

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
unesp  --JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA

**Avaliação Histológica e Histométrica da Terapia
Fotodinâmica no Tratamento da Doença Periodontal
Experimental Induzida em
Ratos Diabéticos e não Diabéticos.**

**ARAÇATUBA
2007**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
unesp  **“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA

**Avaliação Histológica e Histométrica da Terapia
Fotodinâmica no Tratamento da Doença Periodontal
Experimental Induzida em
Ratos Diabéticos e não Diabéticos.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, do Campus de Araçatuba, como requisito
para a obtenção do Título de Doutor em
Odontologia – Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Titular Dr. Valdir Gouveia Garcia

ARAÇATUBA
2007

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

J447h

Almeida, Juliano Milanezi de

Histológica e histométrica da terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal induzida em ratos diabéticos e não-diabéticos / Juliano Milanezi de Almeida. - Araçatuba : [s.n.], 2007
175 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2007

Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

Co-orientador: Profa. Dra. Leticia Helena Theodoro

1. Fotoquimioterapia 2. Doenças periodontais 3. Diabetes mellitus
4. Tratamento periodontal

Black D6

CDD 617.632

Dados curriculares

Dados Curriculares

Juliano Milanezi de Almeida

NASCIMENTO: 30 de novembro de 1976 – Manduri – SP.

FILIAÇÃO: Aurivan Antunes de Almeida
Nilce Milanezi de Almeida

1997/2000: Curso de Graduação
Universidade do Sagrado Coração – USC - Bauru.

2000/2001: Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia, na Sede da APCD - Bauru.

2001/2003: Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de Especialização, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

2003/2004: Curso de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Periodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

2005/2007: Curso de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Periodontia, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Dedicatória

Dedicatória

A Deus

*Obrigado Senhor, por estar sempre presente
em meu caminho, guiar-me e sempre colocar pessoas
maravilhosas em meu caminho e convívio
em todos os momentos.*

Aos meus pais, AURIVAN E NILCE, obrigado pelos incentivos, amor, carinho e preocupação durante toda a minha caminhada. Sigo os exemplos de vocês nas conquistas da vida, sempre com muita honestidade e trabalho.

Obrigado por toda ajuda me dada sem medir esforços, deixando de lado muitas vezes as suas vontades para atender as minhas necessidades.

Amo vocês!

A minha esposa Fernanda, mais uma conquista em nossas vidas!

Obrigado por todo carinho, ter muita paciência e compreensão por todos estes anos e toda a dedicação a mim e ao nosso filho.

Te amo infinitamente!

*Ao meu filho Gabriel, a cada sorriso minha alegria e fonte de energia,
desculpe-me pelas ausências, espero estar desde já contribuindo com sua
formação. “Pai Ju” Te ama.*

A minhas irmãs Ana Brígida e Marcela, obrigado por todo carinho que sempre tiveram por mim e sempre preocupadas com minha formação. Amo vocês!

Isidoro e Ângela , obrigado pelo carinho que sempre tiveram por mim, paciência e por toda ajuda prestada até hoje. Sou infinitamente grato a vocês.

A toda minha Família, em especial a Sobrinhas, cunhado, cunhadas e avós pelo carinho que sempre tiveram por mim.

Agradecimentos especiais

Agradecimento Especial

Ao meu Orientador :

Professor Dr. Valdir Gouveia Garcia,

Ha Chefe...que orgulho de tê-lo não só como orientador, educador e pesquisador, mas tê-lo como um grande amigo, um Pai. Obrigado pela confiança depositada, pelos ensinamentos, pelo carinho, pela disponibilidade nas horas que sempre necessitei, pelos conselhos que sempre pedi e vou continuar pedindo! É, mais um passo na minha vida, e o Senhor fazendo parte de forma fundamental. Meu muito obrigado por toda a dedicação por mim!

Meu muito obrigado, hoje e sempre!

A Professora Dr. Leticia Helena Theodoro,

Também minha orientadora! Exemplo de batalhadora e vencedora, poucos são os privilegiados de trabalhar com você e poder compartilhar com os seus conhecimentos. Obrigado pela amizade, confiança e ajuda dada desde o início. Sempre me atendendo não importando a hora e o dia. Obrigado pelos ensinamentos, apoio e carinho. A sua participação em minha formação sempre será fundamental. Muito obrigado.

Ao Professor Dr. Álvaro Francisco Bosco

Obrigado pela amizade sincera meu grande Amigo! Exemplo de Professor, pesquisador e Clínico. Obrigado pelos ensinamentos, carinho, confiança, amizade e dedicação com meu aprendizado. Estar ao teu lado é prazeroso, faz bem sempre estou aprendendo algo novo para vida e para a clínica. Obrigado por todos estes anos de alegria e ensinamento.

A Professora Dr^a. Maria José Hitomi Nagata

Exemplo de Professora e Pesquisadora, obrigado por sempre me ajudar, nos diferentes motivos. Serei eternamente grato por toda ajuda prestada a mim e a meus familiares. Obrigado pela amizade, pelo apoio, pelas oportunidades dadas, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelas palavras consoladoras em momentos difíceis, carinho e pela confiança em mim depositada.

Aos meus amigos e companheiros da Pós-graduação

Danielle, Flavia, Samara, Tatiana, Valmir

Passamos cinco anos juntos, trabalhando, brincando, estudando, pesquisando e chorando! Tempo que não volta mais. Mas as recordações serão para sempre! Fomos uma turma grande com suas particularidades como em outras tantas, obrigado a todos pelos momentos de alegria, ajuda, amizade e respeito. A colaboração de todos foi fundamental no decorrer do curso. A vocês minha admiração e meus sinceros agradecimentos e carinho.

Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações.

(Vinícius de Moraes)

Agradecimientos

Agradecimentos

À Direção da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP. Em nome do Diretor Prof. Titular Pedro Felício Estrada Bernabé e Vice Diretor Prof.ª Adj. Ana Maria Pires Soubhia

À Ex-Direção da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP. Em nome do Diretor Prof, Dr. Paulo Roberto Botacin e Vice Diretor Prof. Dr. Célio Percinoto

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Odontologia na pessoa do Professor Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, pela ajuda dada ao desenvolvimento do curso de Pós-graduação e lutar por termos o melhor curso de Pós-Graduação.

À ex-coordenação do curso de Pós-Graduação em Odontologia na pessoa do Professor Dr. Wilson Roberto Poi, por estar sempre disposto a nos dar suporte nas horas mais difíceis e lutar por termos o melhor curso de Pós-Graduação.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, pela dedicação e ensinamentos que me proporcionaram no curso.

Ao Professor Dr. Tetuo Okamoto, obrigado pela colaboração e ensinamentos, estando sempre disposto a ajudar.

Ao Professor Dr. Roberto Holland, pelas palavras amigáveis, ensinamentos científicos e por estar sempre disposto a ajudar. Meus agradecimentos e admiração.

A Dr. Sueli Murata, pela amizade, e contribuição dada ao desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Periodontia, Claudiomiro e Odair em especial ao Odair, grande amigo que sempre esteve presente em todos os momentos. Obrigado

Juliano Milanezi de Almeida

pela paciência, o fornecimento dos ensinamentos fundamentais na realização da parte experimental. Os meus sinceros agradecimentos.

A todos os funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Dirce, Gilmar, Cleide e Berna, que sempre estiveram dispostos a dar o melhor ensinamento no processamento histológico. Dedicção e paciência sem medir esforços dados ao meu trabalho. Dirce, a sua colaboração foi fundamental, por muitas vezes deixando seu lar nas horas de folga para ajudar-me no laboratório. Os meus sinceros agradecimentos e admiração.

Aos funcionários do Departamento de Endodontia, em especial a Nelci, pela ajuda e ensinamentos dados em todos os momentos.

A todos os funcionários da Biblioteca da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Araçatuba, obrigado pela colaboração, ensinamentos e de fazer a “nossa” Biblioteca um lugar agradável e alegre.

A todos os funcionários da seção de Pós-graduação, Marina, Valéria e Diogo, pela paciência, ajuda e estarem sempre disponíveis.

Aos funcionários do Biotério, Camilo e João, amigos que contribuíram de forma incansável, que me proporcionaram a realização dos meus experimentos de forma agradável sempre dispostos a ajudarem não importando a hora. Obrigado vocês sempre serão lembrados como grandes amigos.

Aos grandes companheiros Samara, Danielle, Valmir, Ana Cristina, Thiago e Leandro, que não mediram esforços em me ajudar na realização da parte laboratorial e experimental, os meus sinceros agradecimentos.

Aos alunos do curso de graduação em odontologia pela UNESP – Campus de Araçatuba, que ajudaram na parte laboratorial.

Aos meus colegas do Curso de Pós-graduação em Odontologia pela amizade, convívio e colaboração.

Aos meus colegas do Curso de Mestrado e Doutorado em Periodontia, Flávia, Danielle, Samara, Tatiana, Valmir, Sergio, Michel, Ana Cristina, Alex, Guto, Luciana, Thiago, Leandro e Michyele pelo convívio, colaboração e amizade.

A Professora Dr. Simone Maria Galvão de Sousa, obrigado por toda ajuda e amizade.

A Dr. Andresa Borges Soares, pela amizade e disposição em ajudar sem medir esforços.

Ao Bruno, obrigado pela ajuda, amizade e por todo carinho que tem por nós.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por proporcionarem o funcionamento e conforto da Instituição.

Aos funcionários da Manutenção, que sempre estiveram a disposição nos atendendo prontamente. Os meus agradecimentos.

Aos animais experimentais, meu profundo respeito.

Enfim a todos que me ajudaram de forma direta e indiretamente os meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

*"Tudo tem seu tempo e até certas manifestações mais
vigorosas e originais entram em voga ou saem de moda.*

Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna."

(Baltasar Gracián)

Resumo

Almeida JM, Garcia VG. Avaliação histológica e histométrica da terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal induzida em ratos diabéticos e não-diabéticos [tese]. Araçatuba: UNESP – Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho; 2007.

R E S U M O

O objetivo do presente estudo foi avaliar histológica e histometricamente a influência da terapia fotodinâmica (PDT) no tratamento coadjuvante da doença periodontal (DP) experimental induzida em ratos diabéticos e não-diabéticos.

Foram utilizados 180 ratos divididos em 2 grupos: Grupo A: 90 animais não-diabéticos e Grupo B: 90 animais diabéticos induzidos pela aloxana a 2% (42 mg/Kg). Nos Grupos A e B a DP foi induzida no primeiro molar inferior. Após 7 dias de evolução da DP, em todos animais de ambos os Grupos, a ligadura foi removida seguida de raspagem e alisamento radicular (RAR) e divididos conforme os tratamentos: I (RAR) - RAR e irrigação com 1 ml de soro fisiológico; II (TBO) - RAR e irrigação com 1 ml de azul de toluidina O (TBO 100 µg/ml); III (PDT) - RAR, irrigação com 1 ml de TBO e após 1 minuto irradiação com o laser em baixa intensidade. O laser (AsGaAl, 660 nm) foi aplicado na vestibular e lingual em 3 pontos equidistantes em cada região, com dose energética de 4 J/ponto. Dez animais de cada grupo experimental e tratamento foram sacrificados nos períodos de 7, 15 e 30 dias para a análise histológica e histométrica. Os dados histométricos foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$).

Os animais tratados com a PDT (Grupo A e B), apresentaram histologicamente tecido conjuntivo (TC) bem organizado e trabéculas ósseas presentes em toda a extensão da

furca. Nos animais tratados com RAR nos dois grupos, o TC estava desorganizado, com intenso infiltrado inflamatório e áreas de reabsorções ósseas e cementárias. As alterações mais severas foram observadas no Grupo B. Histometricamente, no Grupo A, o tratamento com a PDT ($0,33\pm 0,05 \text{ mm}^2$; $0,35\pm 0,06 \text{ mm}^2$; $0,27\pm 0,07 \text{ mm}^2$), promoveu menor perda óssea ($p<0,05$) na região de furca quando comparado com os animais tratados com RAR ($1,11\pm 0,11 \text{ mm}^2$; $0,84\pm 0,12 \text{ mm}^2$; $0,97\pm 0,13 \text{ mm}^2$) e TBO ($0,51\pm 0,12 \text{ mm}^2$; $0,70\pm 0,13 \text{ mm}^2$; $0,64\pm 0,08 \text{ mm}^2$), em todos os períodos experimentais. No Grupo B, o tratamento com a PDT ($0,29\pm 0,03 \text{ mm}^2$; $0,24\pm 0,02 \text{ mm}^2$; $0,27\pm 0,06 \text{ mm}^2$) promoveu menor perda óssea ($p<0,05$) quando comparado com os animais tratados com a RAR ($2,27\pm 0,47 \text{ mm}^2$; $3,23\pm 0,34 \text{ mm}^2$; $2,82\pm 0,75 \text{ mm}^2$) e com TBO ($0,51\pm 0,15 \text{ mm}^2$; $0,44\pm 0,07 \text{ mm}^2$; $0,57\pm 0,13 \text{ mm}^2$) em todos os períodos experimentais.

Dentro dos limites do presente estudo pode-se concluir que a PDT foi um tratamento coadjuvante benéfico ao tratamento convencional de RAR na doença periodontal experimental induzida por placa bacteriana e na modificada pelo diabetes mellitus.

Palavras chaves: Terapia Fotodinâmica; Doença Periodontal; Diabetes; Tratamento Periodontal.

Abstract

Almeida JM, Garcia VG. Histological and histometric analysis of PDT in periodontal disease ligature-induced in diabetic and non-diabetic rats [thesis]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2007.

A B S T R A C T

The aim of this study was to evaluate histological and histometrically the influence of photodynamic therapy (PDT) as an adjuvant treatment on the experimentally induced periodontitis in diabetic and non-diabetic rats.

One-hundred eighty rats were assigned to 2 groups: Group A: Ninety non-diabetic and Group B: Ninety alloxan-diabetic. In Group B, after 7 days of alloxan-diabetic induction (42 mg/Kg), the periodontal disease (PD) was induced at the first mandibular molar. Seven days after the establishment of PD, the ligatures were removed. Thereafter, all animals were submitted to scaling and root planing (SRP) and then divided according with the following protocols treatment: I (SRP) – SRP and irrigation with saline solution (1 mL); II (TBO) – SRP and irrigation with 1 mL of Toluidine Blue (TBO) (100 µg/mL); III (PDT) – SRP, irrigation with 1mL of TBO and after 1 minute, low-level laser therapy (LLLT). The LLLT GaAlAs (4 J) was performed in 3 equidistant points at the each buccal and lingual aspect of the first mandibular molar. Ten animals in each experimental group and treatment were sacrificed at 7, 15 and 30 days. Histologic and histometric analyses were performed. The histometric values were statistical analyzed ($p < 0.05$).

The animals treated by PDT in Group A and B showed the furcation area fulfilled with a well-organized connective tissue (CT) and with bone trabeculae in all extension of

furcation. In animals treated with SRP, the CT was poorly organized, showing an intense inflammatory infiltrate and areas with bone and cement resorption. The worst tissue response was found in Group B. Histometrically, in Group A, the animals treated by PDT (0.33 ± 0.05 mm²; 0.35 ± 0.06 mm²; 0.27 ± 0.07 mm²) showed a lesser bone loss ($p<0.05$) in all experimental periods than SRP (1.11 ± 0.11 mm²; 0.84 ± 0.12 mm²; 0.97 ± 0.13 mm²) and TBO (0.51 ± 0.12 mm²; 0.70 ± 0.13 mm²; 0.64 ± 0.08 mm²). In Group B, the animals treated by PDT (0.29 ± 0.03 mm²; 0.24 ± 0.02 mm²; 0.27 ± 0.06 mm²) showed a lesser bone loss ($p<0.05$) in all experimental periods than SRP (2.27 ± 0.47 mm²; 3.23 ± 0.34 mm²; 2.82 ± 0.75 mm²), and TBO (0.51 ± 0.15 mm²; 0.44 ± 0.07 mm²; 0.57 ± 0.13 mm²).

Within the limits of this study, it was concluded that PDT was a beneficial adjuvant treatment to the SRP conventional treatment in periodontal diseases induced by plaque bacterial and systemically modified by diabetes mellitus.

Key-words: Photodynamic therapy; periodontal disease; diabetes; periodontal treatment.

Lista de figuras

Lista de Figuras

Figura 1 - Linha do tempo ----- 74

Figura 2: Fotomicrografia ilustrando as estruturas periodontais na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida nos diferentes Grupos (A e B) e Tratamentos: **(a)** Grupo A, tratamento I (RAR) 30 dias, 1/3 médio da furca – presença de áreas de reabsorções ósseas; **(b)** Grupo A, tratamento III (PDT) 30 dias, 1/3 coronal da furca – presença de espessas trabéculas ósseas e inserção de densas fibras colágenas; **(c)** Grupo B, tratamento I (RAR) 30 dias, 1/3 apical da furca – presença de áreas de reabsorções ósseas com trabéculas delgadas; **(d)** Grupo B, tratamento III (PDT) 30 dias, 1/3 coronal da furca – presença de espessas trabéculas ósseas íntegras e inserção de densas fibras colágenas (Coloração de Hematoxilina e Eosina, magnificação original 40x). ----- 75

Figura 3: Fotomicrografia ilustrando a área de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida nos diferentes Grupos (A e B) e Tratamentos: **(a)** Grupo A, tratamento I (RAR) 30 dias; **(b)** Grupo A, tratamento III (PDT) 30 dias; **(c)** Grupo B, tratamento I (RAR) 30 dias; **(d)** Grupo B, tratamento III (PDT) 30 dias; (Coloração de Tricrômico de Masson, magnificação original 12,5x). ----- 76

Figura 4 - Aplicação endovenosa da aloxano (42 mg/ml) -----	88
Figura 5 - Coleta e monitoramento sanguíneo. -----	88
Figura 6 - Hemostasia. -----	88
Figura 7 - Kit Accu-CHEK [®] Advantage. -----	88
Figura 8 - Registro do nível glicêmico. -----	88
Figura 9 - Animal posicionado na mesa operatória.-----	89
Figura 10 - Pinça modificada utilizada na passagem do fio. -----	89
Figura 11 - Posicionamento do fio. -----	89
Figura 12 - Ligadura posicionada. -----	89
Figura 13 - Doença Periodontal após 7 dias de indução - Ratos não-Diabéticos. ---	89
Figura 14 - Doença Periodontal após 7 dias de indução - Ratos Diabéticos. -----	89
Figura 15 - Cureta de Gracey mine-five 13-14. -----	89

Figura 16 - Raspagem e Alisamento Radicular. -----	89
Figura 17 - Aplicação sub-gengival do fotossensibilizador – TBO (100µg/ml). ---	90
Figura 18 - Realização da PDT – TBO + Laser. -----	90
Figura 19 - Unidade Laser GaAlAs; Laser Bio Wave LLLT; Kondortech Equipamentos. -----	90
Figura 20 - Rato não diabético – Ausência de catarata. -----	91
Figura 21 - Rato diabético – Presença de catarata. -----	91
Figura 22 - Tamanho dos animais de mesma idade no final do experimento. (A) Rato diabético; (B) Rato não diabético. -----	91
Figura 23 - Alterações Vasculares. (A) Rato diabético; (B) Rato não diabético. ---	91
Figura 24 - Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos A e Tratamento I (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); (B) observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x).-----	92

Figura 25 - Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos A e Tratamento II (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); **(B)** observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x). ----- 93

Figura 26 - Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos A e Tratamento III (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); **(B)** observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x). ----- 94

Figura 27 - **(A)** Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos B e Tratamento I (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); **(B)** observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x). ----- 95

Figura 28 - **(A)** Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos B e Tratamento II (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); **(B)** observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x). ----- 96

Figura 29 - **(A)** Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos B e Tratamento III (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); **(B)** observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x).----- 97

Figura 30 - Fotomicrografia representativa da região de furca dos animais não diabéticos sem a indução da doença periodontal experimental. (Tricrômico de Masson, magnificação original 24x do original). ----- 98

Figura 31 - Fotomicrografia representativa da região de furca dos animais diabéticos sem a indução da doença periodontal experimental. (Tricrômico de Masson, magnificação original 24x do original). ----- 98

Lista de tabelas

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Médias e Desvio padrão (M±DP) dos níveis glicêmicos (mg/dl) nos animais não-diabéticos e diabéticos nos diferentes grupos e períodos experimentais. ----- 71
- Tabela 2** – Média e Desvio padrão (M±DP) dos dados histométricos da área do ligamento periodontal (mm²) na região de furca do primeiro molar inferior do lado direito, sem periodontite experimental induzida (SDP), de acordo com cada grupo (A e B) e período (7,15 e 30 dias). ----- 72
- Tabela 3** – Médias e desvio padrão (M±DP) dos dados histométricos da perda óssea alveolar (mm²) na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental induzida, de acordo com cada grupo, tratamento e período. ----- 73
- Tabela 4** – Peso Médio dos animais não-diabéticos e Desvio padrão nos diferentes grupos e períodos experimentais.----- 99
- Tabela 5** – Peso Médio dos animais diabéticos e Desvio padrão nos diferentes grupos e períodos experimentais.----- 42

Lista de abreviaturas

Lista de Abreviaturas

µg – Microgramas, equivalente à um milhão de vezes menor que o grama.

µg/mL – Microgramas por mililitros.

ATP – Adenosina Trifosfato.

Densidade energética – Quantidade de energia aplicada em uma área. É expressa em Joules por centímetro quadrado (J/cm^2).

DNA – Ácido desoxidoribonucléico.

H&E – Expressa a técnica de coloração das lâminas. Hematoxilina e eosina.

TM - Expressa a técnica de coloração das lâminas. Tricrômico de masson.

Hertz (Frequência) – número de oscilações completas de uma onda por segundo, e expresso em Hertz ou pulsos por segundo.

Joule – Uma unidade de energia, abreviada como J.

Kg - Unidade fundamental de medida de massa.

Laser – Acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Luz Amplificada pela Emissão Estimulada de Radiação).

Laser AsGa – Laser de Arsênito-Gálio.

Laser AsGaAl – Laser de Arsênito-Gálio-Alumínio.

Laser de emissão contínua – Laser que emite energia continuamente.

Laser He-Ne – Laser de Hélio-Neônio.

LLLT – Laser de baixa intensidade. Expressa Low Level Laser Therapy.

MB – Azul de Metileno.

mg – Miligramas, equivalente à milésima parte do grama.

mg/Kg – Miligramas por quilo.

Milijoule – Joule dividido por 1000, a abreviatura é mJ.

mL – Mililitros, equivalente à milésima parte do litro.

Monocromático – Uma única frequência de comprimento de onda – uma única cor.

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.

mW – Milionésima parte do Watt. 1/1000 Watt.

Nanometro – Bilionésima parte do metro, utilizado para medir o comprimento de onda. Sua abreviatura é 10^{-9} metros.

Tempo de exposição – Período total que o tecido é exposto à energia Laser. Expresso em minutos ou segundos.

TBO – Azul de toluidina O.

PDT – Terapia Fotodinâmica.

RAR – Raspagem e alisamento radicular

Watt – Unidade de potência. Um Watt é igual a um Joule por segundo.

Sumário

Sumário

1 - INTRODUÇÃO -----	44
2 - PROPOSIÇÃO-----	45
3 - MATERIAL E MÉTODO-----	46
4 - RESULTADOS-----	51
5 - DISCUSSÃO-----	54
6 - CONCLUSÃO-----	60
REFERÊNCIAS -----	61
ANEXOS-----	77

Manuscrito
para
publicação*

*De acordo com as normas do Journal of Periodontology

Título: Avaliação Histológica e Histométrica da Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Doença Periodontal Induzida em Ratos Diabéticos e Não-diabéticos.

Autores:

* Juliano Milanezi de Almeida DDS, MS.

* Valdir Gouveia Garcia, DDS, MS, PhD.

* Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada – Disciplina de Periodontia, Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente:

Valdir Gouveia Garcia

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP:

Rua José Bonifácio 1193, Centro.

CEP: 16050-300 Araçatuba, SP, Brazil.

E-mail: vg.garcia@uol.com.br

Número de figuras: 3

Número de Tabelas: 3

Palavras Chaves: Terapia Fotodinâmica; Doença Periodontal; Diabetes; Tratamento Periodontal.

Resumo:

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar histológica e histometricamente a influência da terapia fotodinâmica (PDT) no tratamento coadjuvante da doença periodontal (DP) experimental induzida em ratos diabéticos e não-diabéticos.

Métodos: Foram utilizados 180 ratos divididos em 2 grupos: Grupo A: 90 animais não-diabéticos e Grupo B: 90 animais diabéticos induzidos pela aloxana a 2% (42 mg/Kg). Nos Grupos A e B a DP foi induzida no primeiro molar inferior. Após 7 dias de evolução da DP, em todos animais de ambos os Grupos, a ligadura foi removida seguida de raspagem e alisamento radicular (RAR) e divididos conforme os tratamentos: I (RAR) - RAR e irrigação com 1 ml de soro fisiológico; II (TBO) - RAR e irrigação com 1 ml de azul de toluidina O (TBO 100 µg/ml); III (PDT) - RAR, irrigação com 1 ml de TBO e após 1 minuto irradiação com o laser em baixa intensidade. O laser (AsGaAl, 660 nm) foi aplicado na vestibular e lingual em 3 pontos equidistantes em cada região, com dose energética de 4 J/cm²/ponto. Dez animais de cada grupo experimental e tratamento foram sacrificados nos períodos de 7, 15 e 30 dias para a análise histológica e histométrica. Os dados histométricos foram submetidos à análise estatística (p<0,05).

Resultados: Os animais tratados com a PDT (Grupo A e B), apresentaram histologicamente tecido conjuntivo (TC) bem organizado e trabéculas ósseas presentes em toda a extensão da furca. Nos animais tratados com RAR nos dois grupos, o TC estava desorganizado, com intenso infiltrado inflamatório e áreas de reabsorções ósseas e cementárias. As alterações mais severas foram observadas no Grupo B. Histometricamente, no Grupo A, o tratamento com a PDT (0,33±0,05 mm²; 0,35±0,06 mm²; 0,27±0,07 mm²), resultou em menor perda óssea (p<0,05) na região de furca quando comparado com os animais tratados com RAR (1,11±0,11 mm²; 0,84±0,12 mm²; 0,97±0,13 mm²) e TBO (0,51±0,12 mm²; 0,70±0,13 mm²; 0,64±0,08 mm²), em todos os períodos

experimentais (7, 15 e 30 dias respectivamente). No Grupo B, o tratamento com a PDT ($0,29\pm 0,03$ mm²; $0,24\pm 0,02$ mm²; $0,27\pm 0,06$ mm²) resultou em menor perda óssea ($p<0,05$) quando comparado com os animais tratados com a RAR ($2,27\pm 0,47$ mm²; $3,23\pm 0,34$ mm²; $2,82\pm 0,75$ mm²) e com TBO ($0,51\pm 0,15$ mm²; $0,44\pm 0,07$ mm²; $0,57\pm 0,13$ mm²) em todos os períodos experimentais (7, 15 e 30 dias respectivamente).

Conclusão: Dentro dos limites do presente estudo concluiu-se que a PDT foi um efetivo tratamento coadjuvante benéfico ao tratamento convencional de RAR na doença periodontal experimental induzida por placa bacteriana e na modificada pelo diabetes mellitus.

Palavras chaves: Terapia Fotodinâmica; Doença Periodontal; Diabetes; Tratamento Periodontal.

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória que resulta na destruição dos tecidos periodontais. É amplamente aceito que a iniciação e progressão da doença periodontal são causadas pela presença de microorganismos patogênicos que invadem o hospedeiro. Estes microorganismos podem causar danos diretos e indiretos ao periodonto, por ativar uma variedade de resposta no hospedeiro, que resulta em destruição do tecido conjuntivo e ósseo.¹ Os fatores de risco para a doença periodontal incluem fator genético,² cigarro^{3,4} e diabetes mellitus não controlada.^{5,6} Estudos epidemiológicos em pacientes diabéticos não controlados ou com pobre controle glicêmico, têm demonstrado aumento à suscetibilidade a infecções, principalmente a doença periodontal com aumento na sua extensão e severidade.⁷⁻¹² Embora, o mecanismo pelo qual a hiperglicemia pode induzir a destruição periodontal não esteja totalmente elucidado,¹³ inúmeros fatores podem estar correlacionados com a associação da doença periodontal e o diabetes como: redução da função e quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares, redução da síntese e maturação do colágeno, aumento na atividade da colagenase e formação dos produtos finais da glicolisação avançada (AGEs), os quais podem ligar-se aos seus receptores (RAGEs) em macrófagos e monócitos, resultando em aumento da secreção do fator- α de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1(IL-1) e prostaglandina E-2 (PGE₂).¹⁴⁻¹⁶ Estes mecanismos podem levar a uma diminuição da resistência do hospedeiro à infecção, prejuízo na cicatrização e exagerada resposta inflamatória,¹⁷ promovendo conseqüentemente, a severa destruição periodontal e perda dos dentes em indivíduos diabéticos. A presença de doenças sistêmicas gera desafios estratégicos na elaboração do plano de tratamento periodontal convencional, com a utilização de terapias complementares, pode ser vantajosa para compensarem as alterações intrínsecas relacionadas ao processo de reparo periodontal.

Diferentes terapias coadjuvantes ao tratamento mecânico de raspagem e alisamento radicular são propostas para o tratamento periodontal em pacientes diabéticos, incluindo o uso de antibióticos, sendo o mais utilizado os derivados da tetraciclina,¹⁹⁻²⁰ administrados localmente²¹ ou sistemicamente.²²

Recentemente, estudos têm apresentado resultados satisfatórios com a utilização da terapia fotodinâmica (PDT), na doença periodontal experimental em animais²³⁻²⁷ e em humanos,²⁸⁻³⁰ sem comprometimento sistêmico. Esta terapia é definida como uma reação fotoquímica, oxigênio-dependente na qual a ativação de um corante, conhecido como fotossensibilizador, por uma luz visível e de comprimento de onda apropriado, leva a geração de espécies de oxigênio reativo, principalmente oxigênio singleto ou radicais livres, que são tóxicos aos microorganismos.³¹⁻³³

As maiores vantagens da PDT é ser uma terapia específica à célula alvo, não apresentar efeito colateral, iniciar sua atividade somente quando exposta à luz e não favorecer a seleção de cepas resistentes,³³ muito comum com o uso indiscriminado de antibióticos.³⁴

Com o aumento da estimativa do número de pacientes afetados pelo diabetes, mais de 300 milhões de indivíduos até o ano de 2025,³⁵ todas as complicações diabéticas também estarão aumentadas. Assim, o tratamento periodontal em pacientes diabéticos apresenta um desafio na odontologia moderna, e métodos alternativos são requeridos. O presente estudo, tem por objetivo avaliar a influência da terapia fotodinâmica como terapia coadjuvante ao tratamento periodontal convencional em ratos não diabéticos e em ratos diabéticos aloxânicos com doença periodontal experimental induzida.

Materiais e Métodos

Animais

No presente estudo foram utilizados 180 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*) machos, pesando aproximadamente 130g no início do experimento, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais apresentavam-se saudáveis e em condições de sofrerem os procedimentos operatórios. Estes animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo 4 animais cada, separados de acordo com o grupo experimental. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*, e mantidos em ambiente aclimatizado por todo o período experimental. Todo protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia e Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Araçatuba (n. 87/05).

Protocolo Experimental (Figura 1)

Protocolo do desenvolvimento do Diabetes mellitus

Inicialmente todos os animais foram submetidos a coleta de sangue, via veia caudal, para a realização do exame da taxa glicêmica. Após o período de 24 horas de jejum, exceto água *ad libitum*, para a realização da taxa glicêmica, os animais que constituíram o Grupo B (n=90) receberam por via endovenosa (veia caudal), dose única de Aloxana à 2%* na concentração de 42 mg/Kg do peso corpóreo. Os animais do Grupo A (n=90) receberam também por via endovenosa 1 ml de solução salina, com o intuito de promover nestes animais o mesmo grau de estresse dos do Grupo B. A alimentação foi restituída aos animais 12 horas após a administração da Aloxana e da solução salina. O quadro diabético foi avaliado por meio de análise da taxa glicêmica, a qual foi monitorada, por coleta de

* Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

sangue via caudal do animal, antes da indução do diabetes, 7 dias após e nos períodos de sacrifício, utilizando o método de glicose-oxidase[†].^{36,37} Os animais que apresentaram níveis glicêmicos maiores que 300 mg/dl foram considerados diabéticos e utilizados no presente estudo. Após 7 dias da indução do diabetes mellitus foi realizada a indução da doença periodontal nos animais de ambos os grupos.

