.
36. Macedo GO, Novaes AB Jr., Souza SLS, Taba JR. M, Palioto DB, Grisi MFM. Additional effects of aPDT on nonsurgical periodontal treatment with doxycycline in type II diabetes: a randomized,controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2013;**29**:881-886.
37. Queiroz AC, Suaid FA, de Andrade PF, et al. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2015;**30**:617-625.

38. Ramos UD, Ayub LG, Reino DM, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an alternative to systemic antibiotics: results from a double-blind, randomized, placebo-controlled, clinical study on type 2 diabetics. *J Clin Periodontol*. 2016;**2**:147-155.
39. George S, Kishen A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *J Biomed Opt*. 2007;**12**:29-34.
40. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. *J Photochem Photobiol B*. 2005;**79**:159-170.
41. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem and Photobiol B*. 1997;**39**:1-18.
42. Prochnow EP, Martins MR, Campagnolo CB, Vianna RC, Villetti MA, Kantorski KZ. Antimicrobial photodynamic photosensitizers in formulations with ethanol on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015;**13**:291-296.
43. Kim JH, Lee DE, Choi SH, Cha JH, Bak EJ, Yoo YJ. Diabetic characteristics and alveolar bone loss in streptozotocin- and streptozotocin-nicotinamide-treated rats with periodontitis. *J Periodontal Res*. 2014;**49**:792-800.
44. Chang PC, Chien LY, Yeo JF, et al. Progression of Periodontal Destruction and the Roles of Advanced Glycation End Products in Experimental Diabetes. *J Periodontol*. 2013;**84**:379-388.
45. Nishikawa T, Naruse K, Kobayashi Y, et al. Involvement of nitrosative stress in experimental periodontitis in diabetic rats. *J Clin Periodontol*. 2012;**39**:342-349.
46. Branco-de-Almeida LS, Franco GCN, Castro ML, et al. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*. 2012;**83**:664-671.
47. Castro ML, Franco GCN, Branco-de-Almeida LS, et al. Downregulation of Proteinase-Activated Receptor-2, Interleukin-17, and Other Proinflammatory Genes by Subantimicrobial Doxycycline Dose in a Rat Periodontitis Model. *J Periodontol*. 2016;**87**:203-210.
48. Bavariya AJ, Andrew Norowski PJR, Mark Anderson K, et al. Evaluation of biocompatibility and degradation of chitosan nanofiber membrane crosslinked with genipin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;**102**:1084-1092.
49. Gabrielli DS, Belisle E, Severino D, Kowaltowski AJ, Baptista MS. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochem Photobiol*. 2004;**79**:227-232.
50. Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes KS, Barham CD, Waddell DL, Enwemeka CS. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg*. 2004;**22**:241-247.

51. Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J. Periodontol.* 2005;**76**:187-193.
52. Basso FG, Soares DG, de Souza Costa CA, Hebling J. Low-level laser therapy in 3D cell culture model using gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2016;**31**:973-978.
53. Lim W, Choi H, Kim J, Kim S, et al. Anti-inflammatory effect of 635 nm irradiations on in vitro direct/indirect irradiation model. *J Oral Pathol Med.* 2016;**2**:94-102.
54. Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, et al. Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 1995;**74**:1382-1388.
55. Houreld N, Abrahamse H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². *Photomed Laser Surg.* 2007;**25**:78-84.
56. Reenstra WR, Veves A, Orlow D, et al. Decrease proliferation and cellular signaling in primary dermal fibroblast derived from diabetics versus non diabetic sibling controls. *Acad Emerg Med.* 2001;**8**:519.
57. Fahimipour F, Houshmand B, Alemi P, et al. The effect of He-Ne and Ga-Al-As lasers on the healing of oral mucosa in diabetic mice. *J Photochem Photobiol B.* 2016;**159**:149-154.
58. Usacheva, MN, Teichert, MC, Biel, MA. Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Efficacy Against Gram-Positive and Gram Negative Microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001;**29**:165-173.
59. Executive summary of safety and toxicity information for methylene blue. *National Toxicology Program. U.S. Department of Health and Human Services.* 1990:7220-7279.
60. Komine C, Tsujimoto Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2013;**39**:411-414.
61. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher, T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodont Res.* 2004;**39**:101-106.
62. Heijl L, Wennström J, Lindhe J, Socransky SS. Periodontal disease in gnotobiotic rats. *J Periodontal Res.* 1980;**15**:405-419.
63. Holzhausen M, Rossa Júnior C, Marcantonio Júnior E, Nassar PO, Spolidório DM, Spolidório LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2002;**73**:1030-1036.

Table 1. Description of experimental groups.

Groups	Experimental groups description	Animals number
CG	Non-ligate animals.	5
LG	Ligate animals, without treatment.	5
SRPG	Ligate animals, treated with SRP and irrigation with 1 mL of saline solution.	10
aPDTW	Ligate animals, treated with SRP and aPDT with MB (0.01%) solubilized in ultra-pure water (Milli-Q).	10
aPDTEt	Ligate animals, treated with SRP and aPDT with MB (0.01%) solubilized in ultra-pure water (Milli-Q), ethyl alcohol, and carboxymethylcellulose (77:20:3).	10

SRP: scaling and root planing; aPDT: antimicrobial photodynamic therapy; MB: methylene blue

Table 2. Mean (standard deviation) of the blood glucose levels during experimental period.

	CG (n=5)	LG (n=5)	SRPG (n=10)	aPDTW (n=9)	aPDTEt (n=9)	All groups
Previos diabetes	112 (16)	94 (18)	101 (16)	102 (16)	110 (22)	104 (6)*
Periodontitis induction	568 (43)	589 (22)	549 (48)	569 (41)	584 (43)	572 (15)
Periodontal treatment	549 (63)	449 (80)	496 (46)	560 (50)	560 (53)	524 (50)
Euthanasia	565 (39)	594 (12)	585 (35)	593 (21)	578 (40)	583 (12)

Line: One-way ANOVA and Bonferroni's test. No difference was observed between groups into each experimental period ($p < 0.05$).

*Independently of the experimental groups, the animals presented a significant statistically increase in the blood glucose level after STZ injection ($p < 0.05$).

Table 3. Mean (standard deviation) of white blood cells counts data in the euthanasia day.