Protocolo da doença periodontal experimental induzida

A anestesia geral foi obtida pela associação de ketamina (0.4 ml/Kg) e xilazina (0.2 ml/Kg) por injeção via intramuscular. O primeiro molar inferior esquerdo de cada animal do Grupo A e B receberam um fio de algodão (n° 24), mantido em posição subgingival para induzir a doença periodontal experimental.^{38,39} O primeiro molar inferior contra-lateral de ambos os grupos, sem indução da doença periodontal experimental induzida, foi utilizado como controle negativo.

Grupos experimentais

Após 7 dias de evolução da doença periodontal experimental induzida, a ligadura foi removida e todos os molares inferiores esquerdos dos animais do Grupo A e B foram tratados pela técnica da raspagem e alisamento radicular (RAR) para remoção dos agentes etiológicos. A seguir tanto os animais do Grupo A quanto os do Grupo B foram distribuídos em 3 subgrupos experimentais que receberam os seguintes tratamentos: Tratamento I (RAR): Estes animais foram tratados com RAR e irrigação com 1 ml de soro fisiológico; Tratamento II (RAR): Estes animais foram tratados com RAR e posterior irrigação com 1 ml de Azul de Toluidina O (TBO)[‡] na concentração de 100 µg/ml; Tratamento III (PDT): Estes animais foram tratados com RAR e posterior irrigação com 1 ml de TBO na concentração de 100 µg/ml e após 1 minuto, receberam irradiação com o

[†] Accu-Chek Advantage system, Roche Diagnostics, Indianápolis, IN.

[‡] Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

laser em baixa intensidade, realizando desta forma a terapia fotodinâmica (PDT). A raspagem e alisamento radicular foram realizadas com a cureta mini-five 13-14.[§] As soluções de soro fisiológico e TBO foram depositadas no interior da bolsa periodontal lentamente utilizando uma seringa (1 ml) e agulha de insulina (13 mmx4,5 mm)^{**} sem bisel.

Terapia Fotodinâmica (PDT)

Para a realização da PDT foi utilizado, por intermédio de seringa de insulina, irrigação com 1 ml de Azul de Toluidina O (TBO) na concentração de 100 µg/ml, tomando-se o cuidado de dirigir a ponta da agulha para o interior da bolsa periodontal. Decorrido 1 minuto após permanência da droga no tecido foi utilizado o tratamento com laser em baixa intensidade de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)^{††} com comprimento de onda de 660 nm e potência de 30 mW. A irradiação laser foi realizada no modo contínuo, em contato com a área e de forma pontual. A luz laser foi direcionada ao interior da bolsa periodontal em 3 pontos equidistantes na superfície vestibular e 3 pontos equidistantes na superfície lingual. Cada ponto foi irradiado por 133 segundos, recebendo uma energia pontual de 4 J, totalizando 13 minutos e 18 segundos de tempo de exposição e energia total de 24.

Períodos experimentais

Dez animais de cada Grupo e tratamento experimental foram sacrificados, aos 7, 15 e 30 dias após o tratamento da doença periodontal experimental induzida, pela administração de dose letal de thiopental (150 mg/kg).^{‡‡} As mandíbulas foram removidas e fixadas em solução de formol neutro à 10% por um período mínimo de 48 horas.

[§] Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, USA.

^{**} Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda, Curitiba, PR, Brasil.

^{††} GaAlAs; Laser Bio Wave LLLT; Kondortech Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil.

^{‡‡} Cristália, Produtos químicos farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

Processamento Laboratorial

Os espécimes foram desmineralizados em uma solução de partes iguais de 50% de ácido fórmico e 20% de citrato de sódio por 30 dias. Após inclusão dos espécimes em parafina, cortes semi-seriados de 6 µm foram obtidos no sentido mesio-distal e corados com hematoxilina e eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM).

Análise Histológica

Os cortes corados pela técnica de HE e TM foram analisados por microscopia de luz com aumento de 40x. A descrição das características do tecido ósseo e do ligamento periodontal na região de furca dos primeiros molares inferiores com doença periodontal experimental induzida, foi realizada nos espécimes corados pela técnica de HE. Para análise das fibras colágenas foi utilizada a coloração de tricrômico de Masson.

Análise Histométrica

A área (mm²) da perda óssea (PO) na região da furca foi histometricamente determinada utilizando um sistema de análise de imagem.[¶] Após exclusão da primeira e da última secção na qual a região de furca foi evidente, cinco secções equidistantes de cada dente foram selecionadas para análise histométrica. A área do ligamento periodontal nos dentes sem a indução da doença periodontal foi determinada e nos dentes onde foi induzida a doença periodontal experimental, a área compreendida entre a crista óssea e a superfície do cimento a perda óssea, foi mensurada.⁴⁰ A seleção das secções histológicas e histométricas foram realizadas por um examinador treinado e cego ao experimento. Outro examinador cego ao experimento e calibrado realizou a análise histométrica. Os dados da PO de cada

[¶] ImageLab 2000 Software (Diracon Bio Informática - Ltda), Vargem Grande do Sul, SP, Brasil.

espécime foram medidos três vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes²⁹ e os valores médios para cada espécime foram obtidos e comparados estatisticamente.

Análise Estatística

A análise estatística dos dados dos níveis glicêmicos e das taxas de perda óssea histométrica na área de furca, foi realizada pelo software BioEstat 3.0.[#]

Glicemia – Análise estatística

A distribuição normal dos dados glicêmicos (Shapiro-Wilk), permitiu a realização de uma análise de variância a um critério (ANOVA), para determinar a diferença nos animais não-diabéticos e diabéticos, em relação aos seus níveis glicêmicos nos períodos iniciais, após 7 dias da injeção da aloxana e nos períodos de eutanásia. Para as comparações intragrupos após diferença estatística detectada pelo ANOVA, a análise foi complementada pelo teste t pareado ($p < 0,05$).

Análise Histométrica

A hipótese de não haver diferença estatisticamente significativa na taxa de perda óssea na região de furca entre os diferentes grupos e períodos nos dentes com periodontite induzida foi testada. Após análise da normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk, a análise intragrupo e intergrupo foi realizada pela análise de variância a dois critérios (ANOVA $p < 0,05$). Quando o ANOVA detectou diferença estatística, as comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey. Utilizando o mesmo procedimento, a área do ligamento periodontal na região de furca nos dentes sem a doença periodontal experimental induzida foi comparada entre os grupos (A e B) pela análise de variância ANOVA ($p < 0,05$).

[#] BioEstat, Windows 1995, Sonopress Indústria Brasileira, Manaus, AM, Brasil.

Resultados

Análise Clínica

Todos os animais não diabéticos apresentaram-se sem alterações clínicas na saúde geral, com ganho de peso, dentro dos níveis médios esperados para ratos saudáveis. Todos os animais deste grupo, independente do tratamento, apresentaram níveis glicêmicos estáveis, dentro do padrão de normalidade, sem diferença significativa entre eles, por todos os períodos experimentais (Tabela 1).

Os animais diabéticos apresentaram parâmetros clínicos gerais compatíveis com diabetes grave como caquexia e progressiva perda de peso após indução do diabetes. Estes animais apresentaram perda de peso de forma significativa quando comparado com os animais não diabéticos (dados não mostrados). A grande maioria destes animais apresentou catarata bilateral, quadro compatível de diabetes grave. Considerando a taxa glicêmica acima de 300 mg/dl, em todos os animais diabéticos (Grupo B), independente do tratamento realizado, houve uma perpetuação do estado diabético por todo período experimental. Nos animais do Grupo A, não foi detectada diferença significativa dos níveis glicêmicos em todo período experimental. No Grupo B, foi detectado aumento significativo nos níveis glicêmicos dos animais após administração da aloxana, confirmando o estado diabético nos animais do grupo B (Tabela 1).

Análise Histológica

Nos animais do Grupo A e B, na região sem a indução da doença periodontal experimental induzida (primeiro molar inferior direito), o ligamento periodontal, osso alveolar e superfície cementária, apresentaram-se íntegros com características de normalidade em toda extensão da furca.

No Grupo A aos 7, 15 e 30 dias, nos animais que receberam o tratamento I (somente RAR) foi observado um tecido conjuntivo com elevado número neutrófilos polimorfonucleares em degeneração, tecido ósseo com áreas de reabsorção e pouca quantidade de trabéculas ósseas (Fig 2a). No Grupo B aos 7, 15 e 30 dias, nos animais que receberam o tratamento I, o tecido conjuntivo apresentou-se totalmente desorganizado, com discreto número de fibroblastos, áreas de necrose óssea, trabéculas ósseas finas e intenso infiltrado inflamatório (fig 2c).

Aos 7, 15 e 30 dias, nos Grupos A e B, nos animais que receberam o tratamento II (TBO), o tecido conjuntivo apresentou-se bem desenvolvido com moderado número de fibroblastos, discreto infiltrado inflamatório, tecido ósseo bem desenvolvido e ligamento periodontal com características de normalidade.

Nos Grupos A e B, nos animais que receberam o tratamento III (PDT), nos períodos de 7, 15 e 30 dias notou-se um ligamento periodontal íntegro, organizado com suas fibras colágenas paralelas. O tecido conjuntivo apresentou-se bem desenvolvido, íntegro e ausência de infiltrado inflamatório. O cimento e a dentina apresentaram-se íntegros e tecido ósseo com trabéculas ósseas espessas e bem diferenciadas em toda a extensão da furca (Fig 2b e d).

Análise Histométrica

Na comparação dos resultados histométricos, da área do ligamento periodontal entre os animais diabéticos ($0,52 \pm 0,061 \text{ mm}^2$; $0,48 \pm 0,063 \text{ mm}^2$; $0,54 \pm 0,065 \text{ mm}^2$) e não-diabéticos ($0,55 \pm 0,054 \text{ mm}^2$; $0,51 \pm 0,051 \text{ mm}^2$; $0,55 \pm 0,046 \text{ mm}^2$), na região sem a indução da doença periodontal experimental, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre estes animais.

Na análise dos resultados obtidos das medidas de perda óssea na região de furca no grupo dos animais não-diabéticos (Grupo A), foi detectada maior perda óssea, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), no tratamento RAR aos 7 dias ($1,11 \pm 0,11 \text{ mm}^2$) e 30 dias (Fig 3a) ($0,97 \pm 0,13 \text{ mm}^2$) quando comparado com o tratamento TBO aos 7 ($0,51 \pm 0,12 \text{ mm}^2$) e 30 ($0,64 \pm 0,08 \text{ mm}^2$) dias e com o tratamento PDT ($0,33 \pm 0,05 \text{ mm}^2$; $0,35 \pm 0,06 \text{ mm}^2$; $0,27 \pm 0,07 \text{ mm}^2$) (Fig 3b), em todos os períodos experimentais. Os animais tratados com a PDT apresentaram menor perda óssea, com diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o tratamento TBO ($0,51 \pm 0,12 \text{ mm}^2$; $0,70 \pm 0,13 \text{ mm}^2$; $0,64 \pm 0,08 \text{ mm}^2$) em todos os períodos experimentais.

Na análise dos resultados obtidos das medidas de perda óssea na região de furca no grupo dos animais diabéticos (Grupo B), houve maior perda óssea no tratamento RAR ($2,27 \pm 0,47 \text{ mm}^2$; $3,23 \pm 0,34 \text{ mm}^2$; $2,82 \pm 0,75 \text{ mm}^2$) (Fig 3c), quando comparado aos tratamentos TBO ($0,51 \pm 0,15 \text{ mm}^2$; $0,44 \pm 0,07 \text{ mm}^2$; $0,57 \pm 0,13 \text{ mm}^2$) e PDT ($0,29 \pm 0,03 \text{ mm}^2$; $0,24 \pm 0,02 \text{ mm}^2$; $0,27 \pm 0,06 \text{ mm}^2$) (Fig 3d), em todos os períodos experimentais. A comparação entre os dados dos animais tratados pela TBO e pela PDT, houve diferença significativa, com menor perda óssea nos animais tratados com a PDT em todos os períodos experimentais.

Na análise comparativa entre os dados da perda óssea na região de furca entre os animais do Grupo A tratados com RAR ($1,11 \pm 0,11 \text{ mm}^2$; $0,84 \pm 0,12 \text{ mm}^2$; $0,97 \pm 0,13 \text{ mm}^2$) com os animais do Grupo B tratados com PDT, foi detectada menor perda óssea nos animais do Grupo B tratados com a PDT ($0,29 \pm 0,03 \text{ mm}^2$; $0,24 \pm 0,02 \text{ mm}^2$; $0,27 \pm 0,11 \text{ mm}^2$).

Discussão

O presente estudo avaliou a influência da terapia fotodinâmica como terapia coadjuvante ao tratamento periodontal convencional em ratos não diabéticos e em diabéticos aloxânicos com doença periodontal experimental induzida.

O uso do fio de algodão adaptado ao redor do primeiro molar, como descrito por Johnson 1975,³⁸ foi eficiente na indução da doença periodontal experimental, usando o rato como modelo de estudo. Esta ligadura favoreceu a formação de placa bacteriana e indução de uma resposta inflamatória. No presente estudo, a doença periodontal foi caracterizada pelos sinais clínicos de inflamação gengival, como edema, vermelhidão e perda da aderência do tecido gengival ao dente. Nos animais diabéticos, os sinais clínicos de inflamação gengival foram mais exacerbados.

Neste estudo utilizamos a aloxana, um potente agente diabetogênico capaz de promover destruição seletiva das células β do pâncreas, reduzindo experimentalmente a secreção de insulina. Os resultados demonstraram um aumento nos níveis de glicose sanguínea nos ratos tratados com a aloxana, corroborando os relatos da literatura.⁴²⁻⁴⁴

Nossos resultados demonstraram ainda que nos animais diabéticos os danos periodontais encontravam-se mais evidentes, caracterizados por: maior perda óssea na região de furca, desorganização do tecido conjuntivo com discreto número de fibroblastos e intenso infiltrado inflamatório em todos os períodos experimentais, quando comparado aos animais não diabéticos.

Estudos demonstram que complicações do diabetes e da doença periodontal revelam que a hiperatividade inata da resposta imune pode ser um antecedente para ambas as doenças, a qual provavelmente tem um efeito sinérgico quando eles co-existem no hospedeiro.⁴⁵ Assim nossos resultados são corroborados por achados de outros pesquisadores que atestam que o estado de diabetes afeta todos os parâmetros periodontais incluindo

sangramento a sondagem, profundidade de sondagem, perda de inserção⁴⁶ e perda óssea alveolar.⁴⁷

Muitos estudos da década passada, tanto *in vitro* como *in vivo*, têm apresentado importantes resultados utilizando os princípios da PDT como terapia fotoquímica antimicrobiana (PACT), principalmente sobre microorganismos envolvidos com a doença periodontal²³⁻²⁷ e peri-implantar.⁴⁸⁻⁵⁴ Inicialmente a PDT foi empregada para o tratamento do câncer e, em estudos recentes esta terapia tem sido efetiva para o tratamento de várias doenças, incluindo infecções bacterianas.⁵⁹

Recentes estudos em animais^{23,25-27} e em humanos²⁸⁻³⁰ observaram que a PDT reduziu a destruição periodontal, relatando que esta terapia pode ser uma alternativa complementar viável ao tratamento periodontal convencional, principalmente em áreas de difícil acesso como áreas de furca, depressões, concavidades e bolsas profundas^{25,32} e também ser um método alternativo para a redução do uso indiscriminado de antibióticos, evitando desta forma a seleção de cepas resistentes.^{33,34}

Na análise dos resultados da avaliação histométrica, os animais não-diabéticos (Grupo A), que receberam o tratamento com a PDT, apresentaram menor perda óssea quando comparado com os animais tratados somente com a RAR e TBO em todos os períodos experimentais. Tais observações provavelmente devem-se ao fato da ação antimicrobiana efetiva da PDT, promovida pela associação do TBO (100 µg/ml) com o laser de AsGaAl como fonte de luz nos parâmetros de irradiação utilizados no presente estudo (24 J/cm²). Os nossos resultados confirmaram os achados de outro estudo em animais,²³ que utilizou a PDT no tratamento da doença periodontal induzida em ratos com concentração de 1 mg/ml (1000 µg/ml) do corante (10 x maior) e de energias de irradiação de 6, 12, 24 e 48 J, porém sem a terapia mecânica convencional de RAR.

Um grande número de estudos in vitro tem avaliado o efeito antimicrobiano da PDT com diferentes agentes fotossensibilizadores como, azul de metileno, azul de toluidina O, fitalocianina disulfonada, porfirinas, fenotiazinas, cianinas, acridinas, corantes fitoterápicos e as clorinas.³² Alguns estudos recentes têm avaliado a utilização da PDT no tratamento não-cirúrgico da doença periodontal in vivo tanto em animais^{23,25,27} como em humanos,²⁸⁻³⁰ porém o uso do azul de toluidina O como droga fotossensibilizadora na PDT, tem sido pouco utilizada. Apenas alguns estudos avaliaram esta droga in vivo no tratamento da periodontite²³ e no tratamento da peri-implantite.^{49-52,54}

A PDT promove a sensibilização letal bacteriana de forma mais efetiva sobre bactérias Gram-positivas, enquanto as bactérias Gram-negativas são mais dificilmente sensibilizadas,⁵⁶ além de apresentarem baixa permeabilidade na membrana celular bacteriana aos antibióticos.⁵⁷ No presente estudo utilizamos o TBO devido ao fato de interagir de forma mais significativa com lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana celular de bactérias Gram-negativas, quando comparado ao Azul de Metileno.^{58,59}

O uso isolado do TBO (100 µg/ml) nos ratos não diabéticos também promoveu menor perda óssea na região de furca, quando comparado ao grupo RAR, aos 7 e 30 dias, diferindo dos resultados encontrados por Komerick,²³ quando utilizaram o TBO isoladamente com 0,01, 0,1 e 1 mg/ml que correspondem respectivamente a 10, 100 e 1000 µg/ml, e não encontraram diferenças significantes no nível de perda óssea na análise morfométrica, porém na análise microbiológica demonstraram redução de *Porphyromonas gingivallis* nas concentrações de 1 mg/ml (1000 µg/ml) após 4 e 8 minutos de aplicação.

Estas diferenças de resultados, com diferentes concentrações da droga, poderiam estar relacionadas com a diferença na metodologia empregada nos estudos. No presente estudo o tratamento com TBO foi realizado após a terapia mecânica convencional de RAR, não

empregada no estudo de Komerik.²³ Existem relatos na literatura da atividade bactericida do TBO na ausência de luz,⁵⁸ e tal fato poderia ser explicado pela maior interação deste corante com LPS presentes na membrana celular das bactérias gram-negativas, alterando assim a permeabilidade da parede bacteriana.⁵⁹

Com relação aos animais diabéticos (Grupo B) os resultados demonstraram que a PDT associada a RAR foi mais efetiva no tratamento da doença periodontal na região de furca, quando comparado aos tratamentos RAR e TBO em todos os períodos experimentais. O efeito benéfico da PDT coadjuvante ao tratamento convencional da DP tanto nos animais diabéticos e não diabéticos provavelmente se deva aos efeitos foto-destrutivos sobre as diferentes espécies bacterianas, presentes nas áreas de doença periodontal induzida, mediados pela reação tipo I (iniciada por superóxidos, hidroxilas aniônicas ou radicais livres) ou pela reação tipo II (iniciada pelo oxigênio singlete).^{31,32}

A atividade fotodinâmica dos fotossensibilizantes está baseada nas reações foto-oxidativas que promovem alterações bioquímicas e morfológicas nas células alvo.⁶⁰ Quando a molécula da droga fotossensibilizadora absorve os fótons de uma fonte de luz ressonante à banda de absorbância, ela passa do estado fundamental para o estado de excitação simples. Dependendo da estrutura de sua molécula e do ambiente, pode perder sua energia por processo eletrônico ou físico e retornar ao estado fundamental, ou pode passar por uma transição, para o estado de excitação triplo (estado tripleto). Nesse estágio as moléculas podem novamente sofrerem um decaimento eletrônico e retornarem ao estado fundamental ou sofrer reações redox com seu ambiente (Reação tipo I), ou sua energia de excitação pode ser transferida para a molécula de oxigênio, permitindo a formação de oxigênio singlete (Reação tipo II). Estas espécies de oxigênio reativo são responsáveis por danos irreversíveis na membrana citoplasmática bacteriana, incluindo modificação protéica, alterações na cadeia respiratória e nos ácidos nucleicos.³²

Alguns fatores podem influenciar na PDT como o coeficiente de absorvância do corante, energia da fonte de luz, a concentração do fotossensibilizador e o tempo de duração do estado tripleto da molécula,^{32,33,60,61} além da presença de fluídos que podem remover a droga do seu local de aplicação ou diminuir a sua concentração.

Estes nossos resultados estão de acordo com estudos na literatura que demonstram a efetividade da PDT na evolução da doença periodontal experimental induzida^{23,25-27} em animais, no tratamento da periodontite em humanos não diabéticos²⁸⁻³⁰ e na peri-implantite.⁴⁹⁻⁵⁴

Nos animais diabéticos o tratamento TBO foi mais efetivo que o tratamento RAR em todos os períodos experimentais, o que poderia ser explicado pelo efeito bactericida do TBO utilizado isoladamente.^{23,58,59}

Indivíduos com diabetes apresentam prejuízo no fluxo sanguíneo, na oxigenação tecidual, aumento na produção de radicais livres⁶² e alteração na resposta aos lipopolissacarídeos, resultando em uma exacerbada secreção de mediadores inflamatórios como as PGE₂, IL-1 α e TNF- α e a formação dos produtos finais da glicolisação avançada (AGEs), os quais podem ligar-se aos seus receptores (RAGEs) em macrófagos e monócitos resultando em aumento da secreção local e sistêmica destes mediadores com diminuição da quimiotaxia destas células.^{41,63} Apresentam também queda na resistência à infecção, prejuízo na cicatrização, exagerada resposta inflamatória¹⁷ e aumento da extensão e severidade da doença periodontal.^{11,64-68}

A busca por terapias alternativas complementares para favorecer o processo de reparo em indivíduos diabéticos têm sido motivo de muitos estudos. Neste estudo, a utilização da PDT como método alternativo complementar no tratamento da doença periodontal experimental induzida em ratos diabéticos também favoreceu o processo de reparo periodontal, quando comparado com o método convencional de tratamento da doença

periodontal (RAR), com diferença estatisticamente significativa independentemente do período analisado. Outra possível explicação para os resultados deste estudo, além do efeito bactericida da PDT deve-se ao fato da fonte de luz utilizada ser o laser em baixa intensidade. Estudos têm relatado que a utilização desta fonte de luz inibe a produção de mediadores inflamatórios por células do ligamento periodontal, favorece a quimiotaxia celular, promove vasodilatação e angiogênese local.⁶⁹⁻⁷¹ Desta forma poderia haver um aumento na difusão de oxigênio no tecido,⁷²⁻⁷⁴ favorecendo o processo de reparo pois, a secreção do colágeno pelos fibroblastos no espaço extracelular ocorre somente na presença de altas taxas de pressão de oxigênio.⁷⁵

A susceptibilidade à irradiação e capacidade para ativação depende do estado fisiológicos das células irradiadas. As células com diminuição do potencial redox (alguns estados patológicos) são mais sensíveis a irradiação.⁷⁶ A especificidade da resposta biológica tecidual não é determinada pelo nível de reação da cadeia respiratória e sim pelo nível de transcrição durante a sinalização celular da cascata.⁷⁶ No diabetes há um aumento do stress oxidativo nos tecidos e no plasma ocasionados pelo acúmulo de AGES (produtos finais da glicolização avançada), o qual é amplificado pelo contínuo ciclo de stress metabólico, dano tecidual e morte celular, levando a uma futura produção de radicais livres e aumento da disfunção vascular.⁷⁷ Os efeitos benéficos da PDT na doença periodontal em diabéticos poderiam ser explicados, além da atividade antimicrobiana descrita anteriormente, pelo aumento da susceptibilidade da irradiação laser nos tecidos dos diabéticos, os quais se apresentam com diminuição do potencial redox.⁷⁶ Outra justificativa dos efeitos benéficos da PDT nos tecidos com déficit metabólico é a angiogênese promovida pela PDT, aumentando o aporte de oxigênio na área.⁷⁸ Tais fatos foram demonstrados na comparação entre os animais do grupo A, tratados apenas com RAR com os animais do grupo B

tratados com a PDT, onde a perda óssea foi significante maior no grupo A, tratado apenas com RAR em todos os períodos experimentais.

Uma grande vantagem da PDT é sua ação local restrita ao local de tratamento, assegurando uma manutenção da microbiota entérica que, normalmente é muito afetada pelos antibióticos. Apesar de ainda não existirem estudos consistentes sobre resistência bacteriana à ação da PDT, ressalta-se que só o fato dela não agir indiscriminadamente no organismo do hospedeiro já constitui um benefício significativo desta terapia.^{23,79,80}

Dentro dos limites do presente estudo pode-se concluir que a PDT foi um tratamento coadjuvante benéfico ao tratamento convencional de RAR na doença periodontal experimental induzida por placa bacteriana e na modificada pelo diabetes mellitus. Porém outros estudos devem ser realizados para comprovar os efeitos intrínsecos da PDT no tratamento da doença periodontal bem como avaliar os efeitos desta sobre os parâmetros clínicos periodontais a longo prazo.

Referências

1. Deas DE, Mackey SA, McDonnell HT. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontol 2000* 2003;32:82-104.
2. Michalowicz B. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol* 1994;65:479-488.
3. Martinez-Canut P, Lorca A, Magan R. Smoking and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1996;22:743-749.
4. Gonzales YM, De Nardin A, Grossi SC, Machtei EE, Genco RJ, De Nardin E. Serum cotinine levels, smoking and periodontal attachment loss. *J Dent Res* 1996;75:796-802.
5. Dennison DK, Gottsegen R, Rose LF. Diabetes and periodontal diseases. *J Periodontol* 1996; 67:166-176.
6. Papapanou PN. 1996 World Workshop in Clinical Periodontics. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1996: 1:1–36.
7. Bacić M, Plancak D, Granić M. CPITN assessment of periodontal disease in diabetic patients. *J Periodontol* 1988;59:816-822.
8. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 1991;62:123-131.
9. Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 1990;121:532-536.
10. Tervonen T, Oliver RC. Long-term control of diabetes mellitus and periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993;20:431-435.
11. Mealey BL, Oates TW; American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289-1303.

12. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol* 1998;69:76-83.
13. Nassar H, Kantarci A, van Dyke TE. Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. *Periodontol 2000* 2007;43:233-44.
14. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Schmidt AM. A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *J Periodontal Res* 1998;33:387-399.
15. Nishimura F, Takahashi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. *Ann Periodontol* 1998;3:20-29.
16. Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol* 1998;3:40-50.
17. Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontol 2000* 2000;23:50-62.
18. Caton JG, Ciancio SG, Blieden TM. Subantimicrobial dose doxycycline as an adjunct to scaling and root planning: post-treatment effects. *J Clin Periodontol* 2001;28:782-789.
19. Ainamo J, Lie T, Ellingsen BH, Hansen BF, Johansson LA, Karring T, Kisch J, Paunio K, Stoltze K. Clinical responses to subgingival application of a metronidazole 25% gel compared to the effect of subgingival scaling in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1992;19:723-729.

20. Al-Mubarak S, Ciancio S, Aljada A, Mohanty P, Ross C, Dandona P. Comparative evaluation of adjunctive oral irrigation in diabetics. *J Clin Periodontol* 2002;29:295-300.
21. Moskow BS, Tannenbaum P. Enhanced repair and regeneration of periodontal lesions in tetracycline-treated patients. Case reports. *J Periodontol* 1991;62:341-350.
22. Mealey BL, Rethman MP. Periodontal disease and diabetes mellitus. Bidirectional relationship. *Dent Today* 2003; 4:107-113.
23. Kömerik N. In vitro killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:932-940.
24. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 2005;76:1100-1105.
25. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2007;78:566-575.
26. Yamada Jr AM. Effects of photodynamic therapy in periodontitis induced in rats (in Portuguese).[Thesis]. São Paulo,SP: Institute of Energetic and Nuclear Research;2007.87p.
27. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, Garcia VG. In Vivo Effect of Photodynamic Therapy on Periodontal Bone Loss in Dental Furcations. *J Periodontol* 2008;(no prelo).
28. 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 Surg Med* 2002; 60:60-66.

29. Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes Jr AB, Taba Jr M. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: A preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 2007;78:965-973.
30. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* 2007;18:34-38.
31. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* 1997; 39: 1-18.
32. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy [PACT]. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:13-28.
33. Maisch T Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Laser Med Sci* 2007; 22:83-91.
34. VanWinkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000* 1996;10:45-78.
35. King H, Aubert RE, Herman W. Global burden of diabetes 1995-2025. Prevalence, numerical estimates and projections. *Diabetes Care* 1998;21:1414-1431.
36. Pepato MT, Migliorini RH, Goldberg AL, Kettelhut IC Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol* 1996;271:340-347.
37. Kwon PT, Rahman SS, Kim DM, Kopman JA, Karimbux NY, Fiorellini JP. Maintenance of osseointegration utilizing insulin therapy in a diabetic rat model. *J Periodontol* 2005;76:621-626.
38. Johnson JH. Effects of local irritation and dextran and sufnat administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res* 1975;10:332-345.

39. Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Primo MT, et al. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol* 2000;71:1460-1464.
40. Nogueira-Filho GR, Rosa BT, César-Neto JB, Tunes RS, Tunes Uda R. Low- and high-yield cigarette smoke inhalation potentiates bone loss during ligature-induced periodontitis. *J Periodontol* 2007;78:730-735.
41. Holzhausen M, Garcia DF, Pepato MT, Marcantonio E Jr. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res* 2004;39:188-193.
42. Lalla E, Lamster IB, Feit M et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000; 105:1117-1124.
43. Panda S, Kar A. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. *J Pharm Pharmacol* 2007;59:1543-1548.
44. Leite AC, Araújo TG, Carvalho BM, Silva NH, Lima VL, Maia MB. Parkinsonia aculeata aqueous extract fraction: biochemical studies in alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2007;111:547-52.
45. Grossi SG, Skrepcinski F, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG, Genco RJ. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycosylated hemoglobin. *J Periodontol* 1997; 68:713-719.
46. Bridges RB, Anderson JW, Sax, Gregory K, Bridges SR. Periodontal status of diabetic and non diabetic men: effect of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *J Periodontol* 1996; 67:1158-1192.

47. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1996; 67:1085-1093.
48. Haas R, Dortbudak O, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser an in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8: 249-254.
49. Haas R, Baron M, Dortbudak O, Watzek G. lethal photosensitization, autogenous bone, and e-PTFE Membrane for the treatment of Peri-implantitis: Preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:374-382.
50. Dortbudak O, Haas O, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decolouration of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *J Clin Oral Impl Res* 2001;12:104-108.
51. Shibli JA, Martins MC, Nociti FH Jr, Garcia VG, Marcantonio E Jr. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol* 2003;74:338-345.
52. Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio EJ. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Science* 2003;45:17-23.
53. Hayek RR, Araujo NS, Gioso MA, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol* 2005;76:1275-1281.
54. Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti FH Jr, Marcantonio E Jr. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:273-281.

55. Hamblin MR; Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:436-450.
56. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B* 1992 15;14:262-266.
57. Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of anti-microbial resistance. *Antimicrob Agent Chemother* 1989;33:1831-1836.
58. Usacheva M, Teichert MC, Biel MA Comparison of the methylene blue and toluidina blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001;29:165-173.
59. Usacheva M, Teichert MC, Biel MA The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Laser Surg Med* 2003;33:311-319.
60. Prates RA, Yamada Jr AM, Suzuki LC et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *actinobacillus actinomycetemcomitans* *J Photochem Photob B* 2007; 86;70-76.
61. Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Contag CH, Hasan T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. *J Photochem Photobiol* 2002;75:51-57.
62. Olerud JE, Odland GF, Burgess EM, Wyss CR, Fisher LD, Matsen FA 3rd. A model for the study of wounds in normal elderly adults and patients with peripheral vascular disease or diabetes mellitus. *J Surg Res* 1995;59:349-360.
63. Southerland JH, Taylor GW, Moss K, Beck JD, Offenbacher S. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. *Periodontol 2000* 2006;40:130-143

64. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol* 1998;69:76-83.
65. Bacić M, Plancak D, Granić M. CPITN assessment of periodontal disease in diabetic patients. *J Periodontol* 1988;59:816-822.
66. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991;62:123-131.
67. Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 1990;121:532-536.
68. Tervonen T, Oliver RC. Long-term control of diabetes mellitus and periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 431-435.
69. Saito S, Ngan P, Rosol T, Saito M, Shimizu H, Shinjo N, Shanfeld J, Davidovitch Z. Involvement of PGE synthesis in the effect of intermittent pressure and interleukin-1 beta on bone resorption. *J Dent Res* 1991;70:27-33.
70. Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y. 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.
71. 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.
72. Surinchak JS, Alago ML, Bellamy RF, Stuck BE, Belkin M. Effect of low-level energy laser on the healing of full-thickness skin defects. *Lasers Surg Med* 1983; 2:267-274.
73. Al-Watban FAH, Zhang XY. Comparison of wound healing process using argon and krypton lasers. *J Clin Laser Med Surg* 1997;15: 209-215.