	CG (n=5)	LG (n=5)	SRPG (n=10)	aPDTW (n=9)	aPDTEt (n=9)
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11.70(4.5)	10.30(4.7)	17.80 (2.9)*	10.94 (1.7)	9.50 (1.4)
Neutrophils ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4.63 (2.4)	3.84 (1.8)	5.17 (0.7)	3.79 (1.1)	2.69 (1.4)
Lymphocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6.23 (1.7)	6.22 (2.8)	10.80 (2.1)*	6.44 (1.0)	6.58 (1.3)
Monocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.52(0.62)	0.15 (0.2)	1.72 (0.9)*	0.47 (0.2)	0.17 (0.2)

WBC: white blood counts.

Line: One-way ANOVA and Bonferroni's test.

*SRPG showed statistical difference in relation to the other groups ($p < 0.05$).

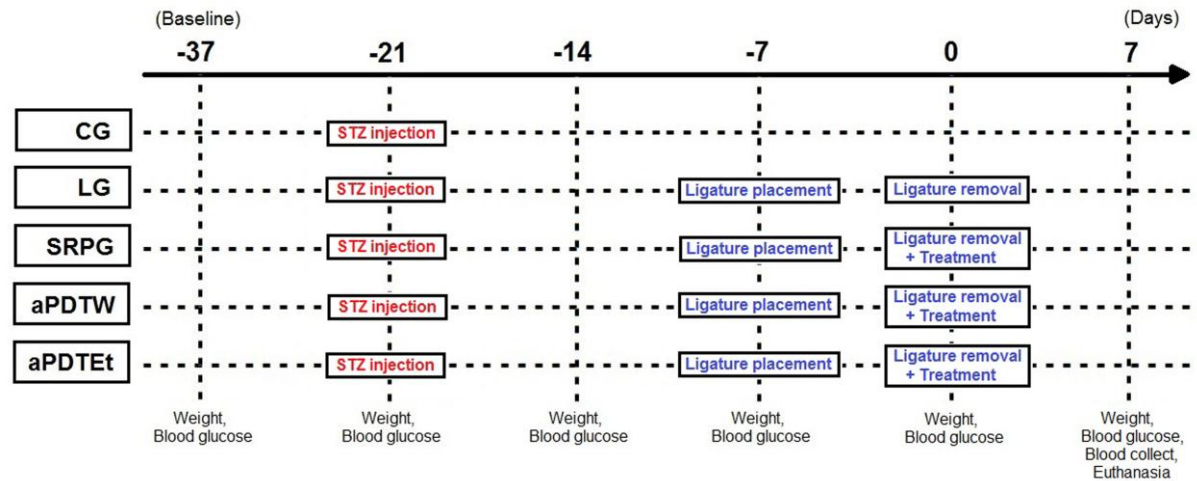


Fig. 1. Study design.

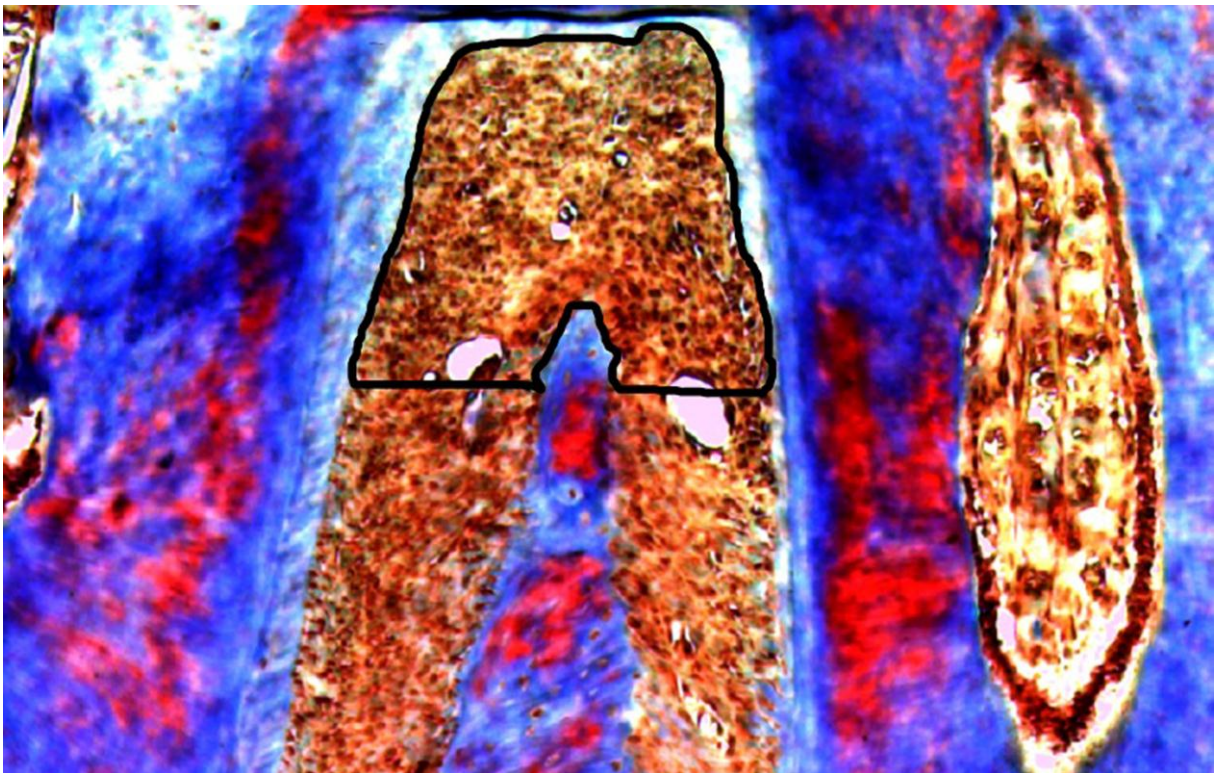


Fig. 2. Photomicrography of the area of alveolar bone loss in the furcation region (stained with Masson's trichrome; x50 original magnification).