74. Basford JR. Low intensity laser therapy: Still not na established clinical tool. *Lasers Surg Med* 1995;16:331-342.
75. Reenstra WR, Veves A, Orlow D et al. Decrease proliferation and cellular signaling in primary dermal fibroblasts derived from diabetes versus non diabetic sibling controls. *Acad Emerg. Med* 2001;8:519.
76. Karu, T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.*, v. 56, p. 691-704, 1989.
77. Schmidt A, Yan S, Stern D. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochem Biophys Acta* 2000;1498:99-111.
78. Benstead K, Moore JV. Quantitative histological changes in murine tail skin following photodynamic therapy. *Br J Cancer* 1989;59:503-509.
79. Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol* 2000 2004;36:14-26.
80. Chan Y, Lai Ch. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003;18:51-55.

Lista de Figuras

Figura 1: Protocolo e Cronograma Experimental.

Figura 2: Fotomicrografia ilustrando as estruturas periodontais na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida nos diferentes Grupos (A e B) e Tratamentos: **(a)** Grupo A, tratamento I (RAR) 30 dias, 1/3 médio da furca – presença de áreas de reabsorções ósseas; **(b)** Grupo A, tratamento III (PDT) 30 dias, 1/3 coronal da furca – presença de espessas trabéculas ósseas e inserção de densas fibras colágenas; **(c)** Grupo B, tratamento I (RAR) 30 dias, 1/3 apical da furca – presença de áreas de reabsorções ósseas com trabéculas delgadas; **(d)** Grupo B, tratamento III (PDT) 30 dias, 1/3 coronal da furca – presença de espessas trabéculas ósseas íntegras e inserção de densas fibras colágenas (Coloração de Hematoxilina e Eosina, magnificação original 40x).

Figura 3: Fotomicrografia ilustrando a área de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida nos diferentes Grupos (A e B) e Tratamentos: **(a)** Grupo A, tratamento I (RAR) 30 dias; **(b)** Grupo A, tratamento III (PDT) 30 dias; **(c)** Grupo B, tratamento I (RAR) 30 dias; **(d)** Grupo B, tratamento III (PDT) 30 dias; (Coloração de Tricrômico de Masson, magnificação original 12,5x).

Tabela 1. Médias e Desvio padrão (M±DP) dos níveis glicêmicos (mg/dl) nos animais não-diabéticos e diabéticos nos diferentes grupos e períodos experimentais.

Períodos	-14 dias	- 7 dias	7 dias	15 dias	30dias	-14 dias	- 7 dias	7 dias	15 dias	30dias
Grupos	Não-diabéticos M±DP					Diabéticos M±DP				
Controle	60,11±5,6	63,32±3,5	66,51±4,5	74,43±6,7	68,15±9,3	79,49±5,1	522,54±5,5*	545,45±7,9*	533,84±4,5*	490,53±4,3*
TBO	80,67±4,3	74,92±4,9	78,42±6,3	72,67±9,3	71,34±5,7	88,71±3,2	498,26±7,1*	512,13±5,6*	502,76±7,8*	505,33±5,4*
PDT	78,45±3,2	76,21±5,5	83,17±7,9	81,32±7,1	78,15±6,4	80,17±4,2	533,43±3,4*	498,23±4,1*	538,13±4,1*	527,86±9,1*

* Diferença estatisticamente significativa do período inicial (-14 dias), detectada pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste t (p<0,05).

Tabela 2. Média e Desvio padrão (M±DP) dos dados histométricos da área do ligamento periodontal (mm²) na região de furca do primeiro molar inferior do lado direito, sem periodontite experimental induzida (SDP), de acordo com cada grupo (A e B) e período (7,15 e 30 dias).

<i>Grupos</i>	<i>A não diabéticos - M±DP</i>			<i>B Diabéticos - M±DP</i>		
	<i>7</i>	<i>15</i>	<i>30</i>	<i>7</i>	<i>15</i>	<i>30</i>
SDP	0,55±0,054	0,51±0,051	0,55±0,046	0,52±0,061	0,48±0,063	0,54±0,065
N	30	30	30	30	30	30

Diferença estatisticamente significante não detectada (p=0.096) pela análise de variância ANOVA.

Tabela 3. Médias e desvio padrão ($M \pm DP$) dos dados histométricos (mm^2) na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental induzida, de acordo com cada grupo, tratamento e período.

Grupos	A não diabéticos - $M \pm DP$			B Diabéticos - $M \pm DP$		
	7	15	30	7	15	30
Períodos						
Tratamentos						
Controle	1,11 \pm 0,11 ^{Aa}	0,845 \pm 0,12 ^{Aa}	0,97 \pm 0,13 ^{Aa}	2,27 \pm 0,47 ^{Aa}	3,23 \pm 0,34 ^{Ab}	2,82 \pm 0,75 ^{Aab}
TBO	0,51 \pm 0,12 ^{Ba}	0,70 \pm 0,13 ^{Aa}	0,64 \pm 0,08 ^{Ba}	0,51 \pm 0,15 ^{Ba}	0,44 \pm 0,07 ^{Ba}	0,57 \pm 0,13 ^{Ba}
PDT	0,33 \pm 0,05 ^{Ca}	0,35 \pm 0,06 ^{Ca}	0,27 \pm 0,07 ^{Ca}	0,29 \pm 0,03 ^{Ca}	0,24 \pm 0,02 ^{Ca}	0,27 \pm 0,11 ^{Ca}
N	10	10	10	10	10	10

A, B, C Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, nas colunas, não diferem entre si pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Benferroni ($p < 0,05$).

a, b, c Médias seguidas por letras minúsculas iguais, nas linhas, não diferem entre si pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Benferroni ($p < 0,05$).

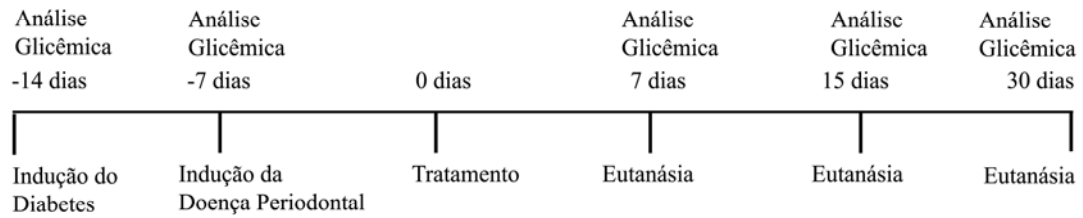
Figura 1. Protocolo e Cronograma Experimental.

Figura 2: Fotomicrografia ilustrando as estruturas periodontais na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida nos diferentes Grupos (A e B) e Tratamentos: **(a)** Grupo A, tratamento I (RAR) 30 dias, 1/3 médio da furca – presença de áreas de reabsorções ósseas; **(b)** Grupo A, tratamento III (PDT) 30 dias, 1/3 coronal da furca – presença de espessas trabéculas ósseas e inserção de densas fibras colágenas; **(c)** Grupo B, tratamento I (RAR) 30 dias, 1/3 apical da furca – presença de áreas de reabsorções ósseas com trabéculas delgadas; **(d)** Grupo B, tratamento III (PDT) 30 dias, 1/3 coronal da furca – presença de espessas trabéculas ósseas íntegras e inserção de densas fibras colágenas (Coloração de Hematoxilina e Eosina, magnificação original 40x).

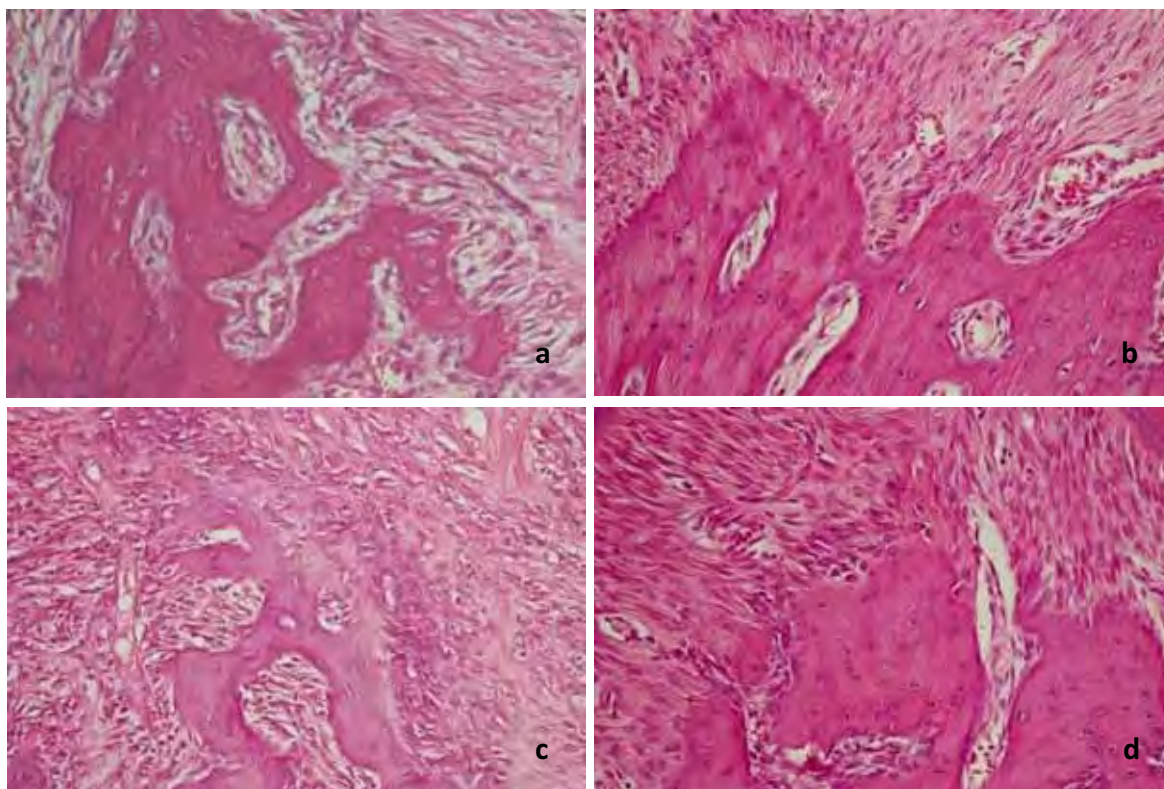
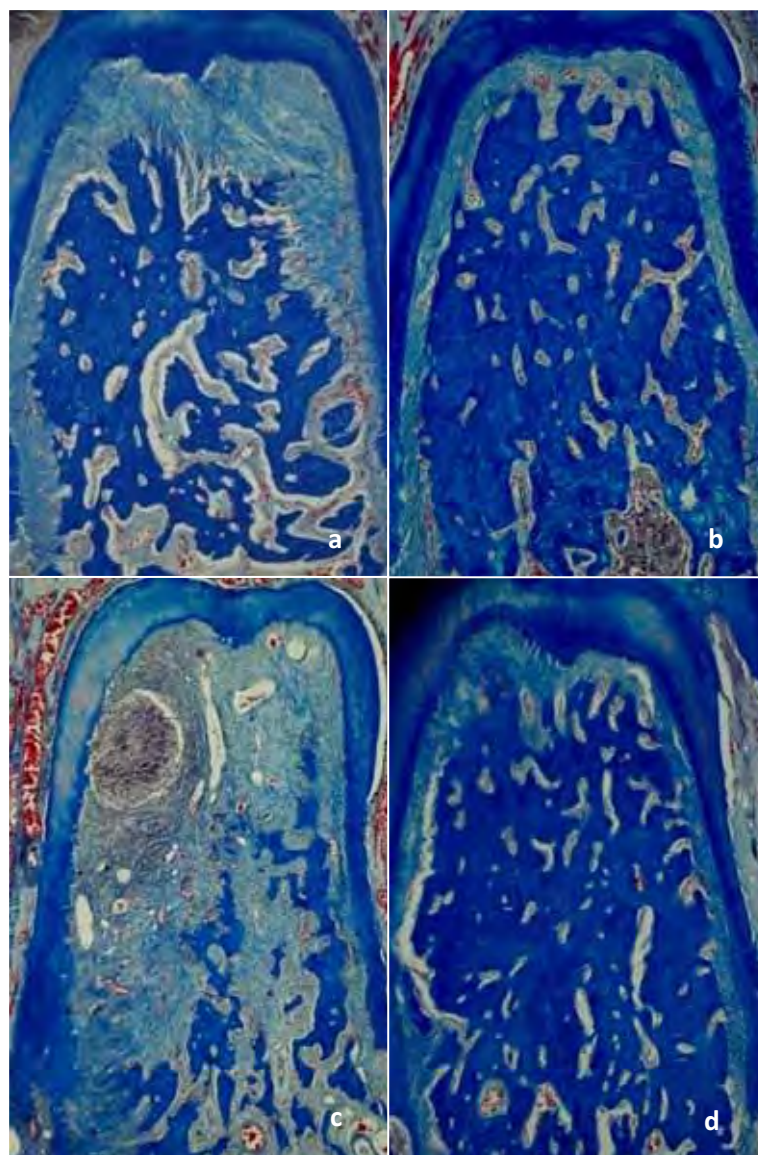


Figura 3: Fotomicrografia ilustrando a área de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida nos diferentes Grupos (A e B) e Tratamentos: (a) Grupo A, tratamento I (RAR) 30 dias; (b) Grupo A, tratamento III (PDT) 30 dias; (c) Grupo B, tratamento I (RAR) 30 dias; (d) Grupo B, tratamento III (PDT) 30 dias; (Coloração de Tricrômico de Masson, magnificação original 12,5x).



Anexos

Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS DIABÉTICOS" sob responsabilidade de VALDIR GOUVEIA GARCIA, ÁLVARO FRANCISCO BOSCO, LETÍCIA HELENA THEODORO, MARIA JOSÉ HITOMI NAGATA e JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião ordinária de 23 de agosto de 2005, de acordo com o protocolo nº 87/05.

Araçatuba, 23 de agosto de 2005.


Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

Instructions to Authors

Updated July 2007

CONTENT

The Journal of Periodontology publishes articles relevant to the science and practice of periodontics and related areas. Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that text, figures, photographs, and tables have not appeared in any other publication, except as an abstract prepared and published in conjunction with a presentation by the author(s) at a scientific meeting, and that material has been submitted only to this journal.

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

Submissions to the Journal of Periodontology should be limited to one of the categories defined below. Specific information regarding length and format is provided for each category. Please also refer to the instructions provided under Manuscript Submission, Preparation, and Format.

ORIGINAL ARTICLES

These are papers that report significant clinical or basic research on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the different forms of periodontal disease. Papers dealing with design, testing, and other features of dental implants are also included.

Format

Abstract

All original articles should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs: * Background: Describes the problem being addressed.

* Methods: Describes how the study was performed.

* Results: Describes the primary results.

* Conclusions: Reports what authors have concluded from these results, and notes their clinical implications.

Introduction

The Introduction contains a concise review of the subject area and the rationale for the study. More detailed comparisons to previous work and conclusions of the study should appear in the Discussion section.

Instructions to Authors

Materials and Methods

This section lists the methods used in the study in sufficient detail so that other investigators would be able to reproduce the research. When established methods are used, the author need only refer to previously published reports; however, the authors should provide brief descriptions of methods that are not well known or that have been modified. Identify all drugs and chemicals used, including both generic and, if necessary, proprietary names and doses. The populations for research involving humans should be clearly defined and enrollment dates provided.

Results

Results should be presented in a logical sequence with reference to tables, figures, and illustrations as appropriate.

Discussion

New and possible important findings of the study should be emphasized, as well as any conclusions that can be drawn. The Discussion should compare the present data to previous findings. Limitations of the experimental methods should be indicated, as should implications for future research. New hypotheses and clinical recommendations are appropriate and should be clearly identified. Recommendations, particularly clinical ones, may be included when appropriate.

MANUSCRIPT SUBMISSION, PREPARATION, AND FORMAT

The Journal of Periodontology accepts manuscript submissions online at the following URL: <http://jperio.manuscriptcentral.com>. Authors should prepare manuscripts in accordance with both the instructions below and the preceding instructions provided for each manuscript category. Detailed instructions for online submission are described under "Web Uploading Policies and Instructions."

Revisions of and inquiries regarding previously submitted manuscripts (hard copy submissions) should be sent to:

Managing Editor, Journal of Periodontology,
737 North Michigan Avenue, Suite 800,
Chicago, IL 60611-2690. Telephone: 312/573-3224;
e-mail: julie@perio.org.

SUBMISSION

Authorship

Only those individuals who have made a substantial contribution to the work and who are willing to take public responsibility for the content of the manuscript should be listed as authors.

Once the Journal has received a manuscript, any changes in authorship must be faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Julie Daw, Managing Editor) and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper.

Letter of Submission

A letter of submission stating that the material is original, has not been published elsewhere, and is being submitted only to the Journal of Periodontology must accompany each manuscript.

All authors must sign the submission letter as evidence of their approval of the material.

Instructions to Authors

PREPARATION

Style

Please follow the guidelines below when preparing the manuscript:

- * Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- * The Journal of Periodontology does not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, *e.g.*, or *i.e.*
- * Use a block style; do not tabulate or indent material.
- * Refer to the 4th edition of the Glossary of Periodontal Terms published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.

Authors are encouraged to use the new disease classification as outlined in the Annals of Periodontology, volume 4 (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).

A summary can be found on the American Academy of Periodontology Web site at www.perio.org/resources-products/classification.htm.

FORMAT

Manuscripts must be submitted in Microsoft Word.

Margins should be at least 1" on both sides and top and bottom. Materials should appear in the following order:

Title Page

Abstract (or Introduction) and Key Words

Text

Footnotes

Acknowledgments

References

Figure Legends

Tables

Figures should not be embedded in the manuscript. Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

TITLE PAGE

The Title Page should contain: 1) a concise but informative title;

2) first name, middle initial, and last name of each author, with the highest academic degree and the current institutional affiliation for each;

3) name of the department(s) and institution(s) to which the work should be attributed (please use footnote symbols [in the sequence *, †, ‡, §, ¶, #, **, etc.] to identify authors and their corresponding institutions);

4) disclaimers, if any;

5) the name and address (including fax number and e-mail) of the author(s) responsible for correspondence (please indicate whether fax number and e-mail can be published);

6) sources of support in the form of grants, equipment, drugs, or other significant sources of support; 7) any financial relationships between any author and a commercial firm that may pose a conflict of interest;

Instructions to Authors

- 8) number of figures and tables in the manuscript; and
- 9) a short running title of no more than 60 characters, including spaces.

ABSTRACT OR INTRODUCTION

Please see specific instructions provided for each manuscript category.

KEY WORDS

A maximum of six key words or short phrases, drawn from MeSH documentation, to facilitate indexing should be listed below the abstract.

TEXT

Please see specific instructions provided for each manuscript category.

ACKNOWLEDGMENTS AND CONFLICT OF INTEREST

At the end of the Discussion, acknowledgments may be made to:

- 1) individuals who contributed to the research, including technical help or participants in a clinical study (authors are responsible for obtaining written permission from persons listed by name);
- 2) sources of financial and/or material support; and
- 3) financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include employment or acting as an officer, director, or owner of a company whose products, or products of a competitor, are being tested. Also, owning substantial stock or having other financial interests in such companies should be disclosed. Positions of authors employed by commercial firms should be included here.

REFERENCES

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. A journal, magazine, or newspaper article should be given only one number; a book should be given a different number each time it is mentioned, if different page numbers are cited.

All references are identified, whether they appear in the text, tables, or legends, by Arabic numbers in superscript. Journal title abbreviations should be those used by the U.S. National Library of Medicine. If you are uncertain about the correct abbreviation for a journal title, please refer to the NLM's comprehensive listing at <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>.

The use of abstracts as references is strongly discouraged.

Manuscripts accepted for publication may be cited. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as "unpublished observations." Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references. Please provide the date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual and his/her affiliation.

Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below:

Instructions to Authors

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or less; when seven or more, list only first three and add et al. Glass DA, Mellonig JT, Towle HJ. Histologic evaluation of bone inductive proteins complexed with coralline hydroxyapatite in an extraskeletal site of the rat. *J Periodontol* 1989;60:121-125.
2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report No. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.
3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.
4. Non-English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of periimplant disease (in German). *Z Zahnärztl Implantol* 1996;12:152-157.

Books and Other Monographs

5. Personal author(s). Tullman JJ, Redding SW. *Systemic Disease in Dental Treatment*. St. Louis: The CV Mosby Company; 1983:1-5.
6. Chapter in a book. Rees TD. Dental management of the medically compromised patient. In: McDonald RE, Hurt WC, Gilmore HW, Middleton RA, eds. *Current Therapy in Dentistry*, vol. 7. St. Louis: The CV Mosby Company; 1980:3-7.
7. Agency publication. Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Loe H. *Oral Health of United States Adults*. Bethesda, MD: National Institute of Dental Research; 1987. NIH publication no. 87-2868.
8. Dissertation or thesis. Teerakapong A. Langerhans' cells in human periodontally healthy and diseased gingiva. [Thesis]. Houston, TX: University of Texas; 1987. 92 p.

Electronic Citations

9. Online journals without volume and page information. Berlin JA, Antman EM. Advantages and limitations of meta-analytic regressions of clinical trials data. *Online J Curr Clin Trials* [serial online]. June 4, 1994; doc 134. Accessed July 20, 2000.
10. Online journals with volume and page information. Fowler EB, Breault LG. Ridge augmentation with a folded acellular dermal matrix allograft: A case report. *J Contemp Dent Pract* [serial online]. 2001;2(3):31-40. Available from: Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH. Accessed December 15, 2001.
11. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Preventing emerging infectious diseases: Addressing the problem of antimicrobial resistance. Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/emergplan/antiresist/>. Accessed November 5, 2001.

TABLES

Tables should be numbered consecutively in Arabic numbers in the order of their appearance in the text. A brief descriptive title should be supplied for each. Explanations, including abbreviations, should be listed as footnotes, not in the heading. Every column should have a heading. Statistical measures of variations such as standard deviation or standard error of the mean should be included as appropriate in the footnotes. Do not use internal horizontal or vertical rules.

Instructions to Authors

FIGURE LEGENDS

Legends should be typed double-spaced with Arabic numbers corresponding to the figure. When arrows, symbols, numbers, or letters are used, explain each clearly in the legend; also explain internal scale, original magnification, and method of staining as appropriate. Panel labels should be in capital letters. Legends should not appear on the same page as the actual figures.

FIGURES

Digital files must be submitted for all figures. Submit one file per figure. Multiple panels should be labeled and combined in a single file. Photomicrographs should have internal scale markings. Human subjects must not be identifiable in photographs, unless written permission is obtained and accompanies the photograph. Lettering, arrows, or other identifying symbols should be large enough to permit reduction and must be embedded in the figure file. Figure file names must include the figure number.

Clinical color photographs are encouraged. There is no charge to the author for publication of any figure. Authors are asked to use shades of green, blue, or purple in color graphs. Yellow, red, and orange should be avoided unless scientifically necessary (e.g., to depict species of the orange complex, red complex, etc.).

Authors are strongly encouraged to prepare basic, simple designs that can be clearly understood when reproduced; use of “3-dimensional” graphics is not recommended. Unnecessarily complex designs may be returned for simplification before publication. Details of programs used to prepare digital images must be given to facilitate use of the electronic image. Use solid or shaded tones for graphs and charts. Patterns other than diagonal lines may not reproduce well.

DIGITAL FILE SPECIFICATIONS

To ensure the highest quality reproduction of your figures, please observe the following recommendations.

Resolution

Proper resolution is very important to preserve the quality of your printed figures. The following resolutions must be submitted for your files. Please do not reduce your figures below a readable size to achieve higher resolution. These files will not be usable.

Format

TIFF or EPS files at the proper resolution (see above) will give the best results. If you cannot produce these files, do not send low-resolution conversions. With all figures, please also send a PDF that can be rasterized in the event your files are not usable.

PPT, Word, Excel, PS, and JPEG files can sometimes be acceptable alternatives. Send these along with a PDF if you cannot achieve the proper results in TIFF or EPS format. Never use patterned fills in PowerPoint graphs. Solid tones or colors will make these files usable.

Color Space

Figures should be saved as CMYK, not RGB. Files submitted in RGB will be converted to CMYK, and significant color shift may occur.

Instructions to Authors

Font

Files other than TIFF or JPEG must be saved with fonts embedded. Acceptable fonts include Helvetica, Times New Roman, Symbol, Mathematical PI, and European PI. All other fonts may be replaced, resulting in data loss or realignment.

Other

Please send a PDF with all figure submissions and verify that the PDF and digital versions of your figures are identical. If you have any questions concerning the creation or submission of digital art, please visit the Dartmouth Journal Services Web site at <http://www.dartmouthjournals.com/digart.html> or send an e-mail to perio@dartmouthjournals.com.

UNITS OF MEASUREMENT

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal/National) numbering system.

STATISTICS

Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

All manuscripts reporting the use of human subjects must include a statement that the protocol was approved by the author's institutional review committee for human subjects or that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Do not use any designation in tables, figures, or photographs that would identify a patient, unless express written consent from the patient is submitted. For research involving the use of animals, it is necessary to indicate that the protocol was approved by the author's institutional experimentation committee or was in accordance with guidelines approved by the Council of the American Psychological Society (1980) for the use of animal experiments.

FOOTNOTES

Footnotes should be used only to identify author affiliation; to explain symbols in tables and illustrations; and to identify manufacturers of equipment, medications, materials, and devices. Use the following symbols in the sequence shown: *, †, ‡, §, k, ¶, #, **, ††, etc.

Instructions to Authors

IDENTIFICATION OF PRODUCTS

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

REVIEW PROCESS AND PUBLICATION PROCEDURES

Peer Review

The Journal of Periodontology is a peer-reviewed publication. All manuscripts, including State of the Art Reviews, Commentaries, Case Reports, Case Series, and Clinical Practice, are submitted to a minimum of two reviewers and, when appropriate, to a statistical reviewer. Authors are given reviewer comments and additional information or observations as the Editor believes would be helpful. Revised manuscripts are due within 60 days of receipt of the Editor's communication.

Copyright

All manuscripts accepted for publication become the property of the American Academy of Periodontology. A copyright form must be signed by all authors and returned to the Managing Editor.

Reprints

Corresponding authors may purchase reprints at the time pages are received for proofreading. Reprints can be purchased in 4-color or black and white.

Anexos

Anexo 2 - Indução do Diabetes Mellitus e Controle Glicêmico



Figura 4 – Aplicação endovenosa da aloxano (42 mg/Kg).



Figura 5 – Coleta e monitoramento sanguíneo.

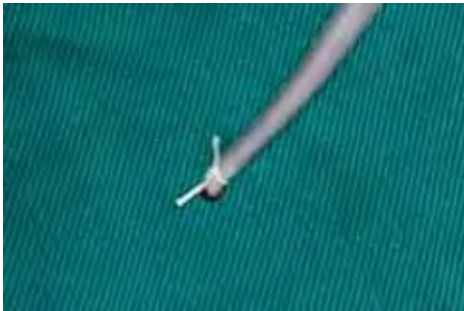


Figura 6 – Hemostasia.



Figura 7 – Kit Accu-CHEK® Advantage.



Figura 8 – Registro do nível glicêmico.

Anexo 3 - Indução da Doença Periodontal



Figura 9 - Animal posicionado na mesa operatória.



Figura 10 - Pinça modificada utilizada na passagem do fio.



Figura 11 - Posicionamento do fio.



Figura 12 - Ligadura posicionada.



Figura 13 - Doença Periodontal após 7 dias de indução - Ratos não-Diabéticos.



Figura 14 - Doença Periodontal após 7 dias de indução - Ratos Diabéticos.

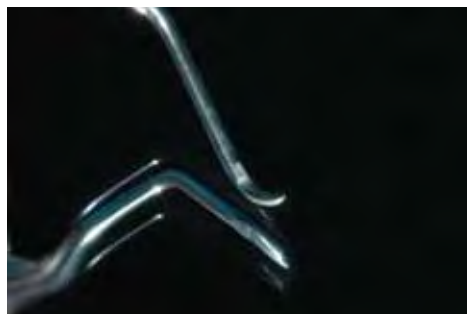


Figura 15 - Cureta de Gracey mine-five 13-14.



Figura 16 - Raspagem e Alisamento Radicular.

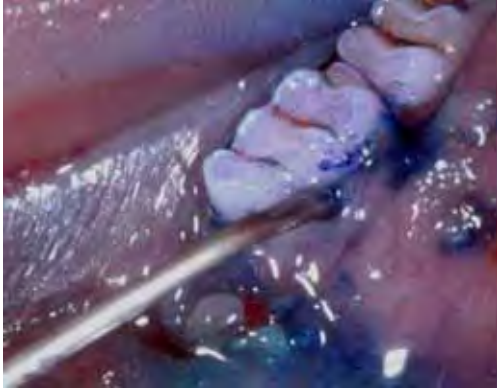


Figura 17 – Aplicação sub-gengival do fotossensibilizador – TBO (100µg/ml).



Figura 18 – Realização da PDT – TBO + Laser.

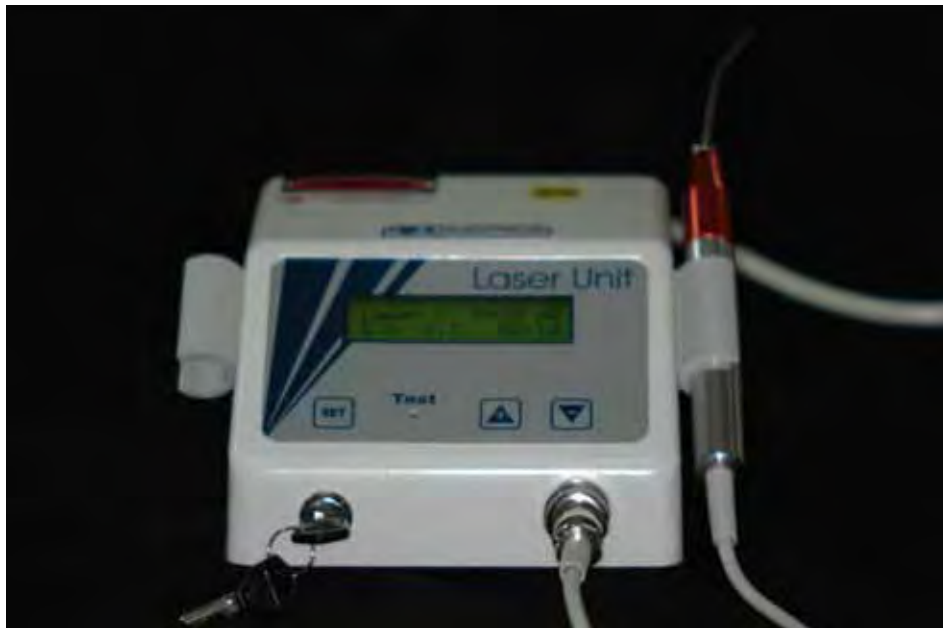


Figura 19 – Unidade Laser GaAlAs; Laser Bio Wave LLLT; Kondortech Equipamentos.

Anexo 4 - Aspecto Clínico dos Animais Diabéticos e não Diabéticos.

Figura 20 – Rato não diabético – Ausência de catarata.



Figura 21 – Rato diabético – Presença de catarata.



Figura 22 – Tamanho dos animais de mesma idade no final do experimento. (A) Rato diabético; (B) Rato não diabético.



Figura 23 – Alterações Vasculares. (A) Rato diabético; (B) Rato não diabético.

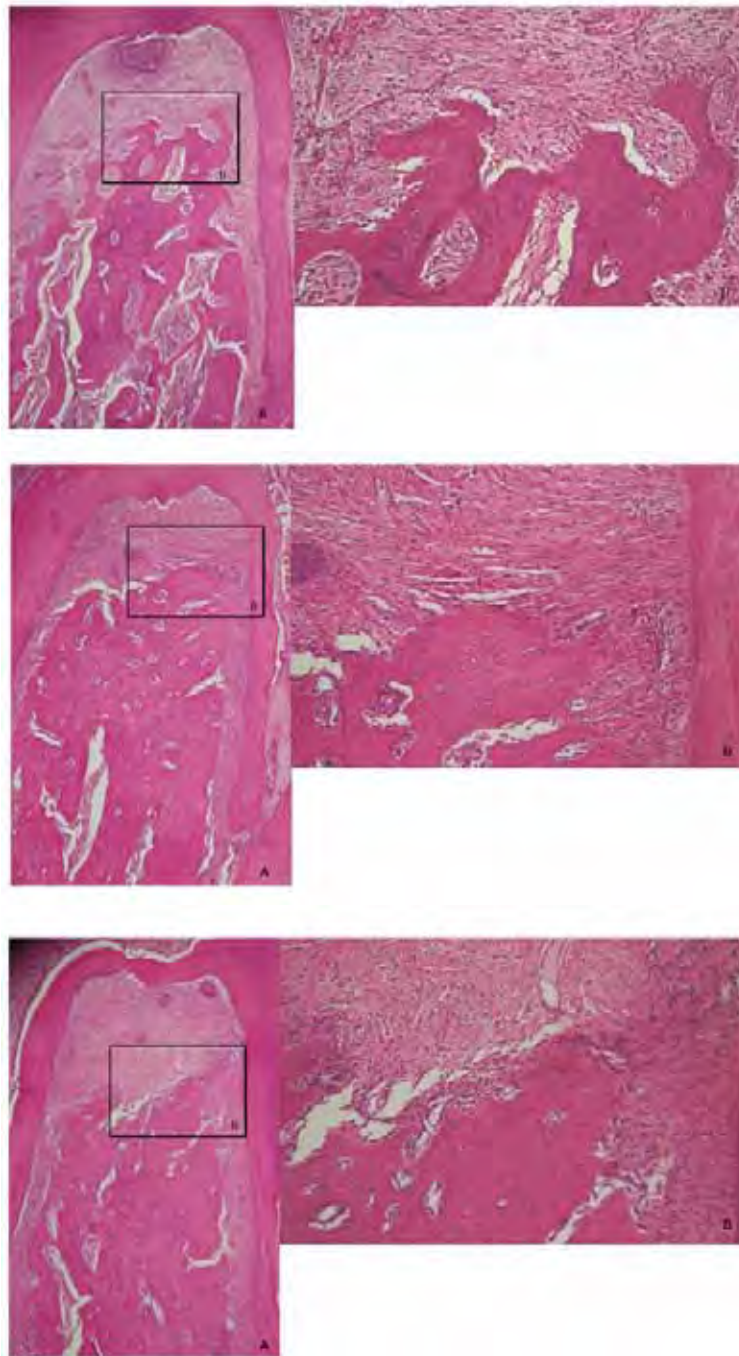
Anexo 5 - Fotomicroscopia dos Animais Diabéticos e não Diabéticos.

Figura 24 – (A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos A e Tratamento I (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); (B) observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x).

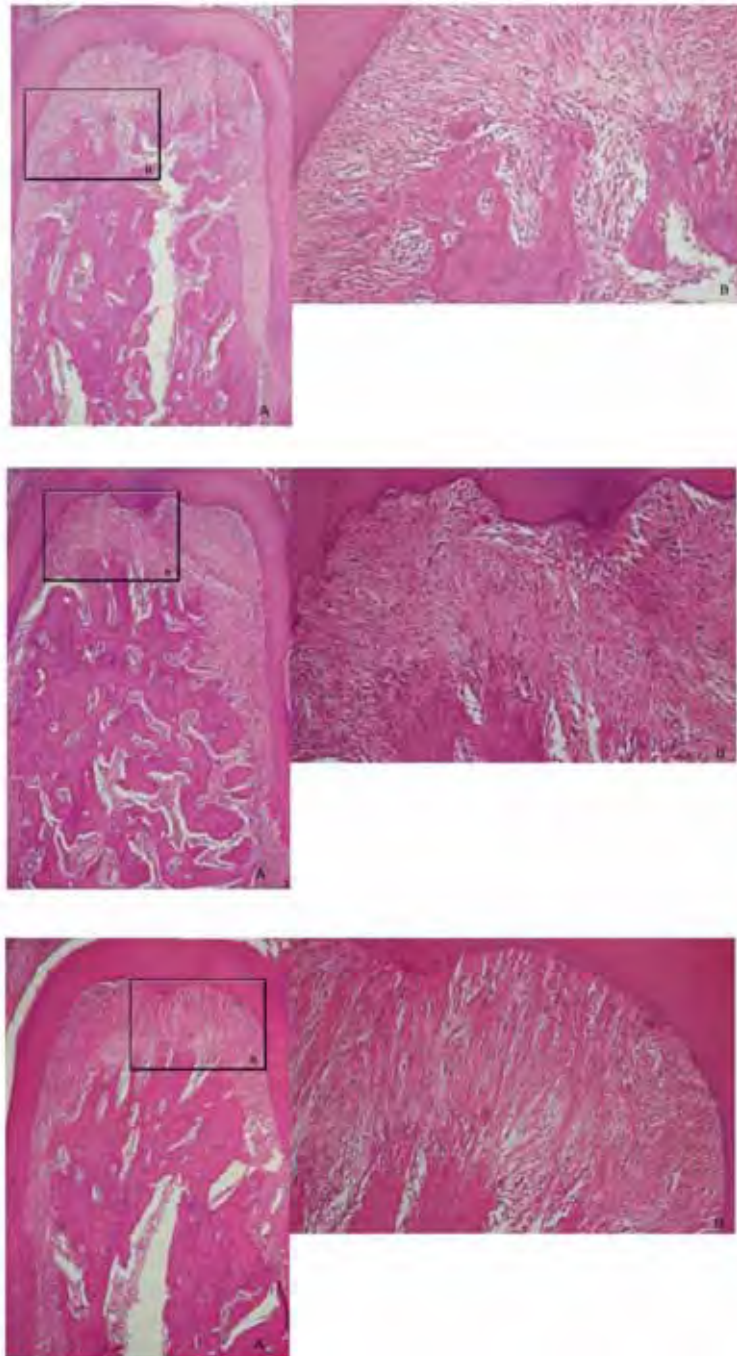


Figura 25 – (A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos A e Tratamento II (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); **(B)** observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x).

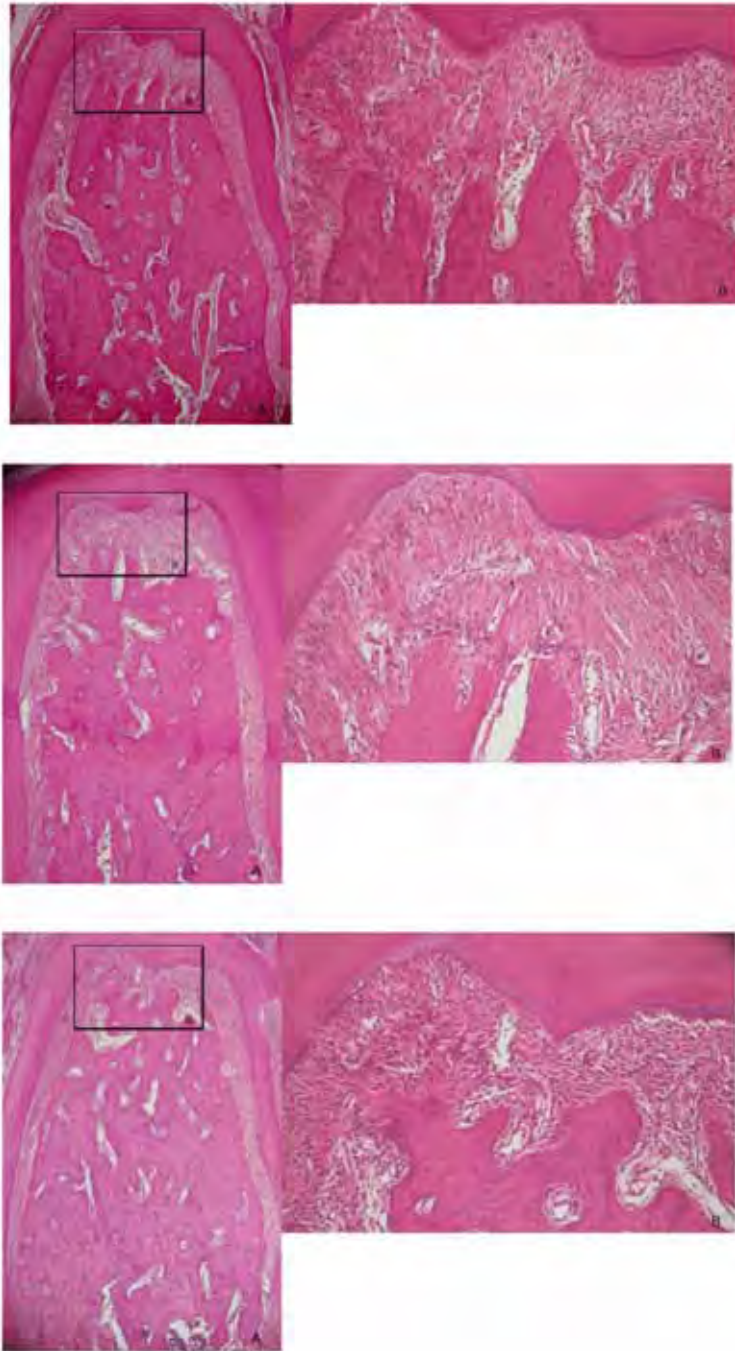


Figura 26 – (A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos A e Tratamento III (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); (B) observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x).

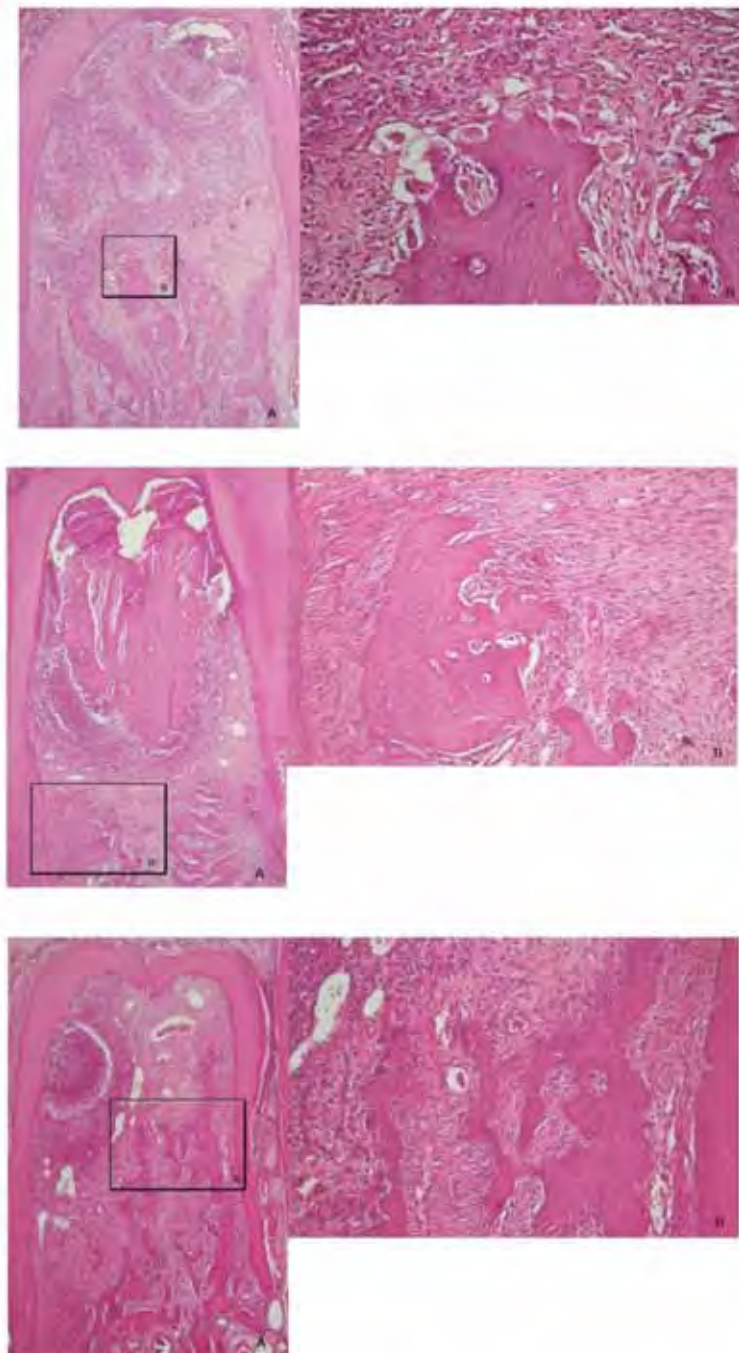


Figura 27 – (A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos B e Tratamento I (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); (B) observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x).

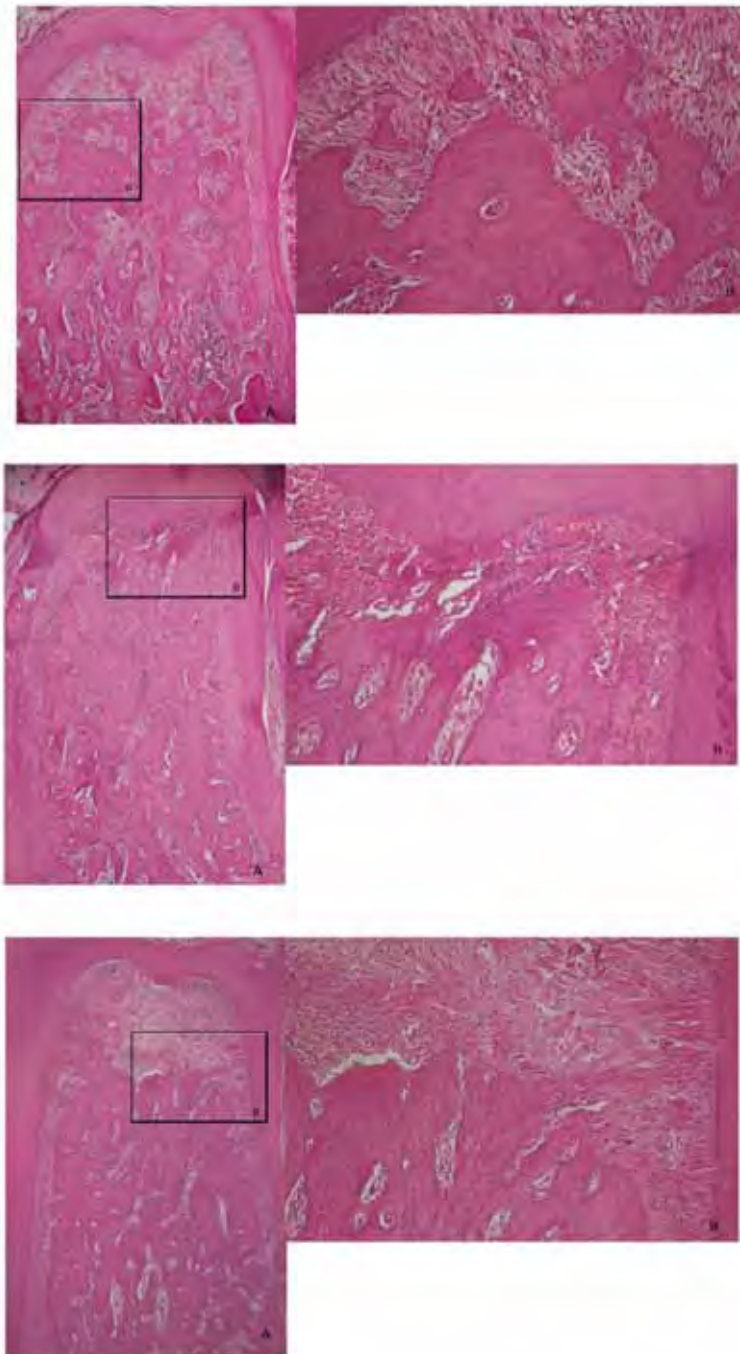


Figura 28 – (A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos B e Tratamento II (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); (B) observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x).

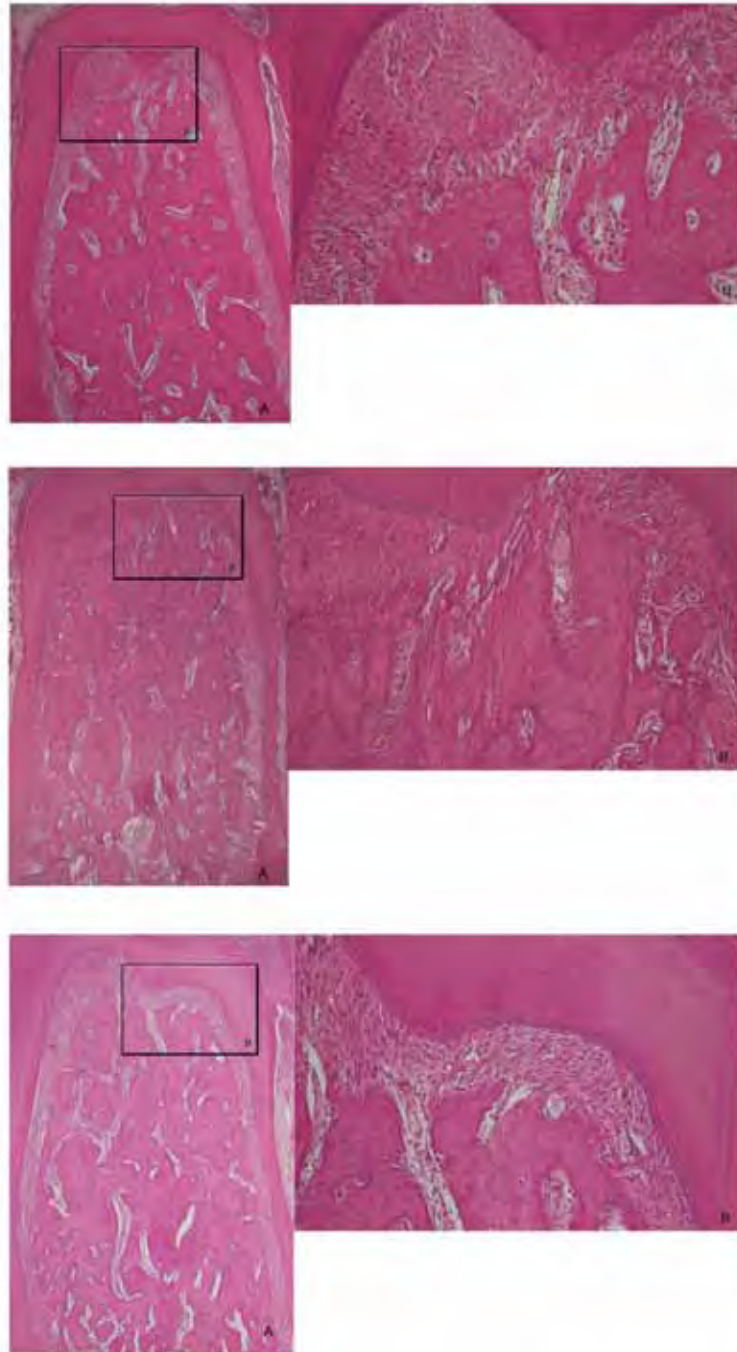


Figura 29 – (A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos B e Tratamento III (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); (B) observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x).

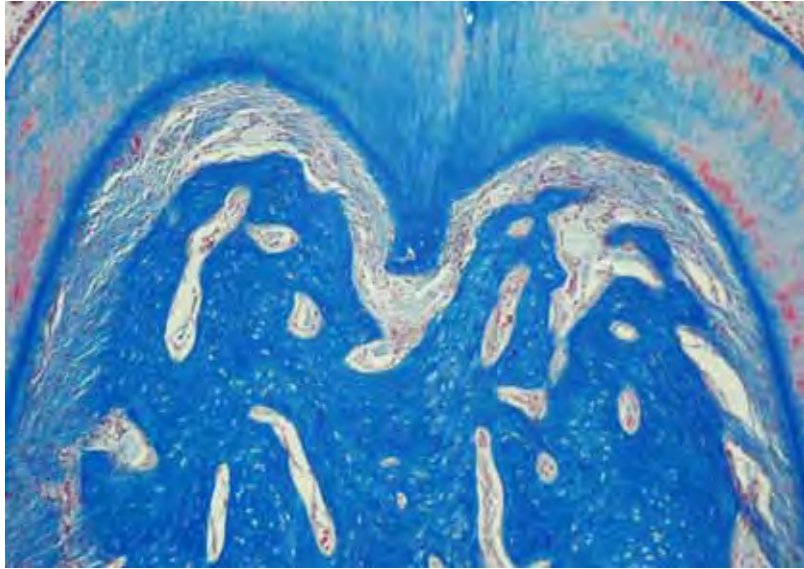


Figura 30: Fotomicrografia representativa da região de furca dos animais não diabéticos sem a indução da doença periodontal experimental. (Tricrômico de Masson, magnificação original 24x do original).

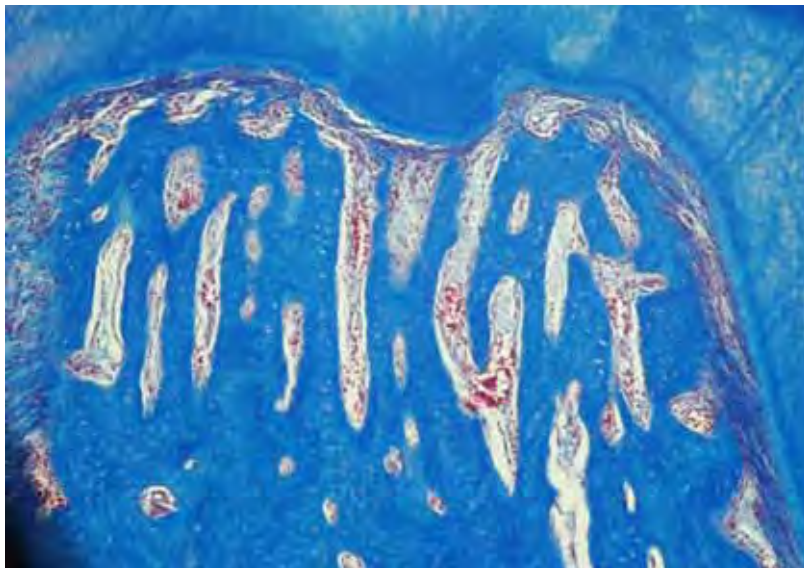


Figura 31: Fotomicrografia representativa da região de furca dos animais diabéticos sem a indução da doença periodontal experimental. (Tricrômico de Masson, magnificação original 24x do original).

Revisão de literatura

Revisão de Literatura

1 Diabetes Mellitus

1.1 - Histórico

O diabetes mellitus é uma síndrome de etiologia múltipla, que decorre da ausência de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. As conseqüências do diabetes mellitus a longo prazo incluem danos, disfunções e falências de vários órgãos, especialmente rins, olhos, nervos, coração, vasos sanguíneos além da doença periodontal que apresenta-se como a sexta complicação (Løe 1993; Lalla et al., 2000). Com freqüência, os sintomas clássicos (perda de peso, polidipsia e poliúria) estão ausentes, entretanto, poderá existir hiperglicemia suficiente para causar alterações funcionais ou patológicas por um longo período antes mesmo que o diagnóstico seja estabelecido. A síndrome diabética passa por um estágio de distúrbio do metabolismo da glicose, caracterizado por valores glicêmicos situados entre a normalidade e a faixa diabética, antes do surgimento de hiperglicemia mantida, acompanhada do quadro clínico clássico do diabetes mellitus (World Health Organization, 1999; AAD 2002).

O conhecimento do diabetes mellitus data de séculos antes de Cristo. Em revisão histórica realizada por Cahill (1985), cita que o papiro egípcio de Ebers (1500 A.C.) já descrevia a existência de doença associada à perda de muita urina. Este mesmo autor relata ainda, que Celsus também reconheceu a doença entre os séculos 30 A.C. e 50 D.C., mas que somente dois séculos mais tarde (250 D.C.), outro grego, o renomado médico Arateus da Cappadocia, nominou o diabetes como doença, apresentando ainda a primeira descrição clínica da doença.

Nos séculos 3 a 6 D.C., estudiosos da China, Japão e Índia, também descreveram uma condição clínica associada à poliúria e à presença de uma “urina doce e pegajosa”. Entretanto, apesar desta característica adocicada da urina ser referida por muitos séculos, foi somente em 1674 que Willis acrescentou a observação de “urina como que misturada com mel e açúcar”. O nome diabetes mellitus (mellitus = mel) foi então adotado, muito embora somente 100 anos depois, Dobson (1774), demonstrou que essa característica da urina devia-se realmente ao açúcar.

Desde os primeiros relatos históricos sobre o diabetes, os progressos no entendimento da doença evoluíram lentamente até a metade do século XIX. Foi neste século que a associação entre diabetes e distúrbios nas células beta começou a ser estabelecida. As ilhotas pancreáticas foram primeiro notadas em peixes por Brockman, no início do século XIX, tendo sido inicialmente referenciadas como que “enclausuradas no interior do tecido exócrino do pâncreas”. Porém, coube a Langerhans em 1869, a descrição completa dessas células em pâncreas de mamíferos, o que lhe rendeu o nome de ilhotas de Langerhans. Em 1889, os cientistas alemães Mering & Minkowski descobriram que a remoção cirúrgica do pâncreas produzia diabetes em cães, cabendo, porém, ao americano Opie (1901), as primeiras anotações de que as células beta, contidas nas ilhotas pancreáticas, encontravam-se danificadas em pacientes que morriam da doença.

Os conhecimentos acerca do diabetes, no entanto, só ganharam impulso a partir de 1921, quando um jovem cirurgião, Frederick Banting e seu assistente, Charles Best, observaram que extratos ativos, preparados a partir do tecido pancreático, eram capazes de diminuir os elevados níveis de glicose sanguínea quando administrados em cães diabéticos. Mais tarde, extratos de tecido pancreático foram purificados por Collip, recebendo o nome de insulina (Banting & Best, 1992).

Diante desses resultados inúmeros estudos passaram a ser realizados no sentido de procurar novos tratamentos para o diabetes e suas complicações, contudo, ainda hoje o diabetes é considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial, tanto em termos de números de pessoas afetadas, incapacitação física para o trabalho e mortalidade prematura como, também, em relação aos custos envolvidos no seu controle e no tratamento de suas complicações.

O agravante dessa situação é que existe, ainda, uma tendência para o aumento da prevalência do diabetes em todo o mundo. Projeções para este século indicam que no ano 2010 deverão existir 239 milhões de diabéticos no mundo (OMS). No Brasil, dados atualizados permitem estimar uma prevalência de 7,6% de pacientes diabéticos, que corresponde a cerca de mais de 12 milhões de enfermos, dos quais 10% são diabéticos do tipo 1 e 50% desconhecem a sua condição de doente que provavelmente serão identificados no futuro, através de complicação da doença.

1.2 - Patogênese do Diabetes Tipo 1 (*Periodontology 2000, 2007;v. 43 e 44*)

Em relação a patogenia do diabetes tipo 1, existem três mecanismos interligados responsáveis pela destruição das células das ilhotas: *suscetibilidade genética, auto-imunidade e agressão ambiental*. A figura 1 mostra uma seqüência postulada de eventos que envolvem estes três mecanismos. Acredita-se que a suscetibilidade genética ligada a alelos específicos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da classe II predispõe certos indivíduos ao desenvolvimento de auto-imunidade contra as células β das ilhotas. A reação auto-imune desenvolve-se de modo espontâneo ou, com mais probabilidade, é desencadeada por um evento ambiental que altera as células β , tornando-as imunogênicas.

Predisposição Genética

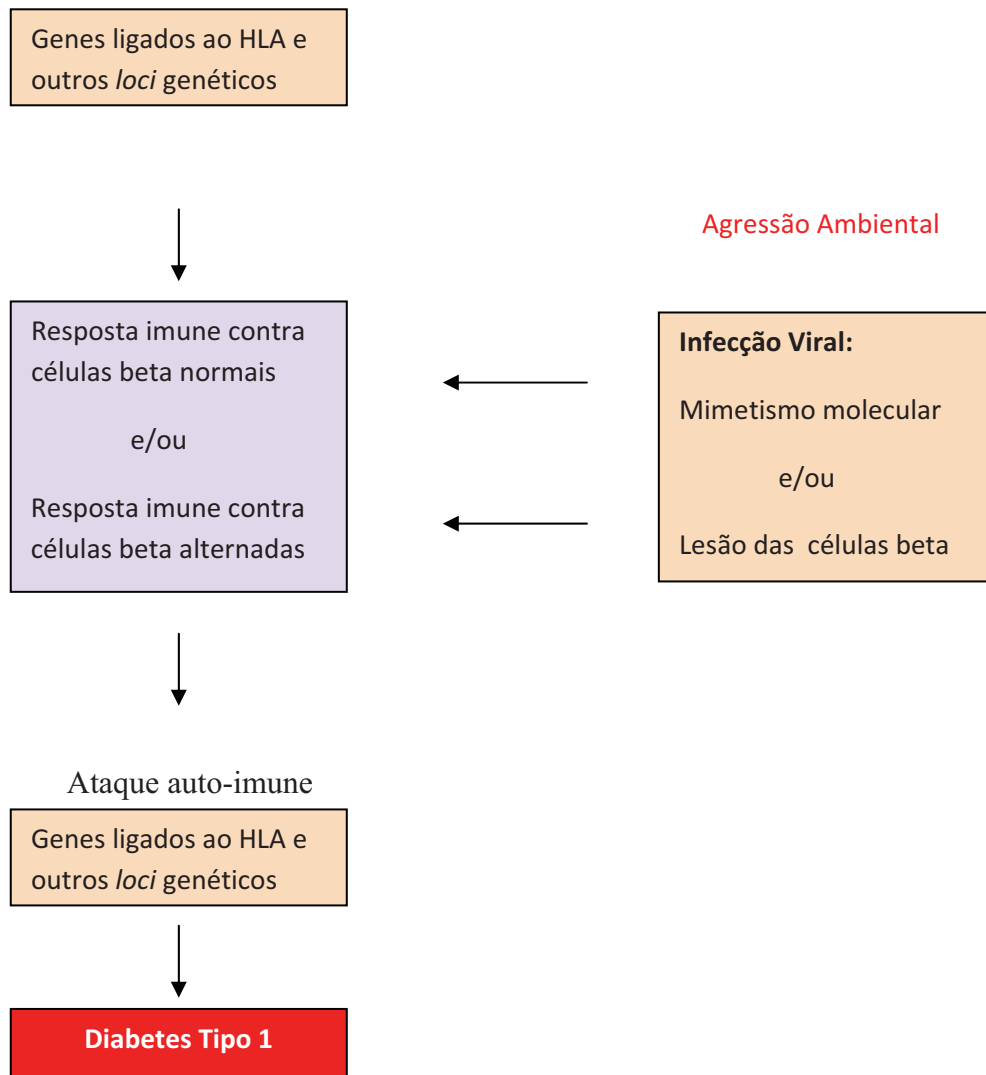


Fig. 1: Esquema simplificado mostrando as vias de destruição das células β , resultando no desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 1. Acredita-se que uma agressão ambiental, possivelmente alguma infecção viral, provoque um ataque auto-imune das células β em indivíduos geneticamente susceptíveis. As agressões ambientais podem incluir mimetismo molecular, em que um antígeno viral induz ataque auto-imune contra um antígeno semelhante das células β , ou lesão direta das células β , com conseqüente expressão anormal de antígeno destas células.

Suscetibilidade Genética. O diabetes mellitus tipo 1 ocorre mais freqüentemente em pessoas originárias da Europa Setentrional. A doença é muito menos comum em outros grupos raciais, incluindo negros, americanos nativos e asiáticos. O diabetes pode agregar-se em famílias; cerca de 6% das crianças cujos parentes de primeiro grau apresentam diabetes tipo 1 desenvolvem a doença. Entre gêmeos idênticos, a taxa de concordância cumulativa (isto é, ambos os gêmeos afetados) do nascimento até 100% implica uma penetrância incompleta dos traços de suscetibilidade genética ou um papel adicional dos fatores ambientais.