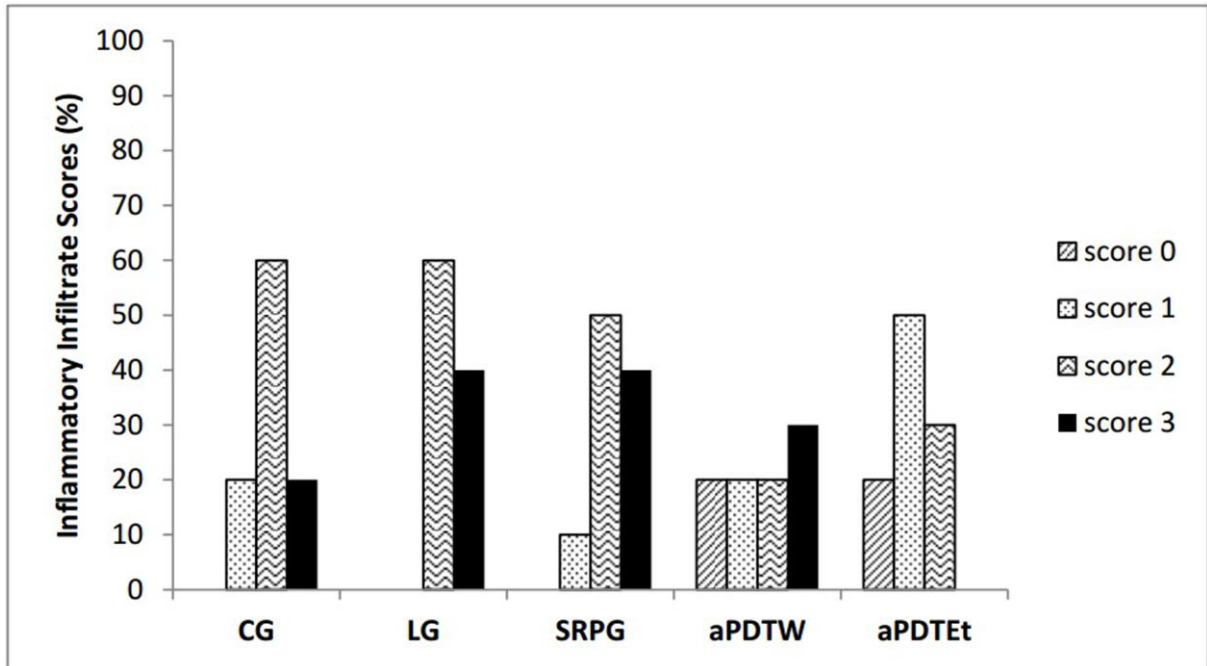


Fig. 3. Score distribution frequency of the degree of inflammatory cell response. Score 0: absent, 1: mild or discrete, 2: moderate, and 3: intense or severe CG: non-ligate animals, LG: ligate animals-without treatment, SRPG: SRP, aPDTW: SRP + aPDT with MB in water, aPDTEt: SRP + aPDT with MB in water/ethanol/carboxymethylcellulose.

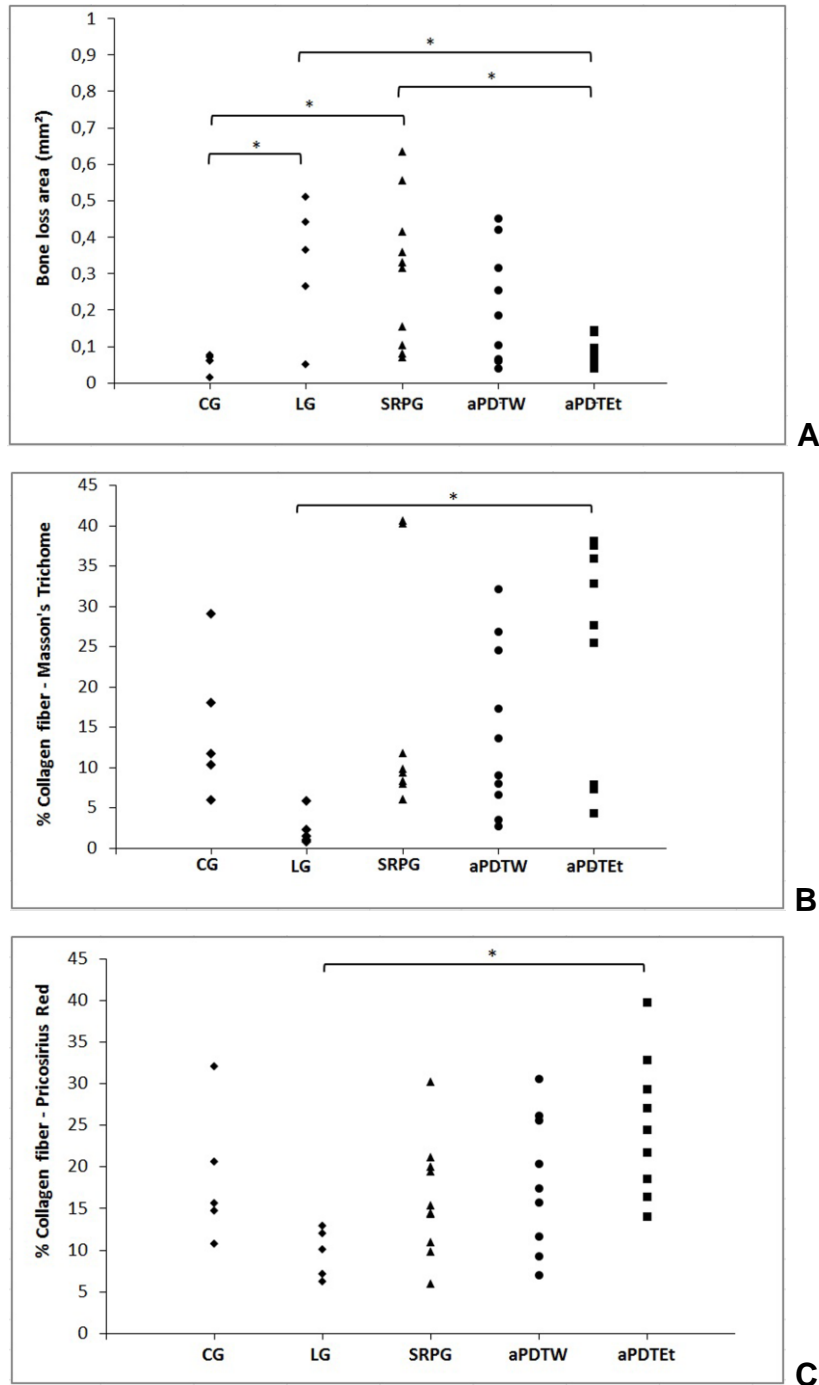


Fig. 4. Graphs of plotted values for BL area (A), collagen fiber percentage in TM (B), and collagen fiber percentage in PRed (C). CG: non-ligate animals (n=5), LG: ligate animals without treatment (n=5), SRPG: SRP (n=10), aPDTW: SRP+aPDT with MB in water (n=9), aPDTEt: SRP+ aPDT with MB in water/ethanol/carboxymethylcellulose (n=9).

* Significant statistically differences between groups ($p < 0.05$). In the Fig. 3A and 3C from one-way ANOVA and post hoc Bonferroni's test. In the Fig. 3B from Kruskal-Wallis test.