Além da influência estabelecida dos genes ligados ao HLA, a análise do genoma humano revelou a existência de cerca de 20 outras regiões cromossômicas independentemente associadas à predisposição ao diabetes. No momento atual, incluem 11p15 (a região do gene da insulina) e regiões que codificam *loci* da glicoquinase e dos peptídeos receptores de células T. Coletivamente, são responsáveis por 10% do risco genético. Um dos principais enfoques futuros será a avaliação destes e de outros genes.

Auto-imunidade. Embora o início clínico do diabetes tipo 1 seja abrupto, a doença resulta de fato, de um ataque auto-imune crônico das células β que geralmente atuam durante muitos anos antes do distúrbio se tornar evidente. As manifestações clínicas da doença (hiperglicemia e cetose) ocorrem numa fase tardia de sua evolução, após a destruição de mais de 90% das células β . As evidências da importância da auto-imunidade são as seguintes:

- ◆ Observa-se um infiltrado inflamatório rico em linfócitos (“insulite”) nas ilhotas de pacientes com diabetes auto-imune (Fig.2). O infiltrado consiste, em grande parte,

em linfócitos T CD8, juntamente com números variáveis de células CD4 e macrófagos. As células T CD4 de animais com diabetes auto-imune são capazes de transferir o diabetes para animais normais, estabelecendo assim, a primazia da auto-imunidade das células T no diabetes tipo 1.

- ◆ A insulite está associada a um aumento da expressão de moléculas MHC da classe I e a uma expressão aberrante de moléculas MHC da classe II na células β (Todavia a expressão aberrante de MHC da Classe II não constitui um requisito absoluto para o diabetes). Esta expressão aberrante é mediada, em parte, por citocinas produzidas localmente, como, por exemplo, interferon-gama [IFN- γ], derivadas das células T ativadas. A não regulação genética de uma citocina que induz a produção de IFN- γ promove o desenvolvimento do diabetes em um modelo murino. Não se sabe ao certo se a expressão anormal dos genes MHC constitui uma causa ou a consequência da insulite.
- ◆ Cerca de 70 a 80% dos pacientes com diabetes tipo 1 apresentam auto-anticorpo contra células das ilhotas, dirigidos contra antígenos intracelulares destas células, como a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), “auto-antígenos das ilhotas 2” (IA-2, uma tirosina-fosfatase), insulina e gangliosídios. Não se sabe ao certo se estes auto-anticorpos e outros tomam parte na lesão das células β . Estudos recentes em modelo animal implica fortemente as células T GAD-reativa na patogenia da doença tipo 1, sugerindo que os anticorpos reativos contra GAD são formados após lesão das células β mediadas pelas células T. Independente de sua origem, os auto-anticorpos anti-GAD podem ser detectados bem antes do início dos sintomas clínicos. Além disso, a presença simultânea de anticorpos dirigidos contra GAD, IA-2 e insulina está associada a um risco de quase 100% de desenvolvimento de diabetes clínico dentro de 5 anos. Os parentes assintomáticos

de pacientes com diabetes tipo 1 (que, portanto, apresentam risco aumentado) desenvolvem auto-anticorpo contra as células das ilhotas dentro de meses a anos antes de manifestarem diabetes franco. Cerca de 10% dos indivíduos com diabetes tipo 1 também apresentam outros distúrbios auto-inunes órgão-específico, como doença de Graves, Addison e tireoidite.

Em resumo, evidências incontestáveis implicam a auto-imunidade e a lesão mediada imunologicamente como causas de perda das células β no diabetes tipo 1. De fato, foi constatado que a terapia imunossupressora melhora o diabetes tipo 1 em animais experimentais e em crianças com início recente da doença.

Fatores Ambientais. Admitindo-se que uma suscetibilidade genética possa predispor à destruição auto-imune das células das ilhotas, o que deflagra a reação auto-imune? Embora a resposta permaneça desconhecida na maioria dos casos, existem evidências da participação de fatores ambientais. Crianças Filandesas têm um risco de 60 a 70 vezes maior de desenvolver diabetes tipo 1 do que crianças coreanas. No nordeste dos EUA, foi constatado um aumento de três vezes na incidência de diabetes tipo 1 em crianças com menos de 15 anos de idade desde o final da década de 60. Em três estudos realizados no Japão, em Israel e no Canadá, os emigrantes passam a apresentar um risco de diabetes tipo 1 que se aproxima mais daquele de seu país de destino do que daquele de seu país de origem.

Vírus. Os estudos epidemiológicos realizados sugerem uma ação dos vírus. Há muito tempo, foi constatada a existência de tendências sazonais no diagnóstico de novos casos, que frequentemente correspondem à prevalência de infecções virais comuns, como a

associação entre os vírus Coxsackie do grupo B e as doenças pancreáticas, incluindo o diabetes. Outras infecções virais implicadas incluem a caxumba, o sarampo, o citomegalovirus, a rubéola e a mononucleose infecciosa. Embora muitos vírus exibam tropismo pela célula β , a lesão direta induzida por vírus é raramente grave o suficiente para provocar o diabetes mellitus. Vários cenários foram sugeridos para o papel dos vírus. Um deles é que os vírus causam lesão leve das células β , que é acompanhada de uma reação auto-imune contra antígenos previamente seqüestrados em células β alteradas por vírus em indivíduos com suscetibilidade ligada ao HLA. Por conseguinte, o diabetes tipo 1 poderia ser uma rara consequência de alguma infecção viral relativamente comum, retardada pelo longo período de latência necessário para que ocorra perda auto-imune progressiva das células β e dependente dos efeitos modificadores da constituição genética, em particular das moléculas MHC da classe II.

Outra possibilidade consiste no desenvolvimento de uma resposta imune contra uma proteína viral que compartilha seqüências de aminoácidos com uma proteína de célula β (“mimetismo molecular”). Por exemplo, uma seqüência de seis aminoácidos é compartilhada entre a GAD das células das ilhotas e o complexo de replicação P2-C do vírus Coxsackie B4. O cross-over imunológico contra o próprio pode ocorrer em decorrência da ativação devido ao desenvolvimento de uma resposta imune contra neo-antígeno viral. Por fim, foi recentemente identificado um genoma retroviral endógeno nas ilhotas diabéticas, que também atua como superantígeno. Ainda não sabemos se o vírus atua como deflagrador, como fator precipitante ou, simplesmente, como um marcador do diabetes.

Outros Fatores. A exposição antigênica também pode provir de outras fontes. Apesar de o assunto ser controvertido, foi relatado que as crianças que ingerem leite de vaca no início da vida (antes de 4 meses de idade) apresentam um aumento de 1,5 vezes no risco de diabetes do tipo 1 em relação às crianças amamentadas, sugerindo o espectro de um antígeno de reação cruzada no leite de vaca (Gerstein 1994). Diversas toxinas químicas, incluindo a estreptozotocina, o aloxan e a pentamidina, também induzem destruição das células das ilhotas em animais. Nos seres humanos, a pentamidina, o fármaco utilizado no tratamento de infecções parasitárias, esteve ocasionalmente associada ao desenvolvimento de diabetes de início abrupto, e alguns casos de diabetes também foram relatados após a ingestão acidental ou suicida de Vacor, um agente farmacológico empregado como raticida. Estas substâncias químicas atuam diretamente sobre as células das ilhotas ou indiretamente ao deflagrar uma reação auto-imune destrutiva.

1.3 - Patogênese do Diabetes Tipo 2 (*Periodontology 2000, 2007;v.43e 44*)

Embora muitos conhecimentos tenham sido adquiridos nestes últimos anos, a patogenia do diabetes tipo 2 permanece enigmática. Não há evidências da participação de mecanismos auto-ímunes. O estilo de vida do indivíduo claramente desempenha algum papel, o que ficará evidente quando for considerada a obesidade. Entretanto, os fatores genéticos são ainda mais importantes do que no diabetes tipo 1. Entre gêmeos idênticos, a taxa de concordância é de 60 a 80%. Em parentes de primeiro grau com diabetes tipo 2 (e em gêmeos não-idênticos), o risco de desenvolver a doença é de 20 a 40% em comparação com 5 a 7% na população geral.

Em contraste com o diabetes tipo 1, a doença não está ligada a qualquer gene HLA. Com efeito, estudos epidemiológicos indicam que o diabetes tipo 2 parece resultar de um

conjunto de múltiplos defeitos genéticos ou polimorfismos, cada um contribuindo com o seu próprio risco predisponente e modificado por fatores ambientais.

Os defeitos metabólicos que caracterizam o diabetes tipo 2 são: 1-um distúrbio na secreção de insulina pela célula β e 2-uma redução da resposta dos tecidos periféricos à insulina (resistência à insulina) (Fig. 2). A primazia do defeito na secreção versus a resistência a insulina é um assunto controvertido.

Distúrbio na secreção de insulina pelas células β . Em populações com risco de desenvolver diabetes tipo 2 (parentes de pacientes), pode-se observar a presença de hiperinsulinemia moderada, atribuída à hiper-responsividade das células β a elevações fisiológicas da glicemia. Com o desenvolvimento da doença franca, o padrão de secreção de insulina exibe uma alteração sutil. No início da evolução do diabetes tipo 2, a secreção de insulina parece ser normal; e os níveis plasmáticos do hormônio não estão reduzidos. Entretanto, ocorre perda do padrão oscilante e pulsátil normal de secreção de insulina, e a primeira fase rápida de secreção de insulina deflagrada pela glicose apresenta-se atenuada. Em seu conjunto, estas e outras observações sugerem a ocorrência de distúrbios na resposta das células β à hiperglicemia no início da evolução do diabetes tipo 2, mais do que uma deficiência da síntese de insulina.

Posteriormente, na evolução do diabetes tipo 2, verifica-se o desenvolvimento de deficiência leve a moderada de insulina, que é menos grave do que aquela observada no tipo 1. A causa de deficiência de insulina não está totalmente estabelecida, porém parece haver lesão irreversível das células β . Em contraste com o diabetes tipo 1, não há evidências de qualquer lesão viral ou imunologicamente mediada das células das ilhotas. De acordo com um ponto de vista, todas as células somáticas de indivíduos predispostos, incluindo as células β pancreáticas, são geneticamente vulneráveis à lesão, resultando em

aceleração da renovação celular e envelhecimento prematuro e, por fim, redução moderada na massa de células β . A hiperglicemia crônica pode exaurir a capacidade das células β de funcionar (um processo infelizmente denominado “toxicidade da glicose”) em consequência da estimulação persistente das células β .

Resistência à Insulina. Embora a deficiência de insulina esteja presente num estágio tardio da evolução do diabetes tipo 2, não é de magnitude suficiente para explicar os distúrbios metabólicos. Com efeito, a redução da resposta dos tecidos periféricos (resistência à insulina) constitui um importante fator no desenvolvimento do diabetes tipo 2. A princípio, é preciso ressaltar que a resistência à insulina constitui um fenômeno complexo, que não se limita à síndrome diabética. Tanto na obesidade quanto na gravidez (diabetes gestacional), a sensibilidade dos tecidos-alvo à insulina diminui (até mesmo na ausência de diabetes), e pode ocorrer elevação dos níveis séricos de insulina para compensar a resistência ao hormônio.

As bases moleculares da resistência à insulina ainda não estão estabelecidas. Pode haver uma redução no número de receptores de insulina e, principalmente, ocorre comprometimento na sinalização pós-receptor pela insulina. Convém lembrar, a partir de nossa discussão anterior, que a ligação da insulina a seus receptores resulta em translocação de GLUT para a membrana celular, que por sua vez, facilita a captação de glicose. A redução da síntese e translocação de GLUT nas células musculares e adiposas parece responsável pela resistência à insulina observada na obesidade, bem como no diabetes tipo 2. Foram também descritos outros defeitos de sinais pós receptores. Do ponto de vista fisiológico, a resistência à insulina, independentemente do seu mecanismo, resulta: 1) na incapacidade da insulina circulante de dirigir apropriadamente o metabolismo da glicose (e de outros combustíveis metabólicos), 2) em hiperglicemia mais persistente e, portanto 3) na estimulação mais prolongada das células β do pâncreas.

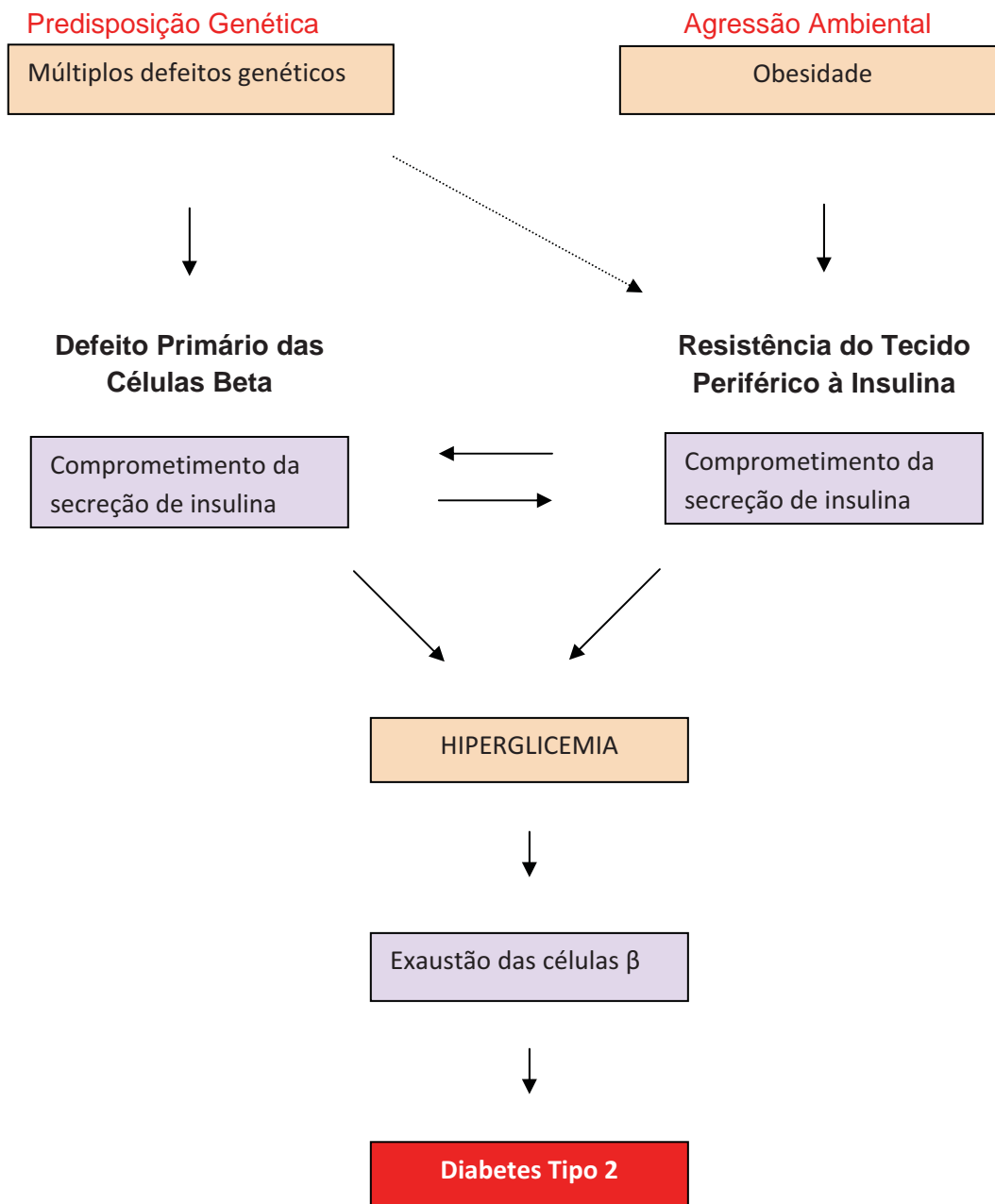


Fig. 2: Esquema do desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2. A predisposição genética e as influências ambientais convergem, causando hiperglicemia e diabetes franco. A primazia do comprometimento da secreção de insulina pelas células β e da resistência periférica à insulina não está estabelecida: em pacientes com doença clínica, é possível demonstrar a existência de ambos os defeitos.

Obesidade. Qualquer que seja o evento desencadeante proposto para o diabetes tipo 2, a obesidade exerce uma influência ambiental extremamente importante. Cerca de 80% dos indivíduos com diabetes tipo 2 são obesos, com maior impacto da obesidade abdominal (em contraste com a obesidade nos depósitos subcutâneos). Catabolismo da gordura intra-abdominal fornece ácidos graxos livres para o fígado, enquanto se torna relativamente resistente aos efeitos moduladores da insulina (o que não é verdade para a gordura subcutânea). Embora a obesidade abdominal e resistência à insulina possam ser expressões coincidentes de um terceiro fator desconhecido, deve-se considerar a possibilidade de uma relação causal.

Os indivíduos obesos não diabéticos também podem exibir resistência à insulina e hiperinsulinemia e, numa pequena proporção deles, verifica-se o desenvolvimento de diabetes tipo 2. Entretanto, quando indivíduos obesos com diabetes tipo 2 são comparados com não-diabéticos obesos, sugerindo uma deficiência relativa de insulina. Felizmente, para muitos diabéticos obesos, a perda de peso (e o exercício físico) pode reverter o comprometimento da tolerância à glicose, particularmente no início da evolução da doença.

Amilina. O papel da amilina na patogenia do diabetes tipo 2 também despertou interesse. Este peptídeo de 37 aminoácidos é normalmente produzido pelas células β , acondicionado com a insulina e secretado concomitantemente com ela em resposta à ingestão de alimento. Em pacientes com diabetes tipo 2, a amilina tende a acumular-se no espaço sinusoidal, fora das células β , em estreito contato com as suas membranas celulares, adquirindo, eventualmente, as características tintoriais do amilóide. Não se sabe se a deposição de amilina contribui para o distúrbio de reconhecimento da glicose pelas células β ,

observando no início da evolução do diabetes tipo 2 ou se na verdade resulta de um distúrbio da função da célula β .

Resumindo, o diabetes tipo 2 é um distúrbio multifatorial complexo, que envolve uma redução da liberação de insulina, resultando em deficiência relativa do hormônio, bem como uma falta de sensibilidade dos órgãos terminais. A resistência à insulina, frequentemente associada à obesidade, produz um estresse excessivo sobre as células β , que podem falhar diante da necessidade contínua de um estado de hiperinsulinismo. Os fatores genéticos estão definitivamente envolvidos, porém o modo pelo qual eles se encaixam neste quebra-cabeça continua sendo um mistério.

1.4 - Modelo experimental de diabetes induzido por Aloxana

O diabetes experimental tem sido provocado de diferentes maneiras: através indução do estresse, infecções, toxinas e pancreatectomia (Mering & Minkovski, 1889), lesões do SNC (Hetherington & Ranson, 1940), uso de hormônios anti-insulínicos, exposição à hidrocortisona ou ACTH (Cavellera & Mosca, 1953), indução por vírus (Yoon et al., 1963).

Dentre os métodos químicos utilizados, a aloxana e a estreptozotocina são as substâncias mais estudadas pois possuem citotoxicidade específica para as células beta do pâncreas, induzindo hiperglicemia permanente no período de 18 a 24 horas após sua administração (Junod et al., 1967).

A aloxana (2, 4, 5, 6, - Tetraoxypyrimida; 5 - 6-Dioxyuracila/monohidratada) é uma droga com efeito imediato e permanente sobre as células beta pancreáticas (Duarte, 1996). Segundo Lukens (1948), ela age durante os

primeiros 5 minutos após injeção endovenosa, produzindo diabetes experimental de gênese independente do funcionamento das glândulas pituitárias ou adrenal, comumente envolvidas em outros modelos-animais de diabetes.

Por outro lado a aloxana ocasiona uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos, representada pela seqüência hiperglicemia-hipoglicemia-hiperglicemia permanente. A hiperglicemia inicial é uma resposta não específica mediada pelo sistema simpático. A hipoglicemia subsequente tem sido atribuída a vários fatores, como: uma ação “insulina-like” da aloxana, uma estimulação transitória das células beta, um efeito da aloxana diretamente sobre o fígado e, eventualmente, a liberação de uma insulina pancreática pré-formada; sendo esta última hipótese a teoria mais aceita. Finalmente, a fase hiperglicêmica permanente é decorrente da lesão definitiva das células beta (Spadella, 1989).

As complicações produzidas pelo diabetes aloxânicos em animais são: acidose e coma (principalmente quando altas doses de aloxana são administradas, levando ao diabetes grave e insuficiência renal); desenvolvimento de catarata e retinopatia, que têm o aparecimento mais precoce quanto mais grave for o diabetes, sendo a catarata muito semelhante a observada no ser humano; imaturidade sexual e maior incidência de perdas fetais. No pâncreas, a medida que ocorre a necrose e o desaparecimento das células beta, as células alfa, permanecem inalteradas (a aloxana não produz hialinização ou fibrose nas ilhotas, lesões mais comumente vistas em humanos); os túbulos renais sofrem o mesmo grau de agressão que ocorre com as células beta, todavia, as lesões tendem a desaparecer após o 4º dia da administração da droga, o que a diferenciam das lesões pancreáticas, onde os danos são definitivos. O diabetes aloxânico, no entanto, determina, a longo prazo, lesões tubulares e glomerulares que muito se assemelham à nefropatias diabéticas do homem e, também, lesões nervosas periféricas e autonômicas características. A aloxana determina,

ainda, lesão hepática que, ao contrário dos outros órgãos, não se correlaciona com a dose administrada, visto que altas doses dessa substância não produzem necrose hepática, enquanto que baixas doses se acompanham de graves danos ao fígado. Usualmente, porém, as lesões hepáticas típicas determinadas pela aloxana são pequenos focos de necrose, habitualmente localizados na periferia dos lóbulos hepáticos (Spadella 1989).

1.5 Diabetes e Doença Periodontal

A relação entre o diabetes mellitus e a doença periodontal vem sendo estudada há muito tempo, a partir de uma associação biológica na qual pessoas diabéticas têm maior susceptibilidade para muitos tipos de infecção. Løe (1998), reconheceu a doença periodontal como a sexta complicação mais comum do diabetes mellitus.

Alguns fatores podem contribuir para o desenvolvimento da doença periodontal em diabéticos, como defeito na função e quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares (PMN), alteração de síntese e metabolismo do colágeno, aumento da atividade de collagenases, acúmulo de produtos finais da glicosilação (AGES) que atuam sobre receptores de macrófagos e monócitos resultando em aumento na secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e prostaglandina (PGE2) (Nishimura et al. 1998; Salvi et al. 1998; Lalla et al. 2000; AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY 20 COMMITTEE ON RESEARCH SCIENCE AND THERAPY, 2000), mudança vascular patológica, comprometimento do potencial de cicatrização de feridas e desequilíbrio microbiológico (Zambon et al. 1988; AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1996; Grossi 2001; Iacopino 2001).

Estudos em animais

McMillan (1970), observou macroscopicamente após indução do diabetes em ratos com ALX e subsequente extração dos primeiros molares superiores esquerdos, que mesmo nos ratos diabéticos controlados com insulina, a havia quadro de infecção quando o diabetes apresenta-se severo. Relatou ainda que nenhuma diferença foi observada no padrão de cicatrização das feridas cirúrgicas entre os grupos controle, diabético não controlado e diabético controlado com insulina, entretanto, houve diferenças significativas foram observadas na cronologia deste processo entre os diabéticos (controlado e não controlado) em relação ao controle.

No ano seguinte, McMillan (1971) analisando microscopicamente os espécimes dos grupos do trabalho anterior (1970), observou que a reparação dos alvéolos de animais diabéticos que receberam ou não insulina, apresentou-se retardada e mesmo quando o coágulo sanguíneo mostrava-se aparentemente normal, a resposta inicial inflamatória estava diminuída. A presença de fragmentos ósseos no alvéolo pós-extração excitaram uma resposta inflamatória localizada no grupo controle, enquanto no grupo diabético levaram a uma maior sequestração óssea, com conseqüente necrose e maior predisposição à infecção.

Spanheimer et al. (1988), avaliaram a produção de colágeno em animais diabéticos induzidos. Os autores induziram o diabetes com doses de STZ que variaram de 35 mg/kg a 300 mg/kg. As menores doses proporcionaram menor concentração de glicose plasmática. A produção de colágeno foi diminuída no tecido ósseo e no tecido cartilaginoso, principalmente nos animais com maior hiperglicemia. Os autores atribuíram a causa do retardo reparacional observada nos ratos diabéticos, em parte, ao aumento do trauma durante os procedimentos de extração dental e em parte, a um ou mais fatores combinados como: redução da quantidade de coágulo sanguíneo, redução da resposta

inflamatória, aumento da susceptibilidade á infecção, diminuição da resposta fibroblástica e uma aparente redução na capacidade de epitelização.

Shyng et al. (2001), avaliaram o reparo ósseo de defeitos criados em crânio e o *turnover* ósseo em fêmur de ratos diabéticos induzidos, sadios e tratados com insulina. Para isso foi criado um defeito crítico de 5 mm de espessura no osso parietal, o qual foi recoberto com uma membrana de Gore Tex®. O volume ósseo medular no fêmur de animais diabéticos foi menor (40,9%) quando comparados aos sadios (54,3%) e aos tratados com insulina (64,3%). As taxas de aposição mineral, peso seco e quantidade de cálcio foram menores nos animais diabéticos quando comparados ao controle e tratados com insulina. O reparo ósseo nos defeitos também foram prejudicados nos animais diabéticos. Poucos osteoblastos e tecido ósseo neoformado foram observados, não havendo evidências de reabsorção óssea e da presença de células clásticas, sugerindo baixo *turnover* ósseo. Contudo, os animais sadios e os tratados com insulina apresentaram tecido ósseo neoformado e células osteoblásticas em maior quantidade. Concluíram que o diabetes exerce uma influência direta sobre o reparo ósseo inibindo a mineralização, a reabsorção e o remodelamento ósseo.

Beam et al. (2002), avaliaram o efeito da insulina sobre o reparo ósseo em animais geneticamente diabéticos, animais sadios e tratados com insulina. Para isso, as tíbias direitas foram fraturadas com o objetivo de analisar a proliferação celular e a resistência biomecânica do tecido reparacional. Os resultados mostraram diminuição da proliferação celular e da resistência biomecânica nos animais com pobre controle glicêmico, sendo essas alterações corrigidas com o tratamento insulínico.

Lu et al. (2003), avaliaram os mecanismos que afetam o reparo ósseo em animais diabéticos e sadios. A análise histológica demonstrou que a quantidade de tecido

mesenquimal imaturo foi equivalente em ambos os grupos aos quatro dias. Aos seis dias, um surto de crescimento ocorreu no grupo controle, fato não observado no grupo diabético, evidente em nível molecular como demonstrado pela diminuição da produção de osteocalcina, colágeno Tipo I. Fatores de transcrição que regulam a diferenciação osteoblástica mostraram-se substancialmente reduzidos nos animais diabéticos quando comparados aos sadios. O tratamento com insulina reverteu os efeitos deletérios promovidos pelo diabetes. Concluíram que os animais diabéticos produzem suficiente quantidade de tecido mesenquimal imaturo, mas que promovem falha na expressão genética que regula a diferenciação osteoblástica conduzindo à baixa formação óssea.

Santana et al. (2003), realizaram estudo com o objetivo de avaliar se os produtos finais de glicolização (AGEs) e seus receptores interferem na patogênese da diminuição do reparo ósseo nos diabéticos e o reparo de cavidades ósseas. Foram criados defeitos no crânio de ratos diabéticos induzidos, sacrificados após 14 dias da cirurgia para avaliação histológica e histométrica. Os resultados demonstraram que a formação óssea nas lesões foi mais abundante nos animais não diabéticos em relação aos diabéticos. Em relação aos receptores dos produtos finais de glicolização em células osteogênicas os resultados evidenciaram que nos animais diabéticos ocorreu maior expressão desses receptores sugerindo a influência negativa para o reparo ósseo. Os animais sadios que receberam a administração de uma substância semelhante aos produtos finais de glicolização também tiveram a expressão dos receptores e a diminuição da formação óssea, confirmando a hipótese anterior. Os autores concluíram que as interações entre os produtos finais de glicolização e os receptores contribuem para diminuir a formação óssea.

Tyndall et al. (2003), avaliaram a diminuição dos fatores de crescimento no processo de cicatrização óssea nos animais diabéticos. Criaram fraturas no fêmur direito de cada animal, e, após os períodos de dois, quatro e sete dias, mensuraram a expressão do

PDGF e a proliferação celular. A análise imunoistoquímica mostrou diminuição dos fatores de crescimento derivados das plaquetas nos animais diabéticos comparados aos saudáveis, o que também aconteceu com a proliferação celular. Esses resultados sugerem que o diabetes afetou a fase inicial do reparo ósseo pela inibição da proliferação celular através da diminuição da expressão dos fatores de crescimento derivados das plaquetas.

Follak et al. (2004a), avaliaram histometricamente o reparo dos defeitos, de vários diâmetros, em ratos geneticamente diabéticos, em ratos tratados com insulina e sadios. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos de animais nos quais o defeito tinha 0,4 mm de diâmetro. Os resultados para defeitos com diâmetros de 0,8 mm nos animais diabéticos foram inferiores após 24 dias quando comparados aos animais tratados e sadios. Com exceção do período de 4 dias, durante o qual não houve diferenças, o diabetes prejudicou o reparo ósseo nos defeitos maiores de animais doentes quando comparados aos animais tratados e sadios. Com isso, os autores concluíram que a reparação de uma fratura se realiza da melhor forma quando existe uma excelente adaptação entre as partes fraturadas.

Follak et al. (2004b), estudaram a influência do controle metabólico na resistência e na formação óssea em animais diabéticos. Para isso, foi realizado um defeito de 1,1 mm de diâmetro no fêmur direito de cada animal. Severa desordem de mineralização óssea, aposição e diminuição das propriedades biomecânicas ocorreram em ratos com pobre controle metabólico. Assim, as propriedades biomecânicas inferiores observadas nos animais diabéticos podem ser reflexo da pobre qualidade óssea, da menor densidade mineral e das interações nos constituintes orgânicos e minerais.

Holzhausen et al. (2004), investigaram o efeito do curto tempo de diabetes experimental associado à terapia de insulina sobre a severidade da perda óssea em ratos e o

efeito da periodontite experimental sobre o controle da glicemia por meio do monitoramento do sangue dos animais e radiografias digitalizadas para análise da perda óssea alveolar. Observou-se que a severidade da doença periodontal não foi afetada pelo curto tempo de diabetes e que, a periodontite experimental aumentou os níveis de glicose do sangue, proporcionando assim um descontrole do diabetes experimental.

2.2.1 Alterações nos tecidos periodontais no estado diabético

Em resposta aos elevados níveis de glicose característicos do diabetes mellitus, ocorrem alterações teciduais no periodonto que podem ser definidas como fatores modificadores do curso clínico da doença periodontal.

A associação da doença periodontal e diabetes foi estudada por Cerda et al. (1994), que selecionaram 100 pacientes com diabetes mellitus insulino-dependente (DMID), e dividiram em quatro grupos de acordo com a idade e tempo de diagnóstico do diabetes. O grupo 1 apresentou-se com idade > 55 anos e mais de cinco anos de diabetes diagnosticada; o grupo 2 com idade < 55anos e mais de cinco anos de diabetes; o grupo 3 com idade > 55 anos e menos de cinco anos de diabetes; e finalmente, o grupo 4 com idade < 55 anos e menos de cinco anos de diagnóstico da doença. A condição periodontal foi avaliada pela sondagem de bolsas, presença de recessões, perda de inserção, sangramento, perda óssea alveolar e mobilidade dental. Observou-se maior profundidade de bolsas, presença de grandes recessões, e perda de inserção nos grupos com diabetes além de cinco anos. Para o grupo com diagnóstico da doença de menos de cinco anos, verificam-se maiores índices de recessão e perda de inserção nos pacientes mais velhos que 55 anos. Todos os grupos apresentaram perda óssea, com maiores índices para os grupos com idade mais velha, e para grupos com tempo de diagnóstico do diabetes além de cinco anos. Os autores afirmam que os anos desde o diagnósticos do diabetes mellitus, representando a

duração do diabetes no paciente, é mais significativo que a idade para a severidade da doença periodontal.

Karjalainen et al. (1994), examinaram o relacionamento entre a severidade da doença periodontal e complicações orgânicas em pacientes com diabetes 4 mellitus insulino-dependente de longo tempo de duração. Estudaram 26 pacientes DMID, que tinham diabetes por pelo menos dez ano. Todos os pacientes passaram por exame clínico oral do índice de placa, profundidade de sondagem, nível de inserção gengival, sangramento na sondagem, e presença ou ausência de cálculo subgengival; e análise do controle metabólico. Os pacientes foram divididos em grupos: pacientes sem complicações orgânicas, pacientes com complicações incipientes, e pacientes com complicações avançadas. Pacientes com complicações avançadas tiveram mais sangramento na sondagem, profundidade de bolsa > 4mm, e mais perda de inserção que pacientes com complicações incipientes ou sem complicações. A prevalência de bolsas em lugares com cálculos subgengivais aumentaram com a severidade das complicações. Os resultados sugerem que uma maior atenção é necessária para pacientes diabéticos tipo I de longo tempo de duração da doença e com pobre controle metabólico, principalmente aqueles com complicações orgânicas.

Iacopino (1995), afirma que a hiperlipidemia é uma condição que quase sempre acompanha a hiperglicemia em diabéticos, apresentando-se como metabolismo anormal de gorduras e alterações de reações básicas moleculares e celulares, que interferem nas funções dos neutrófilos e acarretam o desenvolvimento de complicações do diabetes que se traduzem no prejuízo da cicatrização de feridas e na destruição observada na doença periodontal.

Pinson et al. (1995), realizaram um estudo com o propósito de determinar se existem diferenças entre o estado periodontal da população de diabéticos jovens e um grupo de não diabéticos de idade similar. Foram selecionadas 50 crianças com idade entre 7 e 18 anos, sendo 26 diabéticos tipo I incluindo uma dupla de gêmeos idênticos, e 24 crianças não diabéticas, sendo destas crianças irmãos de crianças diabéticas. Todas as crianças passaram por um exame físico completo prévio, e o grau de controle do diabetes foi medida por meio da hemoglobina glicosilada. Realizou-se uma avaliação clínica periodontal em toda a boca, onde foi examinado o índice de placa, fluxo do fluido gengival, índice gengival, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, recessão gengival e sangramento na sondagem. As análises identificaram notáveis interações para índice gengival e índice de placa, indicando nos diabéticos uma média maior de índice gengival para a maioria dos dentes, e maior ou mesmo nível de placa em todos os dentes, quando comparado com os não diabéticos. Logo, 5 determinou-se uma severidade aumentada da inflamação gengival nos diabéticos, em relação aos controlados de idade similar.

Procurando investigar o relacionamento entre o estado clínico dos tecidos periodontais e a duração dos diabetes Firatli et al. (1996), acompanharam 77 pacientes crianças saudáveis e adolescentes com DMID e idade média de 12,47 anos, e 77 crianças com idade e sexo correspondente. Todos os pacientes e os indivíduos no grupo controle foram examinados, avaliando índice de placa, índice gengival, sangramento na sondagem, sondagem de profundidade de bolsa e valores de perda de inserção clínica. Em conjunto, realizaram-se testes laboratoriais com coleta de sangue em jejum, análise da frutossamina usada como padrão para hemoglobina glicosada, e análise da glicose, sendo níveis altos nos diabéticos que comprovaram a condição da doença. Verificou-se no grupo diabético, uma média de profundidade de sondagem e valores de perda de inserção clínica mais alta

que no grupo controle. Houve correlação positiva entre a duração do diabetes e a perda de inserção clínica, onde a média de duração do diabetes aproximado de 48,34 meses, foi comparado a uma perda de inserção clínica de 2,40 no grupo DMID e 1,53 no grupo controle.

Segundo Ohgi & Johnson (1996), destacam-se entre esses fatores, as alterações na atividade e expressão de fatores de crescimento, incluindo um grupo de mecanismos que podem potencialmente contribuir para muitos dos problemas sistêmicos encontrados em diabéticos, entre eles o processo de cicatrização. A expressão do fator básico de crescimento de fibroblastos apresenta-se alterada no paciente portador de diabetes, devido aos altos níveis de glicose, ocasionando inibição do crescimento das células do ligamento periodontal.

A fibronectina, que funciona como um sinalizador para as células do ligamento periodontal entre o meio intracelular e o extracelular, sofre alterações frente aos altos níveis de glicose, repercutindo assim, em mudanças morfológicas e morte das células do ligamento periodontal. Alterações da fibronectina em relação à glicose acarretam, ainda, diminuição da resposta quimiotática das células do ligamento periodontal para o fator de crescimento derivado de plaquetas. Esse pode ser o mecanismo que explica a dificuldade de cicatrização em pacientes diabéticos e pode ser a causa da destruição periodontal mais severa observada nesses pacientes (Nishimura et al. 1996).

O estado periodontal de homens diabéticos e não-diabéticos foi avaliado e associado aos efeitos do fumo e controle glicêmico por Bridges et al. (1996). O estudo comparou o estado periodontal de 118 homens diabéticos e 115 homens não-diabéticos de idade similar. Índice de placa e índice gengival, medidas de sangramento, profundidade de sondagem, perda de inserção e número de dentes perdidos foram medidos nos pacientes ao

acaso. O fumo, controle glicêmico, padrão sócio-econômico, e cuidados dentários prévios também foram avaliados. Os parâmetros de índice de placa, índice gengival, medidas de sangramento gengival, profundidade de sondagem, perda de inserção e perda dental foram significativamente mais elevados em pacientes diabéticos que não-diabéticos. Os pacientes fumantes com diabetes tiveram altas medidas em todos os parâmetros periodontais analisados. A duração do diabetes não foi relacionado com medidas periodontais. O controle glicêmico, analisado por medida de glicose no plasma em jejum e valores de hemoglobina glicosilada, não foi relacionado com o estado periodontal.

Karjalainen & Knuutila (1996), verificaram o relacionamento entre o nível do equilíbrio metabólico e a inflamação gengival em crianças e adolescentes diabéticas insulino-dependente. Foi incluído no estudo um grupo de pacientes DMID com diagnóstico recente da doença; e um segundo grupo de pacientes DMID com doença já diagnosticada há aproximadamente seis anos e que faziam uso da insulina diária. O exame periodontal consistiu em avaliar a presença ou ausência de sangramento na sondagem em quatro faces de um mesmo dente, associado com a avaliação do índice de placa visível em todas as superfícies dos dentes. O equilíbrio metabólico foi avaliado por valores totais de hemoglobina glicosilada; e para casos recém diagnosticados de DMID, medidas de glicose no sangue. Os resultados apontaram que nos casos de DMID, o sangramento gengival diminuiu após a iniciação do tratamento da insulina, enquanto o equilíbrio da glicose melhorou e a quantidade de placa permaneceu estável. Já nos casos de longo tempo de DMID, o sangramento gengival foi mais pronunciado em indivíduos pobremente controlados (51%) que em indivíduos bem controlados (39%), tendo as medidas de placa e valores de hemoglobina glicosilada inalterada entre os exames. Tal fato confirma a relação entre o equilíbrio de glicose e a inflamação gengival.

O infiltrado do tecido conjuntivo de pacientes diabéticos é caracterizado pela presença de menor número de fibroblastos e de colágeno e mais plasmócitos, em relação ao que se observa em pacientes não diabéticos, conforme observado por Seppälä et al. (1997). Os autores relataram que histologicamente, detectaram a presença de infiltrado de células inflamatórias do tecido conjuntivo na terminação mais apical do epitélio juncional, embora a gengiva possa parecer clinicamente saudável.

Salvi et al. (1997), com objetivo de avaliarem a secreção de TNF α por monócitos em pacientes diabéticos insulino-dependentes estes autores realizaram o monitoramento de monócitos destes pacientes e observaram que monócitos de pacientes diabéticos apresentam elevada secreção de TNF α quando comparado com a secreção de pacientes não-diabéticos. Relataram também, que a presença de TNF α é um sinal para a morte programada da célula (apoptose), principalmente sobre fibroblastos. A liberação de TNF α é também uma substância “gatilho” para a liberação de enzimas que degradam a matriz extracelular, incluindo metaloproteinases, colagenases, hialuronidases e elastase.

Segundo Lalla et al. (1998), a conseqüência crítica da hiperglicemia é a glicolização não-enzimática e a oxidação de proteínas e lipídios, que após uma série de reações, resulta na formação irreversível de produtos finais de glicolização avançada ou AGEs (“advanced glycation end products”), que se acumulam em grau acentuado no plasma e em tecidos de pacientes com diabetes. Os AGEs tem seu efeito patogênico pela interação com seus receptores específicos, conhecidos por RAGEs (“receptor for advanced glycation end products”), que são imunoglobulinas da superfície celular presentes em níveis acentuados em células-alvo de diabéticos, como células endoteliais e monócitos. A interação entre os AGEs dos tecidos periodontais e os RAGEs dos monócitos leva a uma ativação crônica dessas células com conseqüente produção de mediadores da inflamação como TNF- α (fator de necrose tumoral- α), interleucina 1 β e interleucina 6, cujos efeitos

podem resultar na ativação de osteoclastos e collagenases, conduzindo a uma destruição do osso e do tecido conjuntivo. A interação dos AGEs com os RAGEs das células endoteliais também pode resultar na perpetuação da resposta inflamatória (Lalla et al. 1998). Grossi e Genco (1998), relatam que a infecção periodontal, condicionada por células fagocitárias como monócitos, pode induzir a um estado crônico de resistência à insulina, contribuindo para o ciclo de hiperglicemia. Devido à contínua ligação e ao acúmulo da proteína AGE, amplia-se, assim, a trilha clássica de destruição de tecido conjuntivo no diabético. Dessa forma, há um sistema de relação dupla da resposta metabólica e destruição tecidual, resultando em doença periodontal mais severa em maior dificuldade de controlar a glicemia do diabético.

Em 1998, Salvi et al. avaliando a resposta de mediadores da inflamação, observaram que pacientes diabéticos apresentavam níveis significativamente maiores de prostaglandina 2 e interleucina 1 β no fluido gengival quando comparados a não diabéticos controlados com estado periodontal similar. Tais pacientes possuíam uma reação inflamatória exagerada em resposta às bactérias gram-negativas da infecção periodontal, a partir da atividade hipersecretória dos monócitos na produção de mediadores da inflamação.

Em um estudo com diabéticos não insulino-dependente em uma comunidade de índios Pima, Taylor et al. (1998), pesquisaram a perda óssea alveolar em um período de dois anos. No estudo, foram avaliados um grupo não diabético e um grupo de indivíduos DMNID, cuja condição da doença foi definida pela concentração de glicose no plasma após uma dose de glicose oral. Para avaliar a condição periodontal, foram analisados índice de placa, índice gengival, medidas da profundidade de sondagem, perda de inserção clínica, e perda de osso interproximal avaliado por intermédio de radiografias. Observou-se elevada proporção de indivíduos DMNID (67% dos índios) com perda óssea radiografia de

1% a 24% enquanto no grupo não-diabético essa perda óssea foi encontrada em 46% dos indivíduos. Os outros parâmetros analisados não mostraram diferença significativa entre diabéticos e não-diabéticos.

Ainda procurando avaliar o estado periodontal em alguns pacientes diabéticos não insulino-dependente, Collin et al. (1998), estudaram um grupo de pacientes idosos DMNID, cujo diagnóstico da diabetes foi confirmado com teste oral de tolerância à glicose e compararam com um grupo de pacientes não-diabéticos. O controle glicêmico do grupo diabético foi determinado pela concentração de hemoglobina glicosilada. O exame periodontal foi realizado avaliando a ocorrência de cálculo supra e subgengival, a profundidade de sondagem, a perda de inserção clínica, e a porcentagem de perda óssea alveolar avaliada por radiografias em cada paciente do estudo. Os resultados evidenciaram que os pacientes com DMNID, com longo tempo de duração da doença, sofreram mais freqüentemente de periodontite avançada que os indivíduos não-diabéticos, numa proporção de 40% e 13%, respectivamente.

Taylor et al. (2000) revisaram evidências e dados atuais de estudos clínicos e epidemiológicos que sugerem importantes relações entre o estado da saúde bucal, infecções bucais crônicas (cárie e doença periodontal) e certas doenças sistêmicas (diabetes e pneumonia por aspiração) em idosos. Informações do NHANES III mostraram que cáries e doenças periodontais são prevalentes em idosos e estas infecções bucais podem contribuir com agressões sistêmicas, com implicações importantes na etiologia e patogênese de certas doenças sistêmicas. Há evidências clínicas e epidemiológicas para considerar a infecção periodontal um fator de risco para um pobre controle glicêmico no diabetes do tipo 2 e para sugerir a inclusão da avaliação periodontal e tratamento no regime de tratamento do diabetes. A representação limitada de adultos mais velhos em estudos da associação do controle glicêmico e da infecção periodontal, bem como a evidência limitada

de avaliações clínicas enfatizam a necessidade de estudos projetados especificamente para avaliar os efeitos do tratamento da infecção periodontal no controle glicêmico de idosos.

Collin et al. (2000) estudaram os níveis e atividades salivares das metaloproteinases da matriz (MMP 8 e 9) em 45 pacientes com diabetes do tipo 2 e 77 indivíduos controle. A média de hemoglobina glicosilada (HbA1c) foi 8,7%, o que indica que o controle metabólico da doença mostra-se insatisfatório. Os níveis de MMP (metaloproteinase) foram relacionados aos achados periodontais clínicos e microbiológicos, assim como à taxa de fluxo salivar e outros fatores. O fluxo salivar e as concentrações de albumina e amilase foram similares nos pacientes com diabetes do tipo 2 e no grupo controle. Os índices médios gengival e de bolsa periodontal foram maiores no grupo com diabetes. O número de bactérias com potencial periodontopatogênico foi mais baixo nos diabéticos. Os níveis e atividades da MMP-8 e MMP-9 em pacientes com diabetes do tipo 2 foram, em geral, similares àqueles do grupo controle. No entanto, o sangramento gengival, a profundidade de bolsa e a HbA1c foram associados com os níveis de MMP-8 que, por sua vez, foram previstos negativamente pela elevação dos níveis de peróxido lipídico no plasma do grupo diabético. Os autores concluíram que a periodontite avançada no diabetes do tipo 2 parece estar relacionada a níveis elevados de MMP-8, o q pode ser útil no monitoramento da doença periodontal no diabetes.

Yalda et al. (2000), enfatizaram o diabetes como um modificador da expressão periodontal. Com base na literatura atual, foi discutido a respeito da etiologia do diabetes, que é multifatorial, envolvendo uma predisposição auto-imune, agressão infecciosa e desordem poligênica, suas complicações, algumas das quais atribuídas ao estado hiperglicêmico crônico, como: diurese osmótica com diminuição da oxigenação, alteração na quimiotaxia neutrofílica, fagocitose e adesão. Foram analisados os fatores associados a diabetes que aumentam a severidade da periodontite, entre estes: efeitos do

diabetes na microbiota periodontal, função neutrofílica prejudicada, resposta inflamatória excessiva, defeitos na renovação do colágeno, prejuízo na cicatrização e efeitos do controle diabético no estado periodontal. Os autores acreditam que os diabéticos podem responder diferentemente à terapia devido aos fatores sistêmicos apresentados, entretanto quase todos os diabéticos parecem responder ao tratamento periodontal convencional.

Lalla et al. (2000) estudaram a hipótese de que a ligação AGE-RAGE pode contribuir na exacerbação da resposta inflamatória e destruição do tecido conjuntivo e ósseo na doença periodontal associada com o diabetes. Foram utilizados ratos diabéticos, os quais foram infectados com microorganismos periodontopatógenos humanos. Os autores utilizaram substâncias bloqueadoras da ligação AGE-RAGE. Nos animais que não foram tratados com bloqueadores AGE-RAGE, os autores observaram elevada infecção oral, exagerada resposta inflamatória e elevada destruição óssea alveolar, enquanto que nos ratos tratados com bloqueadores, a destruição periodontal estava ausente.

Alpagot et al. (2001), investigaram as associações entre os níveis de elastase do FSG, medidas clínicas do estado periodontal e o controle metabólico do diabetes em pacientes com DMID e DMNID. Sessenta pacientes foram investigados, 30 diabéticos tipo 2 e 30 diabéticos tipo 1. o controle metabólico foi avaliado pelos níveis de HbA1c. As medidas clínicas e as amostras de FSG foram mensuradas nas superfícies mesio-vestibulares de 2 pré-molares e de 2 molares dos sextante mais atingido pela doença. A elastase do FSG foi determinada pela medida de p-nitroanilida resultante da hidrólise de peptídeo específico da elastase. Os níveis de elastase do FSG foram significativamente correlacionados com índice gengival, índice de sangramento, profundidade de sondagem e nível de inserção nos grupos de diabetes do tipo I e do tipo II. Os níveis de HbA1c não foram correlacionados com as medidas clínicas e com a elastase do FSG. Os resultados sugerem que a elastase do FSG, a idade e o tabagismo sejam indicadores de risco para

periodontite em pacientes com diabetes mellitus e que o estado periodontal não esteja associado com a duração e com o controle metabólico do diabetes.

Katz (2001), avaliou a relação recíproca entre níveis anormais de glicose no sangue e CPITN elevados em 10.590 pacientes não diabéticos, sendo correlacionado o nível de glicose com o estado periodontal refletido como CPITN. Os resultados mostram que pacientes com doença periodontal severa e moderada têm risco de desenvolver níveis elevados de glicose que são maiores quando comparados a indivíduos com periodonto saudável, confirmando uma forte associação entre nível alterado de glicose sanguínea e doença periodontal manifestada pelo CPITN.

Emingil et al. (2001), relataram caso clínico de uma menina diabética insulino-dependente, 9 anos, que apresentava periodontite localizada agressiva. A paciente se submeteu a exames médicos, clínicos e radiográficos da sua condição periodontal. O tratamento consistiu em terapia periodontal não cirúrgica e controle simultâneo do diabetes, com acompanhamento longitudinal por 5 anos. Os exames médicos não revelaram patologias preexistentes, exceto retardo no crescimento. Os testes laboratoriais mostraram um pobre controle glicêmico, glicemia em jejum de 497mg/dl e HbA1c de 15,6%. Os níveis de migração e quimiotaxia dos neutrófilos foram significativamente reduzidos. O tratamento periodontal e o controle metabólico do diabetes resultaram na melhora da sua condição periodontal. Este caso prova a eficiência da terapia periodontal na prevenção de futuros colapsos periodontais e comprometimento sistêmico da paciente. Os autores concluíram que certos indivíduos têm predisposição a formas mais agressivas de periodontite, e que exames médicos, clínicos e intervenções na condição sistêmica em combinação com o tratamento periodontal são importantes no manejo desses pacientes.

Kawamura et al. (2001), examinaram as relações simultâneas entre variáveis médicas e odontológicas selecionadas, juntamente com 5 componentes comportamentais como: conduta geral de saúde, fadiga percebida, controle da dieta, dieta regular e relação de conduta odontológica, utilizando dados de um estudo de 102 pacientes DMNID. Os resultados mostraram que a conduta de saúde bucal afetou o estado periodontal através de seus efeitos no acúmulo de cálculo, mas não no acúmulo de placa. A conduta geral de saúde teve efeitos significativos na conduta de saúde bucal e na conduta da dieta, e esta afetou o acúmulo de placa e o controle metabólico. Logo, a severidade das duas doenças pareceu estar ligada indiretamente pelas condutas de saúde, como dieta e conduta de saúde bucal.

Mattson & Cerutis (2001) realizaram revisão na literatura sobre diabetes mellitus e suas implicações odontológicas. Relataram presença de sinais, sintomas e complicações bucais como: xerostomia, queimação na boca e língua, aumento da glândula parótida, infecções por *Candida albicans*, queilite e doença periodontal. Observaram também que a literatura evidencia relação entre doença periodontal e diabetes mellitus, indicando que diabéticos com pobre controle glicêmico têm maior incidência e severidade de periodontite, além de maior perda de inserção de tecido conjuntivo e de perda óssea, quando comparados com diabéticos bem controlados. Alguns estudos indicam que diabetes mellitus é claramente um fator de risco para doença periodontal, particularmente em diabético descontrolados. Os autores afirmaram que os resultados do tratamento periodontal, bem como a estabilidade resultante e as complicações, parecem ser dependentes do controle glicêmico em longo prazo.

Almas et al. (2001), determinaram a relação entre a doença periodontal e o nível de glicose sanguínea em DMNID, numa amostra de 40 pacientes que foram separados em grupos de 20 diabéticos e 20 pacientes saudáveis. O exame clínico inclui

freqüência de higiene bucal, estado periodontal avaliado pelo CPITN, níveis de glicose em jejum e ao acaso, além de análises radiográficas. O número de perdas dentárias foi analisado através das radiografias. Os resultados mostraram alta severidade de doença periodontal entre os pacientes diabéticos. Os diabéticos escovavam os dentes com menos freqüência e apresentavam um alto nível de glicose quando comparados com os pacientes saudáveis. O índice principal do CPITN foi comparado com o nível de glicemia e com a severidade da doença periodontal. Houve uma correlação do aumento do nível glicêmico com aumento do CPITN, pois valores do CPITN, pois valores do CPITN de 13,5 a 19,12 corresponderam a glicemia em jejum de 142 a 173,2 mg/dl e 184,2 a 199,12 mg/dl de glicemia ao acaso entre os diabéticos. Este estudo indica que os diabéticos deveriam fazer um melhor controle das práticas de higiene bucal e dos níveis glicêmicos.

Soskolne & Klinger (2001) direcionaram seus estudos para a avaliação do risco de desenvolvimento de periodontite em pacientes com diabetes e conseqüentemente, olhando o diabetes como um fator de risco para a periodontite, além de propor uma relação bidirecional entre as duas doenças, baseando-se na evidência epidemiológica e no mecanismo fisiopatológico comum envolvido no seu desenvolvimento. Por meio de associações epidemiológicas utilizando dados do NHANES III, avaliaram a prevalência de periodontite entre os diabéticos, obtendo como resultados dessa análise, evidências epidemiológicas convincentes de que: a) periodontite é mais prevalente em diabéticos; b) prevalência de diabetes em pacientes com periodontite é significamente maior (duas vezes) do que em pacientes sem periodontite. Em relação ao mecanismo fisiopatológico há duas hipóteses para testar a relação entre periodontite e diabetes: a primeira propõe uma relação direta casual e modificadora, na qual a hiperglicemia e hiperlipidemia do diabetes resultam em alterações metabólicas que podem exacerbar a periodontite inflamatória induzida por

bactérias; a segunda hipótese propõe que uma combinação de genes poderia resultar em um hospedeiro que poderia desenvolver periodontite, diabetes ou ambas.

Beikler et al. (2002), avaliaram se o sangue decorrente da sondagem periodontal poderá ser usado para determinar os níveis de glicose. Uma amostra de 45 pacientes (32 não diabéticos e 13 diabéticos) foram submetidos a sondagens de bolsas periodontais, para posterior coleta do sangue com a haste do aparelho de automonitoramento de glicose. Como controle também foi coletado sangue dos capilares das pontas dos dedos. Os resultados revelaram uma forte correlação entre a glicose sanguínea sulcular gengival e dos capilares periféricos, não havendo diferenças estatísticas significantes, possibilitando uma avaliação rápida, segura e não invasiva de monitoramento da glicose durante o exame periodontal regular.

Orbak et al. (2002), compararam a saúde periodontal de fumantes e não fumantes com DMNID e não fumantes com periodontite que não sofrem de doenças sistêmicas. A investigação foi feita em 60 indivíduos adultos, divididos em 3 grupos: 1) fumantes com DMNID, 2) não fumantes com DMNID e 3) não fumantes sem doença sistêmica. Foram determinados os níveis de glicose no sangue, hemoglobina glicosilada e imunoglobulinas G, A e M, juntamente com o índice de placa, índice gengival, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica. Os achados bioquímicos não mostraram diferenças entre os níveis médios de glicose dos grupos 1 e 2, mas os níveis do grupo 3 foram mais baixos; não houve diferença significativa entre os níveis de Ig nos três grupos. Os achados periodontais mostraram que o índice gengival e o nível médio de inserção clínica do grupo 3 foi mais baixo do que dos grupos 1 e 2. A periodontite foi mais severa em fumantes e não fumantes com DMNID do que em não fumantes sem DMNID e a condição periodontal foi melhor em não fumantes com DMNID do que em fumantes com

DMNID. Os resultados sugerem que o diabetes e o cigarro são fatores de alto risco para doença periodontal.

Karikoski et al. (2002), avaliaram a necessidade de tratamento periodontal de 120 diabéticos na Finlândia. Durante o estudo foram coletadas informações sobre a duração e o tipo de diabetes, complicações e o nível de hemoglobina glicada. O exame clínico periodontal identificou presença de placa visível, presença de cálculo e uso do CPITN. Os resultados estatísticos mostraram que o CPITN 3 foi o mais prevalente, já que a maioria dos pacientes eram portadores de bolsas periodontais de 4 ou 5 mm. De acordo com o modelo de regressão logística, o controle metabólico deficiente estava significativamente relacionado às bolsas patológicas. Não foi encontrada nenhuma relação significativa entre os fatores relacionados ao diabetes e o maior CPITN 4 individual, associado com grande quantidade de cálculos. Os autores concluem que a excessiva necessidade de tratamento periodontal encontrada indica que os cuidados dentários atuais podem ser insuficientes em adultos com diabetes. A higiene oral entre os pacientes de alto risco, principalmente os de controle metabólico deficiente, deveria ser promovida com a colaboração de profissionais da saúde envolvidos no tratamento do diabetes.

Tomita et al. (2002), avaliaram as condições periodontais e sua relação com o diabetes mellitus na população nipo-brasileira. Foram avaliados 831 pacientes quanto ao índice periodontal comunitário e índice de perda de inserção periodontal. Os resultados mostraram que 25,5% não possuíam doença periodontal, 12,5% apresentaram sangramento à sondagem, 49,4% apresentaram presença de cálculo, 10,4% apresentaram bolsas superficiais, 2,2% apresentaram bolsas profundas. A avaliação entre diabetes e condições periodontais não apresentou associação estatística, embora os indivíduos com diabetes tenham elevados percentuais de bolsas profundas e perdas de inserção maiores que 6 mm do que os não diabéticos. Os autores concluíram que a abordagem epidemiológica da

condição periodontal e sua associação com doenças sistêmicas, como diabetes mellitus, podem oferecer importante contribuição para prevenir suas complicações.

Negishi et al. (2004), avaliaram a associação entre estado do diabetes, estilo de vida e aspectos da periodontite avançada, como: profundidade de sondagem e perda óssea alveolar. Foram avaliados 57 diabéticos quanto à profundidade de sondagem e da perda óssea radiográfica. Os resultados estatísticos mostraram que o hábito de beber e altos valores da HbA1c foram significativamente associados com a profundidade de sondagem. A presença de complicações como retinopatias, comportamento irritado e altos valores da HbA1c foram significativamente relacionados com o avanço da perda óssea alveolar. Somente altos valores da HbA1c foram detectados como significativamente relacionados com o avanço da periodontite, caracterizando perda óssea maior que 50%, ou dois ou mais dentes com profundidade de sondagem maior que 6 mm. Os autores concluíram que hábitos de beber e comportamento irritado são correlacionados com a condição dos diabéticos com doença periodontal, em adição a altos valores da HbA1c. Logo, o estilo de vida e o estresse psicossocial podem afetar o estado da doença periodontal dos diabéticos.

Engelbreton et al. (2004), determinaram o controle glicêmico relatado pelos níveis fluido sulcular gengival da IL-1 β . As amostras de FSG foram coletadas em 45 diabéticos com periodontite crônica. Foram mensurados em seis sítios por dente o índice de placa, índice de sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção. Os níveis de IL-1 β foram determinados através da amostra individual do FSG, através do teste ELISA. Foi 19 mensurado a HbA1c e a glicemia em jejum. Os resultados das mensurações periodontais e do controle glicêmico foram significativamente correlacionados com nível da IL-1 β no FSG. Pacientes com níveis de HbA1c maiores que 8% têm um nível significativamente alto da IL-1 β no FSG em relação aos pacientes com HbA1c inferior a 8%. Os autores concluíram que o pobre controle glicêmico é associado

com elevados níveis da IL-1 β no FSG, confirmando a hipótese de que a hiperglicemia contribui para intensificar a resposta inflamatória, o que sugere um mecanismo para explicar a associação entre o pobre controle glicêmico e a destruição periodontal.

Hongbing et al. (2004), avaliaram a influência do diabetes mellitus na osteogênese e aumento da apoptose em células ósseas na presença de infecções bacterianas, em ratos que desenvolvem o diabetes tipo 2 naturalmente. Foram inoculados nestes animais bactérias periodontopatogênicas e após evolução da doença periodontal os dados foram coletados. Observaram aumento da perda óssea por suspensão da formação óssea devido a apoptose de células ósseas.

Gomes (2006) com intuito de estudar a influência do diabetes mellitus sobre a evolução da doença periodontal induzida, foi avaliado o peso corporal, os níveis séricos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina (ALP), os níveis teciduais de mieloperoxidase, além da, análise macroscópica e radiográfica dos espécimes de cada animal. Foram utilizados 128 ratos machos Wistar divididos em 4 grupos de 32 ratos, sendo: Grupo I controle; Grupo II diabético; Grupo III controle com doença periodontal induzida e Grupo IV diabético com doença periodontal induzida. Após dois dias da confirmação do estado diabético induzido por estreptozotocina, foi realizada a colocação da ligadura. Oito animais de cada grupo foram sacrificados nos períodos experimentais de 3, 7, 15 e 30 dias após colocação da ligadura. Os resultados demonstraram que o estado diabético perdurou até o final do experimento nos grupos II e IV. Dentre os marcadores bioquímicos, somente a ALP apresentou-se estatisticamente maior nos grupos diabéticos (II e IV). Macroscopicamente, houve diferença somente entre os grupos com e sem doença periodontal, independente da presença do diabetes, com maior alteração tecidual nos períodos tardios de periodontite (30 dias). Os níveis gengivais de MPO foram estatisticamente maiores ($p < 0.05$) nos grupos com doença periodontal induzida (III e IV).

Radiograficamente, o grupo IV apresentou maior perda óssea estatisticamente significativa quando comparada aos demais grupos ($p < 0,05$). O autor conclui o estudo relatando que a doença periodontal induzida não altera o estado hiperglicêmico, no entanto, sugere que o diabetes aumenta a severidade da perda óssea alveolar no processo evolutivo da doença periodontal. Dessa forma, as alterações teciduais no de pacientes com diabetes, com produção anormal de mediadores da inflamação, sugerem uma modificação na resposta do hospedeiro frente às agressões e parecem conduzir à maior severidade da doença periodontal.

1.6 Terapia Fotodinâmica

Nos últimos anos um tema muito interessante e de diversas divergências é a utilização do Laser de baixa intensidade (LILT – Low Intensity Laser Therapy), quer pela sua ação biomoduladora dentro do comprimento de onda (λ) desde o laser de hélio-neônio ($\lambda = 632,8$ nm) até os Lasers diodos semicondutores ($\lambda =$ até 905 nm).

Pesquisadores de reconhecimento mundial como a Profa. Tiina Karu quanto o Prof. Éndre Mester, contribuíram e muito com pesquisas para a utilização do Laser de baixa intensidade na clínica. O valor terapêutico do LILT é ainda controvertido, variando desde o possível efeito placebo (Braekt et al. 1991; Ryden 1994), à sua ação bactericida (Coob et al. 1992; Okamoto et al. 1992; Wilson et al. 1993; Wilson 1994; Rooney et al. 1994; Wilson et al. 1995; Hatit et al. 1996; Radvar et al. 1996; Kato et al. 1998; Bach et al. 2000; Deppe et al. 2001; Maiorana et al. 2002), à prevenção eficaz da cárie dental (Sluzhaev et al. 1989) e à sua efetividade no processo de reparo (Mester et al. 1968; Garcia 1997).

Nos últimos anos a comunidade científica mundial tem dado atenção especial à mais nova forma de ação do LILT, a terapia fotodinâmica. Inicialmente utilizada na área Médica para tratamento oncológico tem sido empregada na Odontologia com grandes perspectivas no controle antimicrobiano.

Dobson & Wilson 1992, utilizaram vários agentes fotossensibilizadores, como o cristal violeta, azul de metileno, azul de toluidina O, fitalocianina, sobre a viabilidade de alguns microorganismos como os *streptococcus sanguis* *porphyromonas gingivalis*, *fusobacterium nucleatum* e o *actinobacillus actinomycetemcomitans*, quando submetidos ao tratamento “*in vitro*” com o laser de He-Ne com a potência de 7,3mW.