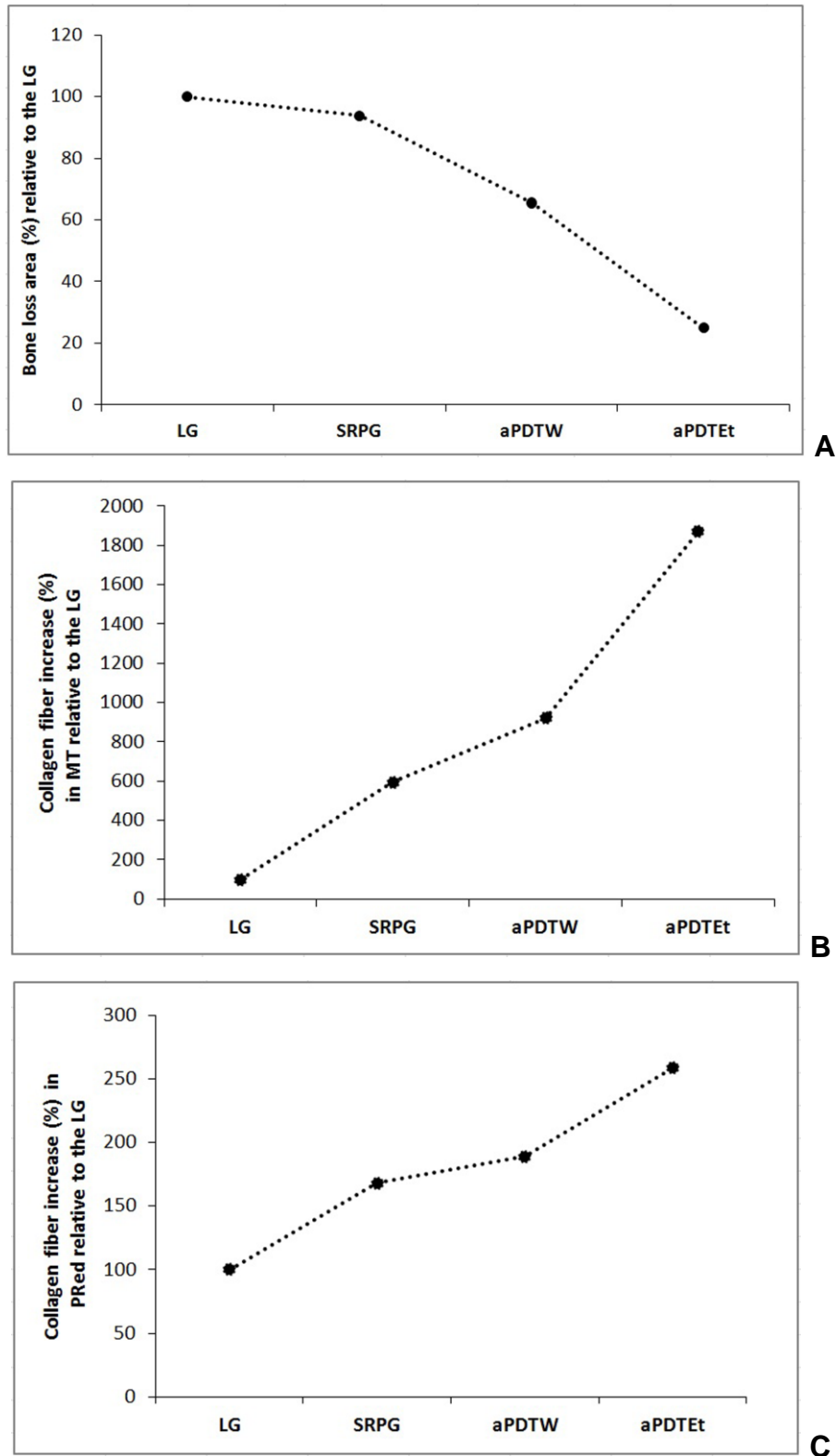


Fig. 5. Percentage of BL (A), percentage of collagen fiber increase in MT (B), and percentage of collagen fiber increase in PRed (C), considering the treatment groups (SRPG, aPDTW, aPDEt) in relation to the LG. LG: ligate animals-without treatment, SRPG: SRP, aPDTW: SRP + aPDT with MB in water, aPDEt: SRP + aPDT with MB in water/ethanol/carboxymethylcellulose.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo se propôs a reproduzir duas condições crônicas que acometem o ser humano, a periodontite e o diabetes mellitus, as quais apresentam significativa prevalência nas populações, utilizando modelos experimentais estabelecidos na literatura.

Nós objetivamos testar uma formulação experimental de azul de metileno (AM) (fotossensibilizador amplamente utilizado para terapia fotodinâmica antimicrobiana e que tem adequada segurança para uso em humanos) diluído em etanol para o tratamento da periodontite experimental em ratos diabéticos. Esta formulação experimental foi testada *in vitro* demonstrando características fotofísicas e fotoquímicas que otimizaram o efeito antimicrobiano quando comparada a formulação comumente empregada de AM diluído em água. Esses resultados *in vitro* nos motivaram a propor a avaliação da formulação experimental em modelos animais pré-clínicos.

Condições crônicas humanas são difíceis de reproduzir em modelos animais. Nós ressaltamos que o presente estudo apresenta algumas limitações, destacando-se o curto período de indução de periodontite e diabetes que podem não ter reproduzido de maneira fidedigna a cronicidade dessas patologias tal como ocorrem no homem.

Tendo essa limitação em mente, nós nos propomos a testar os tratamentos nos ratos diabéticos com periodontite com o olhar muito mais voltado para o comportamento do que para a magnitude de melhoras ou pioras frente aos desfechos avaliados.

Dentro dos limites do estudo, podemos concluir que a terapia fotodinâmica antimicrobiana com a formulação de AM (0,01%) solubilizados em água ultra-pura (Milli-Q), álcool etílico, carboximetilcelulose pode ser uma alternativa viável para o tratamento periodontal em pacientes diabéticos.

Nós observamos que a terapia fotodinâmica antimicrobiana com a formulação experimental de AM (0,01%) diluído em etanol (20%) apresentou, de maneira geral, resultados mais promissores quando comparada a raspagem e alisamento radicular ou a formulação de AM diluído em água. Este estudo apresenta o potencial dessa terapia para o tratamento periodontal em pacientes diabéticos.

REFERÊNCIAS

- ADRIAENS, P. A.; DE BOEVER, J. A.; LOESCHE, W. J. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. **Journal of Periodontology**, v. 59, n. 4, p. 222–230, 1988.
- 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.
- 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.
- ALWAELY, 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.
- AL-ZAHRANI, M. S.; BAMSHMOUS, S. O.; ALHASSANI, A. A.; AL-SHERBINI, M. M. Short-term effects of photodynamic therapy on periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 10, p. 1568-1573, 2009
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Diabetes and periodontal diseases (position paper). **Journal of Periodontology**, v. 67, n. 9, p. 935-945, 1996.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 34, n. 1, p. 562-569, 2011.
- ANDERSEN, R.; LOEBEL, N.; HAMMOND, D.; WILSON, M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. **Journal Clinical Dentistry**, v. 18, n. 2, p. 34-38, 2007.
- 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.
- 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.

BACIC, M.; PLANCAK, D.; GRANIC, M. CPITN assessment of periodontal disease in diabetic patients. **Journal of Periodontology**, v. 59, n. 12, p. 816-822, 1988.

BALLATA, M. L. et al. Photodynamic therapy associated with fullmouth 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.

BAHMANZADEH, M. et al. Dietary supplementation with astaxanthin may ameliorate sperm parameters and DNA integrity in streptozotocin-induced diabetic rats. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 43, n. 2, p. 90-96, 2016.

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.

BEIKLER, T.; KUCZEK, A.; PETERSILKA, G.; FLEMMIG, T. F. In-dental-office screening for diabetes mellitus using gingival crevicular blood. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 3, p. 216-218, 2002.

BERAKDAR, M.; CALLAWAY, A.; FAKHR EDDIN, M.; ROB, A., WILLERSHAUSEN, B. Comparison between scaling-root planing (srp) and srp/ photodynamic therapy: six-months study. **Head Face & Medicine** v. 5, n. 8, p. 1-6, 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. 1338-1347, 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.

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.

BOLZAN, A. D.; BIANCHI, M. S. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 512, n.2-3, p. 121-134, 2002.

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.

BOWERSOX J. C. In vivo collagen metabolism in spontaneously diabetic (db/db) mice. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 45, n. 2, p. 221-226, 1986.

- BUCK, S. T. G. Relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em terapia fotodinâmica. [Dissertação de Mestrado]. Universidade de São Paulo, 2009.
- CAHILL, G. F. JR. Heterogeneity in type II diabetes. **Western Journal of Medicine**, v. 142, n. 2, 249-50, 1985.
- 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.
- 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. 601-605, 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.
- CHAVARRY, N. G.; VETTORE, M. V.; SANSONE, C.; SHEIHAM, A. The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis. **Oral health & preventive dentistry**, v. 7, n. 2, p. 107-127, 2009.
- 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.
- CHEN, D.; WANG, M. W. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.7, n.4, 307-317, 2005.
- COBB, C. M. Non-surgical pocket therapy: mechanical. **Ann Periodontology**, v.1, p.443, 1996.
- COBB, C. M. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidencebased 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.

COLE, C. M. et al. A trend of increase in periodontal interleukin-6 expression across patients with neither diabetes nor periodontal disease, patients with periodontal disease alone, and patients with both diseases. **Journal of Periodontal Research**, v. 43, n. 6, p. 717-722, 2008.

DELFINO, V. D. A.; FIGUEREDO, J.; MATSUO, T.; FAVERO, M. E.; MATNI, A. M.; MOCELIN, A. J. Diabetes mellitus induzido por estreptozocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.24, n. 1 p.31-36, 2002.

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. 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.

EJEIL, A. L. et al. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 2, p. 196-201. 2003.

EKE, P. I.; WEI, L.; THORNTON-EVANS, G. O.; BORRELL, L. N.; BORGNAKKE, W. S.; DYE, B.; GENCO, R. J. Risk Indicators for Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2009 - 2012. **Journal of Periodontology**, p. 1-18, 2016.

EMRICH, L. J.; SHLOSSMAN, M.; GENCO, R. J. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Periodontology**, v. 62, n. 2, p. 123-131, 1991.

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.

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

GAIKWAD, S. P.; GURAV, A. N.; SHETE, A. R.; DESARDA, H. M. Effect of scaling and root planing combined with systemic doxycycline therapy on glycemc control in diabetes mellitus subjects with chronic generalized periodontitis: a clinical study. **Journal of Periodontal Implant Science**, v. 43, n. 2, p. 79-86, 2013.

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**, v. 51, n. 1, p. 26-37, 2016.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

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. 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.

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.

GIANNELLI, M. F. et al. Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. A randomized splitmouth clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 10, p. 962-970, 2012.

GLAVIND, L.; LUND, B.; LOE, H. The relationship between periodontal state and Diabetes duration, insulin dosage and retinal changes. **Journal of Periodontology**, v. 39, n. 6, p. 341-347, 1968.

GOGLY, B. et al. Morphometric analysis of collagen and elastic fibers in normal skin and gingiva in relation to age. **Clinical Oral Investigations**, v. 1, n. 3, p. 147-152. 1997.

- 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.; 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.1034, 2011.
- GRELLMANN, A. P.; SFREDDO, C. S.; MAIER, J.; LENZI, T. L.; ZANATTA, F.B. Systemic antimicrobials adjuvant to periodontal therapy in diabetic subjects: A meta-analysis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 43, n. 3, p. 250-260, 2016.
- GUARIGUATA, L.; WHITING, D. R.; HAMBLETON, I.; BEAGLEY, J.; LINNENKAMP, U.; SHAW, J. E. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.103, n. 2, p.137-149, 2014.
- HAGEMAN, I.; BUSCHARD, K. Diabetic animal models. In: Svendsen P, Jau J, eds. **Handbook of Laboratory Animal Science**, vol. II, Boca Raton, FL: CRC Press; 1994.
- 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 Science**, 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.
- INTERNATIONAL DIABETES ATLAS (IDF), IDF **Diabetes Atlas**, 7th edition, 2015.
- JIMENEZ, M.; HU, F. B.; MARINO, M.; LI, Y.; JOSHIPURA, K. J. Type 2 diabetes mellitus and 20 year incidence of periodontitis and tooth loss. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 98, p. 494–500, 2012.
- JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; ORCI, L.; GONET, A. E.; RENOLD, A. E. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. **Process of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 126, n. 1, p. 201-205, 1967.
- JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A. E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **Journal of Clinical Investigaton**, n. 48, n. 11 p. 2129-2139, 1969.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008..