Em 1994 Wilson relata em seu estudo de revisão de literatura que a terapia realizada com Laser atuando em baixa intensidade pode ser influenciada pelo pH, conteúdo de água, presença de matéria orgânica, densidade da população celular e intensidade do fluido sulcular. Relata também que muitas bactérias da cavidade oral não apresentam cromóforos externos para absorver a luz laser no espectro vermelho ou infravermelho, exceção feita as espécies pigmentadas de preto como as *Porphyromonas* e *Prevotellas* apresentam protohematoporfirina e protoporfirina respectivamente como cromóforos naturais. O autor relata também que a terapia fotodinâmica pode ser utilizada na terapia de manutenção para prevenir a recolonização na região sub-gengival por bactérias periodontopatogênica.

Infecções bacterianas estão normalmente presentes em ferimentos crônicos e métodos comumente utilizados têm seu efeito e uso questionado como o uso de peróxido de hidrogênio que elimina certas bactérias, mas pode ter um efeito tóxico ao novo tecido de granulação a ser formado. O uso de antibióticos também tem seu efeito questionado pela seleção de bactérias resistentes. O uso racional do Laser terapêutico pode estimular a

síntese protéica, estimular o crescimento bacteriano e interferir no reparo de ferimentos (Nussbaum, et al. 1994). Karu et al. (1990), demonstrou que o Laser com 905 nm estimula o crescimento de *Escherichia coli* na dose dependente de 1 a 12 J/cm² e inibe o crescimento a fração de 30 a 60 J/cm² e um importante ponto deste estudo foi que o crescimento foi maior quando os autores usaram freqüências de 5 Hz quando comparado com 26 Hz. Bertoloni, et al. (1993) também observaram o aumento no crescimento de *Escherichia coli* após a utilização de Laser de He-Ne com 0,4 Hz de freqüência e dose de 4 J/cm² por um período de 60 minutos e o crescimento era erradicado quando realizava-se uma exposição por 180 minutos.

Haas et al. (1997), realizou estudo para avaliar a afirmativa de Wu-Yuan et al. (1995) que relatou que diferentes superfícies de implantes poderá influenciar a aderência do biofilme bacteriano. Frente a esta afirmativa os autores realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica na eliminação de bactérias na superfície de discos de titânio com superfície polida, de hidroxiapatita. Estes discos foram contaminados com as *Porfiromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacilos actinomycetemcomitans*, e divisão em quatro grupos experimentais. Grupo 1 recebeu azul de toluidina na concentração de 100 µg/mL e, após 1 minuto foi irradiado com o Laser diodo com 905 nm de comprimento de onda operando no modo pulsado, com potência de 7,3 mW por um período de 60 segundos. O grupo 2 não recebeu nenhum tipo de tratamento. Já o grupo 3 recebeu irrigação somente com soro fisiológico por 1 minuto e subsequente aplicação do Laser com os mesmos parâmetros do grupo 1 e finalmente o grupo 4 que recebeu tratamento somente com azul de toluidina. Imediatamente após os tratamentos foram coletadas amostras e então realizaram exame de cultura. As superfícies tratadas apenas com azul de toluidina e Laser isoladamente os autores não observaram diminuição nas culturas bacterianas e culturas negativas foram observadas apenas com a

combinação do Laser e azul de toluidina. Os autores concluíram os seus estudos afirmando que a terapia fotodinâmica resultou na morte bacteriana podendo ser utilizada no tratamento da periimplantite apresentando a vantagem de não alterar a superfície dos implantes além de apresentar os mesmos resultados, independente da superfície do implante analisada.

O processo de reparação de feridas cutâneas associada a droga fotossensibilizadora teve na pesquisa de Espinosa (1999) um dos primeiros relatos. O experimento, realizado em ratos, os quais foram tratados com Laser de 635 nm ou Laser de 904nm, associados ou não ao azul de metileno (100µmg/ml), tendo como controle, feridas não tratadas. O autor observou que os eventos biológicos foram mais evoluídos nos grupos tratados com Laser e pela terapia fotodinâmica. Porém os eventos biológicos foram mais evidentes no grupo tratado com azul de metileno e Laser com 635 nm e, por ordem decrescente, nas tratadas com azul de metileno e Laser com 904 nm, Laser de 635 nm e Laser de 904 nm.

Lopes Jr. (2000), com objetivo de avaliar o uso de droga fotossensibilizadora associada ou não ao laser de baixa intensidade sobre os eventos biológicos do processo de reparação alveolar em feridas de extração dental infectadas. Foram utilizados 48 ratos que após indução anestésica realizou-se exodontia do incisivo superior com subsequente isquemia alveolar. Estes alvéolos foram então contaminados com secreção purulenta de ratos que apresentavam alveolite. Após três dias da evolução da alveolite estes animais foram divididos em 4 grupos. Grupo I - foi tido como grupo controle e nenhum tipo de tratamento foi realizado. Grupo II – os ratos pertencentes a este grupo receberam apenas curetagem alveolar e posterior irrigação com azul de metileno na concentração de 100 µg/mL. Grupo III – nestes ratos o autor realizou a curetagem alveolar e posterior aplicação do Laser de Arseneto de Gálio e Alumínio com 635 nm de

comprimento de onda com emissão pulsada de forma pontual depositando na área 3,2 J/cm² de densidade energética perfazendo um tempo de 240 segundos. Após 7, 15, 21 e 28 dias da realização do tratamento os ratos foram sacrificados e realizou-se a análise histológica. Esta análise permitiu ao autor observar que no grupo controle houve um atraso na cronologia de reparação alveolar e que o uso da droga fotossensibilizadora não promoveu efeitos indesejáveis à reparação alveolar e o uso isoladamente do Laser promoveu uma reparação mais evoluída e diferenciada que o grupo controle. Quando o autor realizou a terapia fotodinâmica o processo de reparação alveolar demonstrou-se mais evoluído e diferenciado quando usou-se a droga isoladamente ou o laser. O autor relata que estes resultados abrem novas perspectivas de emprego do Laser atuando em baixa intensidade e reforçam a possibilidade do emprego de droga fotossensibilizadora para se obter a fotobiomodulação.

Com o objetivo de avaliar a eficácia do azul de metileno e do azul de toluidina O na fotossensibilização letal de microorganismos patogênicos Usacheva et al. (2001), utilizaram estes corantes em diversas concentrações sendo: 10, 20, 30 40, 50, 100, 150, 200 µM em diferentes bactérias como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginos*. Os autores utilizaram o Laser de Argônio com comprimento de onda de 630 nm e o Laser diodo de comprimento de onda de 664 nm com fluência variando de 10 e 60 J/cm² e a fixação da fluência e variando a intensidade de 50 a 100 mW/cm². Os resultados obtidos pelos autores indicaram que todos os microorganismos foram eliminados em algum grau quando expostos ao Laser na presença dos corantes. No entanto, a fotossensibilização dependeu do corante utilizado, sua concentração, fluência e intensidade da luz, bem como da espécie bacteriana envolvida. Na ausência da luz o azul de toluidina O mostrou-se mais efetivo quando comparado com o azul de metileno na

morte de células bacterianas. O aumento da efetividade do corante em proporcionar morte bacteriana está relacionado com o tempo de contato e concentração.

Com o objetivo de avaliar o efeito da terapia fotodinâmica sobre a *Cândida albicans* Teichart et al. (2002), utilizaram cepas resistentes ao tratamento convencional da candidíase as quais foram coletadas de pacientes HIV-positivo. Estas cepas foram inoculadas na cavidade oral de ratos que posteriormente foram submetidos a aplicação tópica de 1 mL do azul de metileno nas concentrações de 250, 275, 300, 350, 400, 450 e 500 µg/mL. Após 10 minutos da aplicação do corante os autores aplicaram o Laser diodo com comprimento de onda de 664 nm com uma potencia de 400 mW, por um período de 687,5 segundos resultando em uma densidade energética de 275 J/cm². Após aplicação única realizaram exame de cultura da coleta das amostras e os animais foram sacrificados para análise histológica da língua. Os resultados obtidos pelos autores mostram uma completa eliminação dos microorganismos quando utilizaram as concentrações de 450 e 500 µg/mL do corante. Na análise histológica os ratos tratados com terapia fotodinâmica não apresentaram candidíase e insignificante resposta inflamatória, sendo que nos ratos do grupo controle as línguas apresentaram-se com elevada taxa de candidíase restrita as camadas de queratina. Os autores concluíram o estudo relatando que a terapia fotodinâmica é uma alternativa em potencial para o tratamento da candidíase, apresentando como vantagens de ser uma terapia realizada topicamente sem a interferência com outros medicamentos aplicados sistemicamente, ser uma técnica simples, inespecífica atingindo um grande número de microorganismos e uma terapia que pode ser repetida sem o risco da seleção de cepas resistentes e indicam a utilização do rato como modelo experimental para avaliação da terapia fotodinâmica.

Kömerik et al. (2002), com o objetivo de avaliar o efeito adverso do Laser na mucosa de ratos na presença do azul de toluidina O em várias concentrações e

avaliaram também a penetração do corante no tecido. O azul de toluidina foi utilizado na concentração de 25, 50 e 200 µg/mL. O Laser diodo utilizado pelos autores apresentava-se com comprimento de onda de 633 nm, com potência de 100mW. A mucosa recebeu 25 µL do corante e posterior aplicação do Laser com uma fibra ótica de 6 mm de diâmetro e, o lado oposto da mucosa foi tido como controle negativo. Os grupos experimentais foram compostos pela combinação de 25 µg/mL do corante com densidade de energia de 110J/cm² resultando em um tempo de exposição de 5 minutos, 50 µg/mL do corante com densidade de energia de 170 J/cm² resultando em um tempo de exposição de 8 minutos e 200 µg/mL do corante com densidade de energia de 340 J/cm² resultando em um tempo de exposição de 16 minutos. O autores também avaliaram o efeito isoladamente do Laser e do corante. Após 3 dias do referido tratamento os animais foram sacrificados para análise histológica e para avaliação da distribuição do corante no tecido foi utilizado o método de fluorescência dos tecidos e para esta avaliação os animais foram sacrificados 1 minuto e 10 minutos da aplicação do corante. Os resultados obtidos indicam que nenhum animal apresentou-se com estresse em todo o período experimental e quando avaliaram a mucosa nenhum animal em nenhum grupo experimental apresentou-se com mudanças na mucosa. Ao avaliarem histologicamente não observaram em nenhum grupo alterações nas fibras musculares, tecido conjuntivo e epitélio. Não observaram também alterações nos vasos sanguíneos, necrose tecidual e processo inflamatório presente. Na avaliação da biodistribuição do corante o corante usado na concentração de 200 µg/mL por 10 minutos estava presente no tecido epitelial e no tecido conjuntivo os níveis apresentaram-se mais baixos compatíveis com os índices do lado controle. O tecido queratinizado apresentou-se com altas concentrações do corante e os autores relatam que este tecido influencia de forma significativa a penetração do corante no tecido. Quando avaliaram a associação do Laser na penetração do corante puderam observar que o tempo de aplicação influencia a

penetração do corante no tecido sendo, portanto dose dependente. Em camadas mais profundas os autores não encontraram a presença do corante relatando que não seria nenhuma surpresa o tecido conjuntivo não apresentar nenhuma reação a terapia fotodinâmica, relatando ainda que esta terapia seria para o tratamento de infecções superficiais. Os autores concluem o estudo sugerindo que estes resultados obtidos dão segurança ao uso tópico do azul de toluidina O associado ao Laser na cavidade oral para o tratamento de infecções tópicas localizadas.

Dougherty (2002), em seu artigo de revisão de literatura relata que a morte celular promovida pela terapia fotodinâmica é mediada pela formação de oxigênio singlete e outra espécies de oxigênio reativo, causando danos celular direto pela diminuição da vascularização sangüínea contribuindo para a destruição tumoral. Relata também que a necrose e a apoptose ocorrida frente a terapia fotodinâmica depende do fotossensibilizante e da condição de tratamento. O autor salienta que esta terapia promove a ativação de macrófagos, neutrófilos e células T, resultando na liberação de várias citocinas como a IL-6, IL-10 e TNF- α . No final do artigo o autor chama atenção para o mecanismo de ação da terapia fotodinâmica em modelos experimentais animal e que os resultados obtidos apresentam semelhanças com os resultados em humanos.

Diante ao número de trabalhos *in vitro* que mostram o efeito letal da terapia fotodinâmica sobre bactérias periodontopatogênicas Yilmaz et al. (2002), realizou um estudo para avaliarem o efeito desta terapia no tratamento da doença periodontal em humanos. O grupo de estudo foi composto por 10 pacientes os quais não receberam nenhum tratamento periodontal e uso de antibióticos 6 meses antes do estudo. Os autores utilizaram 4 dentes unirradiculados sendo 1 por quadrante o qual deveria apresentar uma perda óssea de 4 mm na superfície mesial. Os pacientes foram divididos em 4 grupos experimentais sendo: raspagem e alisamento radicular associado ao Laser e azul de

metileno 0,05%; apenas a aplicação do Laser; apenas raspagem e alisamento radicular e somente técnicas de higiene oral. O Laser utilizado pelos autores foi o Laser de Arseneto de Gálio com 685 nm de comprimento de onda, na frequência de 5 Hz com potência de 30 mW e densidade de energia de 1,6 J/cm². O Laser foi aplicado imediatamente após a raspagem e alisamento radicular e nos dias 2, 4, 9 e 11. Para análise os autores utilizaram dados microbiológicos e dados clínicos como profundidade de sondagem, índice de placa e índice gengival os quais foram coletados 3 semanas após terapia inicial. Na análise microbiológica os autores verificaram diferença estatística nos grupos tratados com a associação da raspagem e alisamento com o Laser e somente a raspagem e alisamento. Quando os autores avaliaram o tipo de tratamento realizado observaram diferença estatística entre os grupos tratados com raspagem e alisamento e Laser com o grupo em que recebeu apenas a aplicação do laser, entre o grupo tratado com raspagem e alisamento e Laser com o grupo o qual realizou somente técnicas de higiene oral e entre o grupo que recebeu somente raspagem e alisamento com o grupo de técnicas de higiene oral. Quando avaliaram os dados clínicos, os autores observaram redução significativa no índice de placa e no índice gengival em todos os grupos. Quando avaliaram o sangramento a sondagem e profundidade de sondagem houve redução significativa apenas nos grupos os quais foram tratados com raspagem e alisamento radicular associado ao Laser e no qual recebeu somente raspagem e alisamento radicular. No grupo Laser houve uma menor diminuição na perda de injeção, sangramento a sondagem e profundidade de sondagem com exceção no índice gengival e nenhuma diferença foi encontrada entre o grupo do Laser e o grupo que recebeu apenas higiene oral. Quando os autores levaram em consideração todos os parâmetros considerados no exame clínico e microbiológico, somente o debridamento subgengival ou associado ao Laser foi mais efetivo quando comparado com o grupo que recebeu apenas a aplicação do Laser. Os autores concluíram o estudo sugerindo a

necessidade de avaliar o efeito da associação de corantes com o Laser como coadjuvantes a terapia periodontal convencional e relatam ainda que esta nova opção terapêutica pode ser vantajosa no tratamento da doença periodontal inflamatória.

Frente ao número que trabalhos que utilizam diversos emissores com comprimentos de onda variados e parâmetros tendo assim uma gama de resultados contraditórios na literatura do efeito do Laser na cultura de microorganismos Nussbaum et al. (2002), realizaram um estudo para avaliar o efeito do comprimento de onda sobre determinados microorganismos. Os autores utilizaram emissores com 630, 660, 810 e 905 nm de comprimento de onda sobre a cultura de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O Laser de He-Ne com comprimento de onda de 630 e 660 nm atuaram com densidade de energia variando de 1, 2, 5, 10, 20 e 50 J/cm². Para o Laser com 810 nm de comprimento de onda atuou com densidade de energia de 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 J/cm² e este emissor os autores utilizaram para o grupo composto pelas *Escherichia coli*. Os resultados obtidos permitiram que os autores observassem uma mudança significativa no crescimento bacteriano quando utilizaram densidades de energia variando de 1 a 20 J/cm² e o comprimento de onda de 630 nm parece ser o mais comumente associado com a inibição do crescimento bacteriano favorecendo a cicatrização de feridas.

Em um artigo de revisão de literatura sobre a terapia fotodinâmica e suas aplicações Dougherty (2002), relata que a morte celular promovida por esta terapia é mediada pela geração de oxigênio singleto e outra espécies de oxigênio reativo, causando assim danos celular direto, quer seja na membrana celular ou no DNA. Relata também que a necrose e a apoptose ocorrida frente a terapia fotodinâmica depende do fotossensibilizante e da condição de tratamento. O autor relata ainda que muitas investigações tem demonstrado que a terapia fotodinâmica promove a ativação de macrófagos, neutrófilos e células T, resultando na liberação de várias citocinas como a

IL-6, IL-10 e TNF- α e que o mecanismo de ação desta terapia em modelos experimentais apresentam respostas semelhantes quando aplicadas em humanos.

Navratil & Kymplowa (2002), realizaram uma revisão de literatura para avaliarem a contra-indicação do uso do laser de baixa intensidade e, se o seu efeito é verdadeiro ou não. Os autores relatam que a contra-indicação está na incidência da luz Laser em células malignas pelo seu efeito biomodulador. Segundo os autores efeito biomodulador é dado pela ativação de enzimas da cadeia respiratória, com uma simultânea amplificação do efeito antioxidante. Com o aumento de ATP na célula, esta tem o processo de replicação do DNA mitocondrial acelerado. Estes dados podem ser comprovados pelo consumo de oxigênio e glicose no metabolismo celular estarem aumentados. Com este efeito, os autores relatam que há a necessidade de uma boa anamnese e exame clínico para não ocorrer à exposição de células malignas a luz Laser o que poderia promover um efeito bioestimulativo nestas células. Os autores observaram também na literatura o efeito do Laser sobre a viabilidade das bactérias, quando estas são submetidas ao Laser. O efeito positivo desta terapia irá proporcionar uma cicatrização mais diferenciada nos ferimentos purulentos e nas úlceras, devido ao aumento do suprimento sanguíneo com subsequente aumento da imunidade local do tecido irradiado por ativação da fagocitose e da ação proteolítica. A contra-indicação do uso do Laser os autores relatam nos casos de tumores malignos, exposição da retina, exposição do abdômen durante a gravidez e áreas de gônadas e que outras contra-indicações presentes na literatura podem ser consideradas incorretas.

Diante a observação de alguns autores (Tatevossian & Gould 1976; Smith & Geegan 1991) que chamam a atenção para os fatores que influenciam na terapêutica periodontal local como a presença do fluido gengival, sangue, saliva dentre outros, Matevski et al. (2003), realizaram um estudo para avaliarem alguns destes fatores externos

que podem ter influência nos resultados a serem obtidos pela terapia fotodinâmica. A fotossensibilização letal foi analisada *in vitro* em culturas de bactérias periodontopatogênicas como as *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *F. nucleatum*, *P. intermédia*, *A. actinomycetemcomitans* associadas ao sangue ou ao soro fisiológico simulando o fluido gengival, tendo como fonte de luz o Laser de He-Ne 635 nm e lâmpada de xenônio com filtro vermelho. A droga fotossensibilizadora utilizada foi o azul de toluidina O, nas concentrações de 12,5 µmg/ml e 50 µmg/ml. Os autores puderam observar redução na concentração destas bactérias, quando a terapia fotodinâmica foi realizada com as duas fontes de luz com exceção apenas para o *B. forsythus* que apresentou um aumento quando exposto a terapia fotodinâmica tendo a luz de xenônio como fonte de luz, puderam observar também que os resultados obtidos com a lâmpada de xenônio e com o Laser de He-Ne foram semelhantes quando usaram os parâmetros de 12,5 µmg/ml de azul de metileno com dose de 10 J/cm². Os autores concluíram o estudo relatando que a terapia fotodinâmica tem seu efeito afetado negativamente pela presença do sangue e do fluido gengival, pois podem estar refletindo ou absorvendo a luz e o corante tendo um efeito protetor para as bactérias, impedindo assim a penetração da droga até a célula alvo bem como da luz.

Shibli et al. (2003), realizaram um estudo em cães para avaliarem o tratamento da periimplantite quando tratada pela terapia fotodinâmica letal seguida de regeneração óssea guiada. Os autores utilizaram 4 diferentes superfícies de implantes, titânio puro, plasma spray de titânio, hidroxiapatita cristalina e híbrido, com pescoço polido e corpo revestido com ataque ácido. A periimplantite foi induzida por dois meses e após remoção da ligadura e desenvolvimento da periimplantite crônica por 12 semanas os cães foram tratados com debridamento mecânico e posterior fotossensibilização letal tendo como corante o azul de toluidina O com concentração de 100 µg/mL associada ao Laser

diodo de 685 nm depositando na área uma densidade energética de 200 J/cm² e, após terapia realizaram a regeneração tecidual guiada. Os autores concluíram o estudo relatando que o tratamento da periimplantite com a fotossensibilização letal obtiveram uma significativa formação óssea quando associada a regeneração tecidual guiada e os resultados devem ser investigados em outros estudos.

Kömerik et al. (2003), realizaram um estudo para avaliarem a efetividade da terapia fotodinâmica na viabilidade de microorganismos. Os autores utilizaram *P. gingivalis* da linhagem W50, as quais foram inoculadas no interior da cavidade oral de ratos. Imediatamente inoculação de 25µl de *P. gingivalis*, na região dos molares superiores foi administrado topicamente azul de toluidina nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mg/ml. Como fonte de luz os autores utilizaram o Laser diodo de 630 nm depositando na área energia de 6, 12, 24 e 48 Joule correspondendo aos tempos de 1, 2, 4 e 8 minutos. Na análise histológica dos resultados os autores não observaram nenhuma alteração nas estruturas do periodonto como, ulcerações e inflamação no tecido conjuntivo, mesmo nas concentrações mais altas tanto do corante quanto do laser utilizado, quando analisaram o comportamento dos animais os autores não evidenciaram alterações comportamentais nos animais. Ao analisarem radiograficamente a região dos molares superiores não foi observada diferença estatisticamente significativa na perda óssea alveolar quando utilizaram 0,01 mg/ml do corante associado ao laser com energia de 48 J. Na análise morfométrica observou-se redução significativa da perda óssea alveolar quando utilizaram 0,1 e 1 mg do corante associado ao Laser com 48 J de energia, quando comparado com o grupo controle que não receberam nenhum tratamento, somente a inoculação das bactérias. Quando utilizaram apenas o corante ou o laser, independente da concentração ou dose utilizada, os autores não observaram redução significativa da perda óssea alveolar. Os resultados radiográficos foram semelhantes a análise morfométrica exceto quando utilizou-

se 1 mg/ml do corante na ausência do Laser o que resultou em significativa redução da perda óssea alveolar. Foi observada diferença significativa entre o grupo controle e os animais tratados com 0,1 mg/ml e 1 mg/ml do corante associado ao Laser com 48 J de energia. Os autores concluíram seus estudos relatando que a terapia fotodinâmica tendo como corante o azul de toluidina, promoveu fotossensibilização letal em um importante periodontopatógeno presente na bolsa periodontal, sem causar danos aos tecidos adjacentes e a perda óssea alveolar foi significativamente menor nos ratos tratados com a terapia fotodinâmica, sendo uma terapia antimicrobiana alternativa para o tratamento da doença periodontal.

Chan & Lai (2003), com o objetivo de avaliar os questionamentos da literatura para diferentes parâmetros como, dose e tipo de droga fotossensível, que alteram os resultados da terapia fotodinâmica, os autores pesquisaram o efeito do Laser de He-Ne, com potência de 30 mW e comprimento de onda de 632,8 nm e do Laser diodo de AlGaAs, com potência de 100 mW e comprimentos de onda de 665 nm e 830 nm, tendo como corante o azul de metileno na concentração de 0,01% peso/volume, na viabilidade de bactérias periodontopatogênicas. As bactérias utilizadas foram: *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. intermédia*, *A. actinomycetemcomitans* e *S. sanguis* as quais foram mantidas em meio de cultura anaeróbico com posterior quantificação e diluição para posterior teste. O Laser de He-Ne foi utilizado por 30 e 60 segundos, depositando nos microorganismos uma densidade de energia de 3,2 J/cm² e 6,4 J/cm². Já o Laser diodo depositou uma densidade de energia de 10,6 J/cm² e 21,2 J/cm². A distância da fibra às amostras foram mantidas constantes, em 5 milímetros. Os resultados deste estudo mostram que o tratamento somente com o azul de metileno não causou redução significativa na morte de todas as bactérias utilizadas no experimento, demonstrando que o azul de metileno na concentração de 0,01% peso/volume, não foi tóxico. Similarmente, a irradiação com o

Laser He-Ne, não apresentou resultados significantes na morte bacteriana. Em contraste, a exposição ao Laser diodo em ambos os comprimentos de onda com densidade de energia de $10,6 \text{ J/cm}^2$, resultou em significativo declínio das colônias bacterianas. A terapia foi tempo dependente para ambos os sistemas de Laser, porém o Laser diodo de 830 nm foi o mais efetivo e a exposição por 60 segundos com densidade de energia de $21,2 \text{ J/cm}^2$, promoveu a morte de 99-100% das bactérias pigmentadas (*P. gingivalis*. e *P intermédia*) e *S. sanguis*. Já para as espécies de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum*, este tipo de tratamento promoveu a morte de 95 e 96% respectivamente. Os autores concluíram o estudo relatando que a terapia fotodinâmica apresenta a vantagem de ser uma terapia aplicada topicamente no interior da bolsa, sem o perigo dos efeitos indesejáveis de uma droga administrada sistemicamente e que a morte de microorganismos pode ocorrer quando são utilizados parâmetros adequados.

Silva Neto (2004), avaliou histomorfometricamente o efeito do laser isoladamente ou combinado à droga fotossensibilizadora no reparo de feridas cutâneas provocadas no dorso de ratos diabéticos. Para realização do experimento, o autor utilizou 60 animais que, após execução das feridas, foram divididos em 3 grupos: Grupo I, as feridas não receberam nenhum tratamento (controle); Grupo II, as feridas foram submetidas ao tratamento com laser em baixa intensidade; e Grupo III, no qual as feridas foram submetidas ao tratamento com azul de toluidina O ($100 \mu\text{g/ml}$), seguida da aplicação do laser diodo de AsGaAl (635 nm), operando de modo contínuo e em contato com as feridas. As feridas dos grupos II e III foram irradiadas em 9 pontos, sendo que cada ponto recebeu 10 segundos de exposição, energia de $4,5 \text{ J/cm}^2$, totalizando uma densidade energética de 25 J/cm^2 . Decorridos 4 e 10 dias do procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados. Os resultados histológicos evidenciaram que houve um retardo nos eventos biológicos nos ratos diabéticos e que a aplicação do laser mostrou-se

efetiva na reparação de feridas cutâneas. Segundo o autor, a PDT mostrou-se mais efetiva na cicatrização das feridas.

Pfützner et al. (2004), em seus estudos avaliaram a eficácia dos fotossensibilizadores clorina e6, BLC1010 e BLC1014, utilizados na concentração de 10p.M, utilizando como fonte de luz o laser de diodo de 662 nni com potência máxima de 4W. As amostras foram irradiadas com duas diferentes densidades de energia: 5,3J/cm² e 20,1J/cm². Os autores concluíram o estudo que os fotossensibilizadores clorina e6 e BLC1010 apresentam resultados positivos na redução de microorganismos periodontopatogênicos.

Gad et al. (2004), relatam em seus estudos que a emergente resistência antimicrobiana entre bactérias patogênicas, tem levado muitos pesquisadores a buscarem alternativas para a substituição das terapias antimicrobianas por terapias capazes de promoverem a morte bacteriana sem causarem a seleção de bactérias resistentes. Uma alternativa pode ser dada pela terapia fotodinâmica sendo que muitas infecções locais em animais apresentam resultados satisfatórios, no entanto os fatores que governam esta morte não são conhecidos, porém podem ter os resultados alterados pela inativação da terapia pela presença de exotoxinas produzidas pelas bactérias. Quando analisaram o efeito de corantes catiônicos e do azul de metileno ativados pelo Laser com 665 nm de comprimento de onda e 40 J/cm² de densidade de energia depositada em *Staphylococcus epidermoides* e *aureus* com alterações na cápsula e na produção de exotoxinas. Os autores observaram que os resultados obtidos indicaram alterações na morte celular em virtude da produção de exotoxinas, que pode ser um obstáculo para a terapia fotodinâmica e que corantes catiônicos podem superar o efeito negativo da presença de exotoxinas.

Silva et al. (2004), avaliaram o uso do laser e de drogas fotossensibilizadoras na cicatrização de feridas em ratos. Os animais sofreram a ferida cirúrgica, com auxílio de um *punch*, e então foram divididos em 6 grupos: 1. controle (não tratado); 2. base de gel; 3. droga fotossensibilizadora; 4. laser (InGaAlP, 685 nm; 2,5 J/cm²; 35 mW); 5. laser em associação com droga fotossensibilizadora (PDT); e 6. laser associado à droga fotossensibilizadora e à base de gel. Após o procedimento cirúrgico, as respectivas modalidades terapêuticas foram executadas diariamente, e os animais foram sacrificados ao 8º dia. Após análise histológica, os autores encontraram que os animais dos grupos 3, 4, 5 e 6 apresentaram um maior conteúdo de colágeno e uma melhora na epitelização quando comparados aos grupo 1 e 2. A remodelação do tecido conjuntivo foi mais evidente no grupos 5 e 6. Os resultados claramente indicaram um efeito sinérgico entre o laser, a droga fotossensibilizadora e o gel de liberação da droga na cicatrização tecidual.

Lima (2004), analisou o uso do laser e da PDT na cicatrização de feridas cutâneas no dorso de ratos, provocadas por um *punch* aquecido. No grupo 1 (controle), as feridas foram executadas com o *punch* a frio; no grupo 2 (controle positivo), as feridas foram executadas com o instrumento aquecido; no grupo 3 (LLLT), as feridas foram executadas da mesma maneira do grupo 2 e, a seguir, tratadas com laser diodo de AsGaAl (685 nm, 50 mW, 4,5 J/cm²); e no grupo 4, as feridas foram executadas da mesma maneira do grupo 2 e 3, seguida do tratamento com azul de toluidina O (TBO, 100 µg/ ml) e laser diodo de AsGaAl (685 nm, 50 mW, 4,5 J/cm²). Os resultados evidenciaram um retardo na cicatrização no grupo 2, enquanto nos grupos tratados com laser (3 e 4) o processo de cicatrização mostrou-se diferenciado. Os autores concluíram que o laser e a PDT atuam como agente bioestimulador coadjuvante, balanceando os efeitos indesejáveis provocados pela queimadura.

Hayek et al. (2005), compararam os efeitos da terapia fotodinâmica (PDT) com a técnica convencional na redução microbiana de peri-implantites induzidas por ligaduras em cães. Dezoito terceiros pré-molares de nove cães foram extraídos e implantes foram posicionados. Após a osseointegração, peri-implantites foram induzidas através de ligaduras. Após quatro meses, as ligaduras foram removidas e a flora bacteriana normal foi estabelecida por outros quatro meses. Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos. No grupo convencional, as peri-implantites foram tratadas com retalhos mucoperiostais para realizar a raspagem das superfícies dos implantes, e a seguir as áreas foram irrigadas com clorexidina a 0,12%. No grupo da PDT, após o retalho mucoperiostal as áreas foram tratadas com PDT (Pasta-base de Azul de metileno O foi aplicado e o Laser de baixa potência GaAlAs – 660 nm, P: 40 mW, E: 7,2 J) posteriormente. As amostras microbiológicas foram obtidas antes e imediatamente após os tratamentos. Inicialmente um implante foi removido e analisado fazendo a varredura por microscópio para avaliar a contaminação. Os resultados deste estudo mostraram que a *Prevotella sp*, *Fusobacterium sp* e a *S. Beta-haemolyticus* foram reduzidas significativamente para ambos os grupos após o tratamento e nenhuma diferença pode ser observada entre os grupos. Concluiu-se que a terapia fotodinâmica é um método que poderia ser usado para reduzir microrganismos em peri-implantites.