KARJALAINEN, K. M.; KNUUTTILA, M. L. E.; VON DICKHOFF, K. J. Association of these verity of periodontal disease with organ complications in type1 diabetic patients. **Journal of Periodontology**, v. 65, n. 1, p. 1067-1072, 1994.

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.

KESLER, G.; KOREN, R.; KESLER, A.; KRISTT, D.; GAL, R. Differences in histochemical characteristics of gingival collagen after ER:YAG laser periodontal plastic surgery. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgical**, v. 18, n. 4, p. 203-207, 2000.

KIM, J. H.; LEE, D. E.; CHOI, S. H.; CHA, J. H.; BAK E, J.; YOO, Y. J. Diabetic characteristics and alveolar bone loss in streptozotocin- and streptozotocin-nicotinamide-treated rats with periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, n. 6, p. 792-800, 2014.

KIRSTEN, V. R.; SESTERHEIN, P.; SAITOVITCH, D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 1, p. 3-10, 2010.

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.

KOMERIK, N. In vitro killing of porphyromonas gingivalis by toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 932-940, 2003.

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

KORNMAN, K. S. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. **Journal of Peridontology**, v. 79, n. 8, p. 1560-1568, 2008.

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

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Robbins: Patologia Básica**. Rio de Janeiro: 8ª Ed. Rio de Janeiro, Elsevier Editora Ltda., 2008.

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.

LALLA, E.; LAMSTER, I. B.; DRURY, S.; FU, C.; SCHMIDT, A. M. Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: Potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes associated periodontitis. **Periodontology** 2000, v. 23 p. 50-62, 2000.

LALLA E. et al. Periodontal infection profiles in type 1 diabetes. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 33, n. 12, p. 855-862, 2006.

LALLA, E.; PAPAPANOU, P. N. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. **Nature reviews Endocrinology**, v. 7, n. 12, p. 738-748, 2011.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2 p. 216-226, 2008.

LIKE, A. A.; ROSSINI, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. **Science**, v. 193, n. 4251, p. 415-417, 1976.

LINDHE, J. Tratado de periodontia clinica e implantologia oral. Guanabara Koogan, 3ª edição, 1999.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5ª edição, pág 293, Ed. Guanabara Koogan 2010.

LÖE, H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 16, n. 1, p. 329-334, 1993.

LORENCINI, M. et al. A new paradigm in the periodontal disease progression: gingival connective tissue remodeling with simultaneous collagen degradation and fibers thickening. **Tissue Cell**, v. 41, n. 1, p.43-50, 2009.

MACEDO, G. O.; NOVAES, A. B. JR.; SOUZA, S. L. S.; TABA, JR. M.; PALIOTO, D. B.; GRISI, M. F. M. Additional effects of aPDT on nonsurgical periodontal treatment with doxycycline in type II diabetes: a randomized, controlled clinical trial. **Lasers in Medical Science**, v. 9, n. 3, p. 881-886, 2013.

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

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. Review. **Phytomed**, v.2, p. 137-189, 1995.

MATIA, J. I.; BISSADA, N. F.; MAYBURY, J. E.; RICCHETTI, P. Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. **International Journal of Periodontics e Restorative**, v. 6, n. 6, p. 24–35, 1986.

MEALEY, B. L.; MORITZ, A. J. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. **Periodontology** 2000, v. 32, p. 59-81, 2003.

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 Photobiology B: Biology**, v. 79, n. 2, p. 159-170, 2005.

MIRANDA, T.; FERES, M.; PEREZ-CHAPARRO, P. J.; FAVERI, M.; FIGUEIREDO, L. C.; TAMASHIRO, N. S.; BASTOS, M. F.; DUARTE, P. M. Metronidazole and amoxicillin as adjuncts to scaling and root planing for the treatment of type 2 diabetic subjects with periodontitis: 1-year outcomes of a randomized placebo-controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 41, n. 9, p. 890-899, 2014.

MIRZA, B. A. Q.; SYED, A.; IZHAR, F.; KHAN, A. A. Bidirectional relationship between diabetes and periodontal disease: Review of Evidence. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 60, n. 9, p. 766-768, 2010.

NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontology 2000**, v. 40, n. 2006, p. 11-28. 2006.

NEGRI, G. Diabetes mellitus: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

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

O'CONNELL, P. A.; TABA, M.; NOMIZO, A.; FOSS FREITAS, M. C.; SUAID, F. A.; UYEMURA, S. A.; TREVISAN, G. L.; NOVAES, A. B.; SOUZA, S. L.; PALIOTO D. B.; GRISI, M. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. **Journal of Periodontology**, 79(5):774–783, 2008.

PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases: Epidemiology. **Ann Periodontology**, v. 1, n. 1, p. 1-36, 1996.

PAPANTONOPOULOS, G. H. Smoking influences decision making in periodontal therapy: a retrospective clinical study. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 10, p. 1166-1173, 1999.

PATIL, K.; PAWAR, R.; TALAP, P. Self-aggregation of methylene blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu₄NBr and urea. **Physical Chem Chem Phys**, v. 2, n. 19, p. 4313-4317, 2000.

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, n. 2, 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.

PROCHNOW, E. P.; MARTINS, M. R.; CAMPAGNOLO, C. B.; VIANNA, R. C.; VILLETTI, M. A.; KANTORSKI, K. Z. Antimicrobial photodynamic photosensitizers in formulations with etanol on *Pseudomona aeruginosa* biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 13, p. 325-554, 2015.

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.

RAYAT, G. R.; SINGH, B.; KORBUTT, G. S.; RAJOTTE, R. V. Single injection of insulin delays the recurrence of diabetes in syngeneic islet transplanted diabetic NOD mice. **Transplantation**, v. 70, n. 6, p. 976-985, 2000.

RAMOS, U. D.; AYUB, L. G.; REINO, D. M.; GRISI, M. F.; TABA, M. JR.; SOUZA, S. L.; PALIOTO, D. B.; NOVAES, A. B. JR. Antimicrobial photodynamic therapy as an alternative to systemic antibiotics: results from a double-blind, randomized, placebo-controlled, clinical study on type 2 diabetics. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 43 n. 2, p. 147-155, 2016.

RAVANAT J. L.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ G. R.; MEDEIROS, M. H. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **Journal of Biology Chemistry**, v. 276, n. 8, p.40601-40604, 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.

REYNOLDS, J. J.; HEMBRY, R. M.; MEIKLE, M. C. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. **Advances in Dental Research**, v. 8, n. 2, p. 312-319, 1994

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

ROSENTHAL, L. M.; ABRAMS, H.; KOPCZYK, R. A. The relationship of inflammatory periodontal disease to diabetic status in insulin dependent diabetes mellitus patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 15, n. 7, p. 425-429, 1988.

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

RYLANDER, H.; RAMBERG, P.; BLOHME, G.; LINDHE, J. Prevalence of periodontal disease in Young diabetics. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 14, n. 1, p. 38-43, 1986.

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.

SANTOS, C. M.; LIRA-JUNIOR, R.; FISCHER, R. G.; SANTOS, A. P.; OLIVEIRA, B. H. Systemic Antibiotics in Periodontal Treatment of Diabetic Patients: A Systematic Review. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. 1-11, 2015.

SCHNEDLI, W. J.; FERBER, S.; JOHNSON, J. H.; NEWGARD, C. B. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT-expressing cells. **Diabetes**, v. 43, n. 11, p. 1326-1333, 1994.

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. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 5, p. 459-468, 2003.

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.83, n. 10, p. 1257-1269, 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, p. 731-743, 2012b.

SGOLASTRA, F.; PETRUCCI, A.; SEVERINO, M.; GATTO, G. F.; MONACO, A. Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. 5, p. 514-526, 2013a.

SGOLASTRA, F.; SEVERINO, M.; GATTO, R.; MONACO, A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Laser in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 669-682, 2013b.

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

SHIP, J. A. Diabetes and oral health: an overview. **JADA**. v. 134, n. 4s-10s, 2003

SILVA, J. A. F. et al. The influence of type I diabetes mellitus in periodontal disease induced changes of the gingival epithelium and connective tissue. **Tissue and Cell**, v. 40, n. 4, p. 283-292, 2008.

SILVA, V. O. et al. β -Glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) Reduce Glucose Levels and Attenuate Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats with Periodontal Disease. **Plos One**, v. 10, n. 8, 2015.

SIMON, O. R.; WEST, M. E. Unstable diabetic state produced by small dose of streptozotocin in rats. **West Indian Medical Journal**, v. 41, n. 4, p. 146-149, 1992.

SLOTS, J. Research, Science and Therapy Committee. Systemic antibiotics in periodontics. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 11, p. 1553-1565, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Algoritmo para o tratamento do diabetes tipo 2: posicionamento oficial SBD nº 3. São Paulo, 2011a.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2011. Jardim Londrina, SP: AC Farmacêutica Ltda, 2011b.

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, n. 1, p. 143-146, 2011.

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

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.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiological Research**, v.50, n. 6, p. 536-546, 2001.

TAPPEINER H. V.; JODLBAUER, A. Uber 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, J. J.; PRESHAW, P. M.; LALLA, E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 84, n. 4, p. 113-134, 2013.

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.

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.

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, n. 4, p. 687-693, 2012.

THEODORO, L. H.; CAIADO, R. C.; LONGO, M. 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.

THORNTON, F. J.; BARBUL, A. Healing in the gastrointestinal tract. **Surgical Clinical of North America**, v. 77, n. 3, p. 549-573, 1997.

TSALIKIS, L.; SAKELLARI, D.; DAGALIS, P.; BOURA, P.; KONSTANTINIDIS, A. Effects of doxycycline on clinical, microbiological and immunological parameters in well-controlled diabetes type-2 patients with periodontal disease: a randomized, controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 41, n. 10, p. 972-980, 2014.

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.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The Interaction of Lipopolysaccharides With Phenothiazine Dyes. **Lasers Surgical Medicine**, v. 33, n. 5, p. 311-319, 2003.

VALENZUELA, M. T.; QUADROS, C. Antibiotic resistance in Latin America: A cause for alarm. **Vaccine**, v. 27, p. 25-28, 2009.

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.

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. Methylene blue derivatives--suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **International of Journal Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 4, p. 381-394, 2000.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. Methylene Blue--a therapeutic dye for all seasons? **Journal of Chemotherapy**, v. 14, n. 5, p. 431-443. Review, 2002.

WESTFELT, E.; RYLANDER, H.; BLOHME, G.; JONASSON, P.; LINDHE, J. The effect of periodontal therapy in diabetics. Results after 5 years. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 23, n. 2, p. 92-100, 1996.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n.5, p. 1047-1053, 2004.

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. 569-574, 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 Photobiology B: Biology**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 1999.

YILMAZ, S.; KURU, B.; KURU, L.; NOYAN, U.; ARGUN, D.; KADIR, T. Effect of Galium Arsenide Diode Laser on human periodontal disease: a microbical and clinical study. **Lasers Surgical Medicine**, v. 30, n. 1, p. 60-66, 2002.

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. 226-229. Review, 2002.

ANEXO A - 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 B - NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS DA REVISTA *JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH*.

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.

Journal of Periodontal Research guarantees an effective review and publication process. Rapid review processing: on average 32 days from submission to first decision. Rapid publication: on average 55 days from acceptance to online availability and Medline indexing

Useful Websites: [Submission Site](#), [Author Services](#), [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

The *Journal of Periodontal Research* is an international research periodical the purpose of which is to publish original clinical and basic investigations and review articles concerned with every aspect of periodontology and related sciences. Reports of scientific meetings in periodontology and related fields are also published.

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 the *Journal of Periodontal Research*. 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

The *Journal of Periodontal Research* 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.

The *Journal of Periodontal Research* 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.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

2.2. Ethical Approvals

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 Photographs of People

The *Journal of Periodontal Research* follows current HIPAA guidelines for the protection of patients/subject privacy. If an individual pictured in a digital image or photograph can be identified, his or her permission is required to publish the image. The corresponding author may submit a letter signed by the patient authorizing the *Journal of Periodontal Research* to publish the image/photo. Or, a form provided by the *Journal of Periodontal Research* (available by clicking the "Instructions and Forms" link in Manuscript Central) may be downloaded for your use. This approval must be received by the Editorial Office prior to final acceptance of the manuscript for publication. Otherwise, the image/photo must be altered such that the individual cannot be identified (black bars

over eyes, tattoos, scars, etc.). The *Journal of Periodontal Research* will not publish patient photographs that will in any way allow the patient to be identified, unless the patient has given their express consent.

2.4 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.

The *Journal of Periodontal Research* 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.

2.5 Conflict of Interest and Source of Funding

Please disclose information concerning sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest under Acknowledgements

2.6 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

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.