Sigusch et al. (2005), realizaram pesquisa cujos alvos eram encontrar alternativas aos métodos convencionais para suprimir bactérias periodontopatogênicas. No presente estudo, o método da PDT foi testado com dois fotossensibilizadores (Cloro e6 e BLC 1010), em uma experiência realizada em cães. Os animais foram infectados com *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Fusobacterium nucleatum* (Fn) em áreas subgingivais. Após a infecção, eles observaram sinais clínicos de inflamação gengival, incluindo um aumento do edema e do sangramento após sondagem. Monitoramento microbiológico

antes e depois do tratamento foi executado. PDT foi conduzida com um Laser de Diodo (662 nm e 0.5 W de potência) e os fotossensibilizadores. O procedimento da PDT com os dois tipos de fotossensibilizadores causaram uma significativa redução na inflamação, quando comparado com o controle feito somente com o Laser. Além disso, a PDT com Cloro e6 causou uma notável redução em *P. gingivalis* visto que havia uma falta na supressão depois da PDT com BLC 1010. As amostras de *F. nucleatum* foram reduzidas com o Cloro e6, e somente para uma certa extensão com o BLC 1010 e Laser isoladamente. Com o término deste estudo, os autores concluíram que a terapia fotodinâmica usando um fotossensibilizador e a fonte de luz do Laser (662 nm) demonstra ser efetiva na redução dos sinais clínicos de uma doença periodontal como edema e sangramento durante sondagem. O procedimento oferece também significativamente supressão de *P. gingivalis*.

Em 2006, Shibli et al., com o objetivo de avaliar clínica e histomorfometricamente os resultados da terapia fotodinâmica coadjuvante a regeneração óssea guiada no tratamento de periimplantites em cinco cães utilizaram 40 implantes dentais com quatro diferentes superfícies: 10 de titânio puro, 10 de titânio tratadas com plasma, 10 tratadas com ácido e o restante jateadas com óxido. Foi realizada a indução de periimplantites através de ligaduras e após três meses os animais foram submetidos ao tratamento cirúrgico onde metade da boca foi tratada por debridamento mecânico e regeneração óssea guiada (lado controle), enquanto que a outra parte (lado teste) receberam o mesmo tratamento dos controles tendo a associação da terapia fotodinâmica. O laser utilizado foi de diodo GaAlAs, com comprimento de onda de 830nm, potência de 50mW e tempo 80s (4J /cm²), tendo o azul de toluidina como agente fotossensibilizador (100µg/ml). Os animais foram sacrificados 5 meses após os tratamentos. Os lados controle apresentaram uma exposição mais precoce das membranas em todas as superfícies,

enquanto que os lados teste apresentaram uma maior altura óssea. A re-osseointegração variou entre 41,9% para a superfície de titânio pura e 31,19% para a superfície espreitada com plasma nos sítios teste, não havendo diferenças entre as superfícies. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica associada à regeneração óssea guiada permitiu uma melhor re-osseointegração nas áreas adjacentes aos defeitos periimplantares.

Com o objetivo de testar a capacidade do verde de malaquita combinado ao laser vermelho de baixa potência, em inativar o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em suspensão e também a degradação do verde de malaquita após irradiação, Prates et al. (2007), realizaram trabalho expondo a cultura da referida bactéria aos seguintes tratamentos: grupo 1 recebeu aplicação do corante em uma concentração de 0,01% por 5 min; grupo 2, aplicação do corante por 5 min associado a aplicação do laser por 3 min, com uma energia de 5,4 J/cm²; e grupo 3, aplicação do corante seguido do laser por 5 min, totalizando uma energia de 9 J/cm². O verde de malaquita tinha uma concentração de 0,01% e o laser 30 mW de potência. O espectro de absorção para os três grupos foi obtido juntamente com a contagem do número de bactérias. Os resultados mostraram que o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* foi inativado somente nos grupos 2 e 3, onde a terapia fotodinâmica foi realizada e que este corante foto degrada-se após irradiação.

Em 2007 Almeida et al., avaliaram histologicamente e radiograficamente o efeito da terapia fotodinâmica (PDT) na progressão da doença periodontal induzida em ratos. Foi adaptada uma ligadura de algodão na margem gengival do primeiro molar inferior esquerdo de cento e vinte ratos. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=30): Grupo I: nenhum tipo de tratamento realizado, somente a presença da ligadura; Grupo II (MB): tratamento com aplicação tópica de azul de metileno (100 µg/mL) dois dias após adaptação da ligadura; Grupo III (LLT): tratamento com Laser em baixa intensidade dois dias após adaptação da ligadura e Grupo

IV (PDT): tratamento com aplicação tópica de azul de metileno (100 µg/mL) seguido da aplicação do Laser em baixa intensidade dois dias após adaptação da ligadura. A superfície mesial dos dentes no Grupo III e IV foram irradiados com o Laser de diodo de GaAlAs, com 685 nm (50 mW, 120 s, 4.5 J/cm²). Todos os grupos foram subdivididos em subgrupos (n=10) e sacrificados nos períodos de 5, 15 e 30 dias de pós-operatório. O estudo radiográfico foi realizado medindo a distância da crista óssea à união cimento-esmalte na face mesial dos molares. Através de um sistema de escores, vários parâmetros foram utilizados para avaliar o tecido conjuntivo, ligamento periodontal, superfície radicular e tecido ósseo histologicamente. Os resultados radiográficos indicaram uma preservação significativa de tecido ósseo nos animais tratados pela terapia fotodinâmica nos períodos de 7 e 15 dia. Em 15 dias os resultados histológicos demonstraram uma diferença significativa na extensão da reação inflamatória no tecido gengival, com uma reação maior de infiltrado inflamatório crônico nos grupos tratados com o laser de baixa intensidade. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica reduziu a destruição periodontal.

Oliveira et al. (2007), estudaram o efeito da terapia fotodinâmica em pacientes com periodontites agressivas. Em cada paciente metade da cavidade bucal foi tratada pela raspagem com instrumentos manuais e a outra com a terapia fotodinâmica, utilizando um laser com comprimento de onda de 690 nm associado ao fotosensibilizador fenotiazina. Os padrões analisados foram: o índice de placa, índice gengival, sangramento a sondagem, profundidade de sondagem, recessão gengival e o nível de inserção clínica relativa. Essas medidas foram feitas no início e três meses após o início dos tratamentos. Os resultados mostraram que os padrões analisados diminuíram com a realização dos tratamentos, com uma significativa redução no índice gengival e no sangramento à sondagem. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica e a raspagem convencional

mostraram resultados clínicos similares no tratamento não cirúrgico da periodontite agressiva.

Andersen et al. (2007), com objetivo de avaliarem o efeito da fotodesinfecção como método coadjuvante ao tratamento da doença periodontal convencional, utilizaram 33 pacientes que apresentavam quadro de periodontite crônica. Os pacientes foram divididos em 3 grupos: G1-Pacientes tratados apenas com a fotodesinfecção; G2- Pacientes tratados apenas com raspagem e alisamento radicular; G3- Pacientes tratados com raspagem e alisamento radicular e posterior tratamento com a fotodesinfecção. Para análise clínica dos resultados os autores consideraram profundidade de sondagem, sangramento a sondagem e nível de inserção clínica. As avaliações foram realizadas previamente ao tratamento proposto e nos períodos de 3, 6 e 12 semanas de pós-operatório. Como agente fotossensibilizador foi utilizado o azul de metileno na concentração de 0,05% na forma de gel. Como fonte de luz, foi utilizado o laser diodo com 670 nm e potência de 150 mW. O tempo de exposição por sítio foi de 60 segundos e densidade de energia com variação entre 10-20 J/cm². Os autores puderam observar que a fotodesinfecção associada a raspagem e alisamento radicular foi a terapia que apresentou a melhor redução na profundidade da bolsa e ganho de inserção após seis e doze semanas. Estes autores concluíram o estudo relatando que a raspagem e alisamento radicular combinado com a fotodesinfecção levam a uma significativa melhora nos parâmetros clínicos no tratamento da doença periodontal crônica.

Yamada Jr. (2007), com objetivo de avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* a ação da PDT com diferentes parâmetros de irradiação sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) foram utilizadas suspensões de Aa selvagens para avaliação diferentes parâmetros de irradiação na busca de otimizar a redução bacteriana. No estudo *in vivo*, foram utilizados 20 ratos machos, tratados previamente por 5 dias sistemicamente

com antibiótico. Após este período, foi realizada a indução da doença periodontal pela adaptação de uma ligadura de algodão embebida em solução de Aa e mantida por um período de 15 dias e divididos em dois grupos de tratamento. Grupo RM: remoção da placa com escova com movimentos vibratórios por 20 segundos; Grupo RM + PDT: mesmo tratamento do Grupo RM associado com a PDT. Para a realização da PDT foi utilizado o azul de metileno na concentração de 0,01% aplicado topicamente no interior da bolsa e após período de 5 minutos as bolsas foram irradiadas com laser de baixa intensidade ($P=100$ mW; $t=60$ s e $E=5,4$ J). Para análise da efetividade da dos tratamentos foram realizadas coletas microbiológicas antes do tratamento, imediatamente após e 7 dias para análise de cultura e PCR. Os resultados microbiológicos do estudo *in vitro* apresentaram efetividade de 98,4% na morte de colônias de Aa, quando irradiados com energia de 5,4 J e 99,9% quando irradiados com energia de 9 J. No estudo *in vivo*, foi obtida uma redução microbiana de 93,5% no Grupo RM+PDT e de 87,7% no Grupo RM. No período de 7 dias após tratamento, foi observada uma recolonização em ambos os grupos. Os dados coletados pelo PCR, confirmaram a presença de microorganismos em todas as coletas. Os autores concluem o estudo sugerindo que a PDT pode ser uma alternativa promissora como método coadjuvante ao tratamento periodontal.

Referências¹

1. ABBEY LM, COHEN M, SHKLAR G. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the healing of artificially produced tongue wounds in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v. 33; p.672-83:1972.
2. ALBRECHT M, BANOCZY J, TAMAS G JR. Dental and oral symptoms of diabetes mellitus. **Community Dent Oral Epidemiol.** n.16: p.378-80:1988.
3. ALMAS K, AL-QAHTANI M, AL-YAMI M, KHAN N. The relationship between periodontal disease and blood glucose level among type II diabetic patients. **J Contemp Dent Pract.** v. 15; p.18-25:2001.
4. ALMEIDA JM, THEODORO LH, BOSCO AF, NAGATA MJH, OSHIWA M, GARCIA VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontol.** v. 78; p.566-575;2007.
5. ALPAGOT T, SILVERMAN S, LUNDERGAN W, BELL C, CHAMBERS DW. Crevicular fluid elastase levels in relation to periodontitis and metabolic control of diabetes. **J Periodontal Res.**v.36: p. 169-74; 2001.
6. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY COMMITTEE ON RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY. Diabetes and periodontal diseases. **J periodontol.** v.71: p.664-678; 2000.
7. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Diabetes and periodontal diseases: position paper. **J periodontol.**, v.67: p.166-176, 1996.

¹ Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. NBR 6023 informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

8. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Committee report. **Diabetes Care**.v.20: p.1183-1197; 1997.
9. ANDERSEN R, LOEBEL N, HAMMOND D, WILSON M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. **J Clin Dent**. v.18:p.34-38:2007.
10. BACH, G.; NECKEL, C. MALL, C.; KREKELER, G. Conventional versus laser-assisted therapy of periimplantitis: a five-year comparative study. **Implant. Dent**. v. 9: p.247-251:2000.
11. BANTING,F.G., BEST,C.H. The internal secretion of the pancreas. **J. Lab. Clin. Med.**,v.7, p.251-6,1922.(Eds.) **Joslin's diabetes mellitus**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985. p.1-11.
12. BEAM HA, PARSONS JR, LIN SS. The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. **J Orthop Res**. v.20:p.1210-6:2000.
13. BEIKLER T, KUCZEK A, PETERSILKA G, FLEMMIG TF. In-dental-office screening for diabetes mellitus using gingival crevicular blood. **J Clin Periodontol**. v.29;p.216-218:2002.
14. BOWERSOX JC. In vivo collagen metabolism in spontaneously diabetic (db/db) mice. **Exp Mol Pathol**. v.45;p.221-226:1986.
15. BRIDGES RB, ANDERSON JW, SAXE SR, GREGORY K, BRIDGES SR. Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. **J Periodontol**. v.67;1185-1192:1996.
16. CAHILL GF JR Heterogeneity in type II diabetes. **West J Med**. v.142;249-250:1985.

17. CAVALLERO,C., MOSCA,L. Mitotic activity in the pancreatic islets of the rat under pituitary growth hormone and adrenocortitropic hormone treatment. **J. Pathol. Bacteriol.**,v.66;p.147-151:1953.
18. CERDA J, VÁZQUEZ DE LA TORRE C, MALACARA JM, NAVA LE. Periodontal disease in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). The effect of age and time since diagnosis. **J Periodontol.** 65;991-995:1994.
19. CHAN, Y; LAI C. H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers Med. Sci.**, v.18;p.51-55:2003.
20. COBB, C. M.; McCAWLEY, T. K.; KILLOY, W. J. A preliminary study on the effects of the Nd:YAG laser on root surfaces and subgingival microflora in vivo. **J Periodontol.**, v. 63;p.701-707:1992.
21. COLLIN HL, SORSA T, MEURMAN JH, NISKANEN L, SALO T, RÖNKÄ H, KONTTINEN YT, KOIVISTO AM, UUSITUPA M. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. **J Periodontal Res.** v.35;p.259-265:2000.
22. COLLIN HL, UUSITUPA M, NISKANEN L, KONTTURI-NÄRHI V, MARKKANEN H, KOIVISTO AM, MEURMAN JH. Periodontal findings in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. **J Periodontol.** v.69:962-966:1998.
23. COLLINS, T. **Robins patologia estrutural e funcional.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 20, p.809-833:2000.
24. CRAWFORD, J.Y. Dry sockets: casting's comp. Dent. Cosmos, v.38;p.929-933:1986.

25. CUTLER DL, KAUFMANN S, FREIDENBERG GR. Insulin-resistant diabetes mellitus and hypermetabolism in mandibuloacral dysplasia: a newly recognized form of partial lipodystrophy. **J Clin Endocrinol Metab.** v.73:1056-1061:1991.
26. DEPPE, H.; HORCH, H.H.; HENKE, J.; DONATH, K. Per-implant care of ailing implants with the carbon dioxide laser. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, v. 16; p.659-667:2001.
27. DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Arch. Oral Biol.**, v. 37; p.883-887:1992.
28. DOUGHERTY, T.J. An update on photodynamic therapy applications. **J. Clin Laser Med and Surg.**, v.20; p.3-7:2002.
29. DUARTE, A.C.G. O. Estudo experimental dos efeitos da estimulação ultrasônica de baixa intensidade na consolidação óssea em ratos submetidos ao diabetes aloxânico. 1996. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
30. EMINGIL G, DARCAN S, KESKINOĞLU A, KÜTÜKÇÜLER N, ATILLA G. Localized aggressive periodontitis in a patient with type 1 diabetes mellitus: a case report. **J Periodontol.** v.72;1265-70:2001.
31. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, Lamster IB. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1beta and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. **J Periodontol.** 75;1203-1208:2004.
32. ESPINOSA, C. R. Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com laser ou com solução fotossensibilizadora associada ao laser de bioestimulação: estudo histológico em ratos. Marília, 1999. 98p. Dissertação (Mestrado em Clínicas Odontológicas) – Faculdade de Ciências Odontológicas, Universidade de Marília.

33. FAHEY TJ 3RD, SADATY A, JONES WG 2ND, BARBER A, SMOLLER B, SHIRES GT. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. **J Surg Res.** v.50;308-313:1991.
34. FIRATLI E, YILMAZ O, ONAN U. The relationship between clinical attachment loss and the duration of insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) in children and adolescents. **J Clin Periodontol.** v.23:362-366:2001.
35. FOLLAK N, KLÖTING I, WOLF E, MERK H. Histomorphometric evaluation of the influence of the diabetic metabolic state on bone defect healing depending on the defect size in spontaneously diabetic BB/OK rats. *Bone.* 2004 Jul;35(1):144-52.
36. FOLLAK N, KLÖTING I, WOLF E, MERK H. Improving metabolic control reverses the histomorphometric and biomechanical abnormalities of an experimentally induced bone defect in spontaneously diabetic rats. **Calcif Tissue Int.** v.74:551-560:2004.
37. GAD, F., et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.,** v.48:p. 2173-2178;2004.
38. GARCIA,V.G., PINTO, R.S., PACCA, C.A D., THEODORO, L.H., Estudo in vitro da ação dos raios laser de biostimulacao em amostras de streptococcus e sthaphylococcus. **Rev Fac Odontol Lins,** v.10:p.16-21;1997.
39. GARCIA-LEME J, BÖHM GM, MIGLIORINI RH, DE SOUZA MZ. Possible participation of insulin in the control of vascular permeability. **Eur J Pharmacol.** v.29:p.298-306;1974.
40. GARCIA-LEME J. Role of lymphocytes in non-immune experimental inflammation. **Agents Actions.** v.11:p.597-602;1981.

41. Gomes MB, Gianella D, Faria M, Tambascia M, Fonseca RM, Réa R, Macedo G, Modesto Filho J, Schmid H, Bittencourt AV, Cavalcanti S, Rassi N, Pedrosa H, Atala Dib S. Prevalence of Type 2 diabetic patients within the targets of care guidelines in daily clinical practice: a multi-center study in Brazil. **Rev Diabet Stud.** v.3:82-87;2006.
42. Gomes RJ, de Mello MA, Caetano FH, Sibuya CY, Anaruma CA, Rogatto GP, Pauli JR, Luciano E. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. **Growth Horm IGF Res.** v.16:326-331;2006.
43. GOODSON WH 3RD, HUNT TK. Deficient collagen formation by obese mice in a standard wound model. **Am J Surg.** v.138:692-694;1979.
44. GOTH A, NASH WL, NAGLER M, HOLMAN J. Inhibition of histamine release in experimental diabetes. **Am J Physiol.** v.191:25-28;1957.
45. GRANDINI SA. The effect of partial-pancreatectomy-induced diabetes on wound healing subsequent to tooth extraction. Histologic study in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 45:190-199;1978.
46. GROSSI, S. G.; GENGO, R.J. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. **Ann. Periodontol.** v.3,p.51-61;1998.
47. GROSSI, S.C. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evident and need for future research. **Ann. Periodontol.** v.6:p.138-145;2001.
48. HAAS R, DORTBUDAK O, MENS DORFF-POUILLY N, MAILATH G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser an in vitro study. **Clin Oral Implants Res** v.8;249-254:1997.

49. HATIT, B.Y.; BLUM, R.; SEVERIN, C.; MAQUIN, M.; JABRO, M.H. The effects of a pulsed Nd:YAG laser on subgingival bacterial flora and on cementum: na in vitro study. **J. Clin. Laser Med. Surg**, v.14;p.137-143:1996.
50. HAYEK RR, ARAUJO NS, GIOSO MA, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. **J Periodontol** v.76;p.1275-1281:2005.
51. HETHERINGTON,A.W., RANSON,S.W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **Anat. Rec.**, v.78;p.149-53:1940.
52. HOLZHAUSEN, M. et al. E. The influence of short-term diabetes mellitus and insulina therapy on alveolar bone loss in rats. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.39:p.188-193:2004.
53. IACOPINO, A.M. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair throught alteration of macrophage phenotype function. **Oral Dis.**, Houndmills, v.1:p.214-229;1995.
54. IACOPINO, A.M. Periodontitis and diabetes interrelationship: role of inflammation. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.6:p.125-137;2001.
55. In:MARBLE,A., KRALL,L.P., BRADLEY,R.F., CHRISTLIEB,A.R., SOELDNER,J.S.
56. JUNOD,A.,LAMBERT,A.E., ORCIL,L., PICTET,R., GONET,A.E., RENOLD,A.E., Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc. Soc. Exp. Biol.**,v.126;p.201-205:1967.

57. KARIKOSKI A, MURTOMAA H, ILANNE-PARIKKA P. Assessment of periodontal treatment needs among adults with diabetes in Finland. **Int Dent J.** v.52;p.75-80:2002.
58. KARJALAINEN KM, KNUUTTILA ML, VON DICKHOFF KJ. Association of the severity of periodontal disease with organ complications in type1 diabetic patients. **J Periodontol.** v.65;p.1067-1072:1994.
59. KARJALAINEN, K.M.; KNUUTTILA, M.L.E. The on-set of diabetes and poor metabolic control increase gingival bleeding in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Periodontal.**, v.23; p.1060-1067:1996.
60. KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.**, v.56;p.691-704: 1989.
61. KATO, T.; KUSAKARI, H.; HOSHINO, E. Bactericidal effecacy of carbon dioxide laser against bacteria-contaminated titanium implants and subsequent cellular adhesion to irradiated area. **Laser Surg. Med.**, v.23;p.299-309:1998.
62. KATZ A, EKBERG K, JOHANSSON BL, WAHREN J. Diminished skin blood flow in Type I diabetes: evidence for non-endothelium-dependent dysfunction. **Clin Sci** v.101;p.59-64:2001.
63. KAWAMURA T, EGUSA G, FUJIKAWA R, OKUBO M. Gln27Glu variant of the beta2-adrenergic receptor gene is not associated with obesity and diabetes in Japanese-Americans. **Metabolism.** v.50;p.443-6:2001.
64. KÖMERIK, N.; et al., Fluorescence biodistribution and photosensitizing activity of toluidina blue O on rat buccal mucosa. **Laser Med Sci.** v.17;p.86-92:2002.

65. KÖMERIK, N.; In vitro killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.47;p.932-940,2003.
66. LALLA, E. et al. Enhanced interaction of advanced glycation and products with their cellular receptor RAGE: implications for the pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. **Ann. Periodontol.**, v.3;p.13-19:1998.
67. LALLA, E. et al. Hyperglycemia, glycooxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. **Periodontol. 2000** v.23;p.50-62:2000.
68. LIMA, M. A.; THEODORO, L.H.; OKAMOTO, T.; MILANEZI, L. A.; GARCIA, V.G. A histologic assessment of the low level therapy associated with photosensitizing drug on impaired wound healing in rats. **Brazilian Dental Journal** v.15;p.113:2004.
69. LÖE, H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes Care.**, v.16;p.329-334:1993.
70. LÖE, H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diab Care*, apud DOXEY, D.L. et al. Diabetes prevent periodontitis-induced increased in gingival platelet-derived growth factor-B and interleukin 1-beta in a rat model. **J.Periodontol.**, v.69;p.113-119:1998.
71. LOPES JR. Reparação de feridas de extração dental, infectadas, tratadas com droga fotossensibilizadora associada ou não ao laser de baixa intensidade. Araçatuba, 2000. 98p. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Cirurgia e Traumatologia Buço-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Araçatuba.

72. LU H, KRAUT D, GERSTENFELD LC, GRAVES DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. **Endocrinology**. v.144;p.346-52:2003.
73. LUKENS,F.D.W. Alloxan diabetes. **Physiol. Rev**. v.28;p.304-330:1948.
74. MAIORANA, C., SALINA, S., SANTORO, F. Treatment of periimplantitis with diode laser: A clinical report. **J. Oral Laser Applications**, v.2;p.121-127:2002.
75. MATEVSKI, D.; et al., Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp *in vitro*. **J. Periodont. Res.**, v. 38;p.428-435:2003.
76. MATTSON JS, CERUTIS DR. Diabetes mellitus: a review of the literature and dental implications. *Compend Contin Educ Dent*. v.22;p.757-60:2001.
77. McMILLAN, M.D. Oral changes following tooth extraction in normal and alloxan diabetics rats. Part I: macroscopic observations. **N.Z. Dent. J.**, v.66;p.239-247:1970.
78. MEALEY BL, OCAMPO GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. **Periodontol 2000** v.44;p.127-153:2007.
79. MERING,J.V., MINKOWSKI,O. Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. **Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.**, v.26;p.371-387:1889.
80. MESTER, E., et. al., The stimulating effect of low power laser rays on biological systems. **Laser Rev.**, v.1;p.3:1968.
81. NAGY S, REDEI A, KARADY S. Studies on granulation tissue production in alloxan-diabetic rats. **J Endocrinol**. v.22;p.143-146:1961.
82. NAVRATIL, L.; KYMPLOVA, J. Contraindications in noninvasive laser therapy: truth and fiction. **J Clin Laser Med Surg**. v.20;p.341-343:2002.

83. Negishi J, Kawanami M, Terada Y, Matsushashi C, Ogami E, Iwasaka K, Hongo T. Effect of lifestyle on periodontal disease status in diabetic patients. **J Int Acad Periodontol.** v.6;p.120-4:2004.
84. NISHIGAKI A. Experimental studies of skin wound healing process by first intention in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. **Shikwa Gakuho.** v.89;p.793-822:1989.
85. NISHIMURA, F. et al. Glucose-mediated alteration of cellular function in human periodontal ligament cells. **J. Dent. Res.** v.75;p.1664-1671:1996.
86. NISHIMURA, F. et al. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. **Ann. Periodontol.**, v.3;p.20-29:1998.
87. NUSSBAUM, E.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of 630, 660, 810 and 905 nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria *in vitro*. **J. Clin Laser Med Surg** v 20; p.325-333:2002.
88. NUSSBAUM, E.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of 630, 660, 810 and 905 nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria *in vitro*. **J. Clin Laser Med Surg** v. 20; p.325-333:2002.
89. OHGI, S.; JOHNSON, P.W. Glucose modulates growth of gingival fibroblasts and periodontal ligaments cells: correlation with expression of basic fibroblast growth factor. **J.Periodontol Res.** v.31;p.579-588:1996.
90. OLIVEIRA RR, SCHWARTZ-FILHO HO, NOVAES JR AB, TABA JR M. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: A preliminary randomized controlled clinical study. **J Periodontol** v.78;p.965-973:2007.
91. OPIE(1901) apud CAHILL JR.,G.F. Current concepts of diabetes.

92. ORBAK R, TEZEL A, CANAKÇI V, DEMIR T. The influence of smoking and non-insulin-dependent diabetes mellitus on periodontal disease. **J Int Med Res.** v.30;p.116-125:2002.
93. OTTLECZ A, KOLTAI M, DEKOV E. Effect of insulin and alloxan diabetes on carrageenin inflammation in rats. **Int Arch Allergy Appl Immunol.** v.50;p.548-554:1976.
94. PINSON M, HOFFMAN WH, GARNICK JJ, LITAKER MS. Periodontal disease and type I diabetes mellitus in children and adolescents. **J Clin Periodontol.** v.22;p.118-23:1995.
95. PRATES RA, YAMADA JR AM, SUZUKI LC et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *actinobacillus actinomycetemcomitans* **J Photom Photob B;** v.86;p.70-76:2007.
96. Ritchie CS. Obesity and periodontal disease. **Periodontol 2000;** v.44;p.154-63, 2007.
97. ROONEY, J.; MIDDA, M.; LEEMING, J. A laboratory investigation of the bactericidal effect of a NdYAG laser. **Br. Dent. J.**, v.176.p.61-4,1994.
98. ROSENBERG CS. Wound healing in the patient with diabetes mellitus. **Nurs Clin North Am;** v.25:p.247-61,1990.
99. ROSENTHAL S, LERNER B, DIBIASE F, ENQUIST IF. Relation of strength to composition in diabetic wounds. **Surg Gynecol Obstet.** v.115;p.437-442:1962.
100. RYDEN, H. et al. Effect of low levelenergy laser irradiation on gingival inflammation. **Swed. Dent. J.**, v.18;p.35-41:1994.
101. SALVI GE, YALDA B, COLLINS JG, JONES BH, SMITH FW, ARNOLD RR, OFFENBACHER S. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus patients. **J Periodontol.** v.68;p.127-35:1997.

102. SALVI, G. E.; BECK, J.D.; OFFENBACHER, S. PGE², IL-1 and TNF- α , Responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. **Ann. Periodontol.**, Copenhagen, v.3;p.40-50:1998.
103. SANTANA RB, XU L, CHASE HB, AMAR S, GRAVES DT, TRACKMAN PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. **Diabetes**. v.52;1502-1510:2003.
104. SCHNEIR M, BOWERSOX J, RAMAMURTHY N, YAVELow J, MURRAY J, EDLIN-FOLZ E, GOLUB L. Response of rat connective tissues to streptozotocin-diabetes. Tissue-specific effects on collagen metabolism. **Biochim Biophys Acta**. v.19;p.95-102:1979.
105. SEPÄLÄ, B. et al. Morphometric analysis of cellular and vascular changes in gingival connective tissue in long-term insulin-dependent diabetes. **J. Periodontol.**, v.68;p.1237-1245:1997.
106. SHIBLI JA, MARTINS MC, RIBEIRO FS, GARCIA VG, NOCITI FH JR, MARCANTONIO E Jr. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. **Clin Oral Implants Res** v.17;p.273-281:2006.
107. SHIBLI, J. A.; et al., Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. **J. Oral Science**1, p. 17-23:2003.
108. SHIBLI, J.A.; et al., Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: A preliminary histologic study in dogs. **J. Periodontol.**, v.74;p.338-345:2003.

109. SHYNG YC, DEVLIN H, SLOAN P. The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v.30;p.70-4:2001.
110. SIGUSCH BW, PFITZNER A, ALBRECHT V, GLOCKMANN E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. **J Periodontol** v.76;p.1100-1105:2006.
111. SILVA NETO, U.T. Efeito da terapia fotodinâmica no processo de reparação de feridas cutâneas provocadas em ratos diabéticos: estudo morfométrico e histológico. Marília, 2004. 115p. Dissertação (Mestrado em Clínicas Odontológicas) – Faculdade de Ciências Odontológicas, Universidade de Marília.
112. SLUZHAEV, I.F.; KUZAKOVA, G.M. The effect of helium-neon laser light on the degree of dental caries in children on a outpatient register. **Stomatologia**, v.68,p.58-60:1989.
113. SMITH, Q. T.; GEEGAN, S. J. Repeated measurement of cervicular fluid parameters at different sites. **J. Clin. Periodont.**, v. 18;p.171-176:1991.
114. SOSKOLNE WA, KLINGER A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. **Ann Periodontol.** v.6(1):p.91-98:2001.
115. SPADELLA,C.T. **Avaliação funcional do transplante pancreato-duodenal no rato diabético: estudo clínico, laboratorial, anátomo-patológico e Imunohistoquímico.** Botucatu,1989. 221p. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.
116. SPANHEIMER,R,G., UMPIERREZ,G.E., STUMPF,V. Decreased collagen production in diabetic rats. **Diabetes**, v.37;p.371-46:1988.

117. TATEVOSSIAN, A.; GOULD, C. T. The composition of the aqueous phase in human dental plaque. **Arch. Oral. Biol.**, v.21,p.319-323:1976.
118. TAYLOR R, DAVIES R, FOX C, SAMPSON M, WEAVER JU, WOOD L. Appropriate insulin regimes for type 2 diabetes: a multicenter randomized crossover study. **Diabetes Care.**v.23;p.1612-8:2000.
119. TAYLOR, G. W. et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. **J. Periodontol.** v.69; p.76-83:1998.
120. TEICHERT, M. C.; et al.; Treatment of oral candidiasis with methylene blue mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.93; p.155-160:2002.
121. TOMITA NE, CHINELLATO LE, PERNAMBUCO RA, LAURIS JR, FRANCO LJ. Periodontal conditions and diabetes mellitus in the Japanese-Brazilian population. **Rev Saude Publica.** v.36;p.607-613:2002.
122. TYNDALL WA, BEAM HA, ZARRO C, O'CONNOR JP, LIN SS. Decreased platelet derived growth factor expression during fracture healing in diabetic animals. **Clin Orthop Relat Res.** v.408;p.319-330:2003.
123. USACHEVA, M.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidina blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers Surg. Med.**, v.29;p.165-173:2001.
124. WILSON, M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. **Int. Dent. J.**, v.44;p.181-189:1994.
125. WILSON, M. et al., Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. App. Bacteriol.**, v.78;p. 569-574,1995.

126. WILSON, M.; MIA, N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **J. Oral Pathol. Med.**, v.22;p.354-357:1993.
127. YALDA B, OFFENBACHER S, COLLINS JG. Diabetes as a modifier of periodontal disease expression. **Periodontol 2000**. v.6;p.37-49:1994.
128. YAMADA JR AM. Effects of photodynamic therapy in periodontitis induced in rats (in Portuguese).[Thesis]. São Paulo,SP: Institute of Energetic and Nuclear Research;2007.87p.
129. YILMAZ, S. et al., Effect of Gallium Arsenide Diode Laser on human periodontal disease: a microbical and clinical study, **Lasers Surg. Med.** v.60;p.60-66:2002.
130. YOON,J.W., AUSTIN,M., ONODERA,T., NOTKINS,A.L. Vírus-induced diabetes mellitus. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. **N. Engl. J. Med.**, v.300;p.1173-117:1979.
131. ZAMBON, J.J. et al. Microbiological and immunological studies of adults periodontitis in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Periodontol.**, v.59;p.23-31:1988.