2.8. Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login to Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS), they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

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 Agreements (OAA):

Creative Commons License 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 FAQ hosted on Wiley Author Services <http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-301.html> and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)], 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 self-archiving policy, please visit <http://www.wiley.com/go/funderstatement>

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jre>. 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 online and below. For further assistance, please contact the editorial office at reedoffice@wiley.com

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jre>

- Log-in or, if you are a new user, click “register here”.
- If you are registering as a new user.
 - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/jre> and enter your email address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select “Corresponding Author Center”

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your “Corresponding Author Center”, submit your manuscript by clicking the submission link under “Author Resources”.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc/.docx) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, figure legends and tables but *no* embedded figures. Figure tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to the Journal of Periodontal Research will be reviewed by two experts in the field. The Journal of Periodontal Research uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suggest a Reviewer

The Journal of Periodontal Research 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 names and current email addresses of 2 potential international reviewers whom you consider capable of reviewing your manuscript.

3.6. 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.

3.7. Email Confirmation of Submission

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

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre'. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit your revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original 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 must conform to the highest international standards in the field.

Review Articles: are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field. 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.

Mini Reviews are covering a smaller area and may be written in a more free format.

Short Communications: Short communications, limited to 1-3 pages, including illustrations and references, will be considered for rapid publication. Such papers must be based on work that is of special importance or having the potential for great impact, or a body of work that is complete but of insufficient scope to warrant a full-length paper. Short communications need not follow the usual divisions.

Meeting Reports: Reports of scientific meetings in periodontology and related fields are also published.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 7 published pages (including figures and tables) are subject to a charge of GBP70.00 per additional page. For guidance purposes, one published page amounts approximately to 5,500 characters; text should be reduced if figures/tables are included within the 7 pages. If authors are unable to pay additional page fees they will need to reduce the length of their articles.

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. 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 and symbols: Abbreviations should be in accordance with Guidelines laid down by the American Society of Microbiology. Unless they are in common usage (e.g. DNA), all terms must be displayed in full in the key words, and the first time that they appear in the abstract, the main text, tables and figures, followed by the abbreviation in parentheses. If an abbreviation is used in the body of figure or table only it must be defined in the figure legend or table footnotes. The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro* and *in vivo* are to be italicized. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of *Webster's Third New International Dictionary* will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined in the typescript. The full proper name (e. g. *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e. g. *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e. g. streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalized and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e. g. *Ps.* for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names.

It is strongly recommended that all abbreviations be introduced in the first paragraph in Materials and Methods. Alternatively, define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used; e.g., "Cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM)." Generally, eliminate abbreviations that are not used at least three times in the text (including tables and figure legends).

5.3. Structure

All manuscripts submitted to the Journal of Periodontal Research should include: Title page, abstract, main text, references and tables, figures and figure legends were appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, name(s) of the author(s), initials, and institutional affiliation(s), a running title not to exceed 40 letters and spaces, and the name and complete mailing address, including email address, of the author responsible for correspondence. We accept only one corresponding author per manuscript and in case of co-correspondence a foot note will be added indicating 'Both the authors have contributed equally to the work'. The author must list 4 keywords for indexing purposes.

Abstract: The abstract should consist of 1) the objective 2) the background data discussing the present status of the field 3) methods 4) results 5) conclusion.

Main Text of Original Research Articles

Introduction: Summarize the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively.

Material and methods: Materials and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made.

Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all of the data in the tables and illustrations. Important observations should be emphasized.

Discussion: Summarize the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Main Text of Reviews, Short Communications and Meeting Reports

These need not follow the usual divisions.

Acknowledgements: Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support must be acknowledged.

5.4. References

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text, and should be kept to a pertinent minimum. References should include the beginning and ending page numbers. Identify references in the text, tables, and figure legends by Arabic numerals in parentheses. References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first notation of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which is based on *Index Medicus*. Manuscripts accepted but not published may be cited in the reference list by placing "in press" after the abbreviated title of the journal. Abstracts and manuscripts not yet accepted may be cited in full in the text but not in the reference list. References must be verified by the author(s) against the original documents.

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://refman.com/downloads/styles>

Examples:

(1) *Standard journal article*

(List all authors up to 6; for 7 or more list the first 3 and add "et al.") Dockrell H, Greenspan JS. Histochemical identification of T- cells in oral lichen planus. *Oral Surg* 1979; 48: 42-49. Thomas Y, Sosman J, Yrigoyen O, et al. Functional analysis of human T- cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B-cell differentiation. *J Immunol* 1980; 125: 2402-2405.

(2) *Corporate author*

The Royal Marsden Hospital Bone- Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone- marrow graft without preconditioning in post- hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977; 2: 628-630.

(3) *No author given*

Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas [Editorial]. *Br Med J* 1981; 283: 628-635.

(4) *Journal supplement*

Mastri AR. Neuropathology of diabetic neurogenic bladder. *Ann Intern Med* 1980; 92 (2 pt 2): 316- 324.

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979; 54 (suppl 1): 26- 28.

(5) *Journal paginated by issue*

Seaman WB. The case of the pancreatic pseudocyst. *Hosp Pract* 1981; 16 (Sep): 24-29.

(6) *Personal author(s)*

Eisen HN. *Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response*, 5th edn. New York: Harper Row, 1984:406-420.

(7) *Editor, compiler, chairman as author*

Dausset J, Colombani J, eds. *Histocompatibility testing 1972*. Copenhagen: Munksgaard, 1973: 12-18.

(8) *Chapter in a book*

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: WB Saunders, 1974: 457-480.

(9) *Published proceedings paper*

DePont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. *Proceedings of 3rd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology*. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-50.

(10) *Agency publication*

Ranofsky AL. *Surgical operations in short-stay hospitals: United States - 1975*. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 1978; DHEW publication no. (PHS) 78-1785. (Vital and health statistics; series 13; no. 34.)

(11) *Dissertation or thesis*

Cairns RB. *Infrared spectroscopic studies of solid oxygen*. Berkeley, CA: University of California, 1965. 156pp. Dissertation.

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with arabic numerals. Use titles which are self explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single column width (54 mm) after reduction, although in some cases 113 mm (double column) and 171 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed.

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.

Further information can be obtained at Wiley Blackwell's guidelines for figures: <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.

5.6. Supporting Material

Supporting 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 via the online edition, can be submitted.

It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Material is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Material is such that it cannot be accommodated on the journal's Web site, the author agrees to make the Supporting Material available free of charge on a permanent Web site, to which links will be set up from the journal's website. The author must advise Wiley Blackwell if the URL of the website where the Supporting Material is located changes. The content of the Supporting Material must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of Supporting Material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Material' and providing titles of figures, tables, etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the authors Web site cannot be reviewed. The Supporting Material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.

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.

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 Online Publication Prior to Print

The Journal of Periodontal Research 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 through Wiley Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a