

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
unesp 

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

Valmir Campos Macarimi

**Ação do laser em baixa intensidade
no tratamento da doença periodontal
induzida em ratos diabéticos e não
diabéticos : estudo histológico e
histométrico**

**ARAÇATUBA
2008**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

Valmir Campos Macarimi

**Ação do laser em baixa intensidade
no tratamento da doença periodontal
induzida em ratos diabéticos e não
diabéticos : estudo histológico e
histométrico**

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

Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

ARAÇATUBA
2008

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

- M115a Macarimi, Valmir Campos
Ação do laser em baixa intensidade no tratamento da doença periodontal induzida em ratos diabéticos e não diabéticos : estudo histológico e histométrico / Valmir Campos Macarimi. - Araçatuba : [s.n.], 2007
103 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. Lasers 2. Doenças periodontais 3. Diabetes mellitus

Black D6
CDD 617.63

Dados Curriculares

Nascimento: 10 de Abril 1958 – Presidente Prudente – SP

Filiação: Agenor Macarimi
Maria Aparecida Campos Macarimi

1977/1980: Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente.

1982/1983: Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de
Especialização. Faculdade de Odontologia de Bauru
FOB-USP

1984/1985: Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de
Especialização. Faculdade de Odontologia de Bauru
FOB-USP

2003/2004: Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de
Mestrado- Faculdade de Odontologia de Araçatuba
FOA-UNESP

2005/2007: Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de
Doutorado-Faculdade de Odontologia de Araçatuba
FOA-UNESP

Dedicatória

À minha esposa Maria Angélica (minha mulher).

Tua beleza me envolve e me aquece.

Obrigado por estar comigo todos esses anos

Obrigado por existir.

Me basto em ti.

***Às minhas filhas Maria Flávia e
Maria Júlia por me trazerem a
beleza da paternidade e do
amor incondicional.***

Aos meus pais Agenor e Cida.

Teus cuidados comigo não terão sido em vão.

***Não só de alimento e carinho me cobriram,
mas também me ensinaram a honestidade e a
força para o trabalho.***

À minha avó "Pina"

Que lutou a vida toda pelos filhos.

***Aos meus irmãos Vagner "in memoriam", Vanda,
Marcos, Márcio e Valéria.***

***Estaremos sempre descalços um para o outro,
Eterna infância.***

***Estaremos sempre belos um para o outro.
Eterna adolescência.***

***Estaremos sempre sábios um para outro.
Eterna juventude.***

"In Memoriam"

Ao meu sogro e sogra Alcides e Terezinha.

Sempre estiveram muito próximos enquanto existiram,

Nunca mediram amor, nunca mediram carinho.

À minha avó Elvira.

Uma intelectual analfabeta

***Concebida na Itália, nascida na Argentina e criada
no Brasil. Me ensinou o caminho da sensibilidade às
belezas da vida e do ser humano.***

Aos meus avós Artur e Isaltino.

Sempre presentes enquanto viveram

Ao Altíssimo.

***Que mantém aceso
o fogo da paixão
e da esperança***

Agradecimentos especiais

Professor Dr. Valdir Gouveia Garcia
Orientador

Dei-lhe menos do muito que me ofereceste.

***A admiração é um sentimento, como tantos, abstrato,
que converteste em real sensação.***

Como é belo o ser humano! Me ensinaste isso também.

***Meu eterno obrigado! Vou levar para meus filhos o teu
exemplo de amor e honestidade com a ciência e o próximo***

Professor Dr. Álvaro Francisco Bosco

Mais do que fervorosos discípulos,

mais que ardentes admiradores,

Tentamos pisar pedra por pedra do seu caminho.

Caminho que percorro dia após dia.

Caminho que percorro com orgulho da sua amizade.

Acredite! Me pergunto sempre, diante de obstáculos

pessoais e profissionais: O que o Álvaro faria?

À Professora Doutora Maria José H. Nagata

Meu muito obrigado e minha admiração.

Teu esforço em levar um grupo ao alto

não terá sido em vão.

Meus olhos puderam ver com que tenacidade

e preocupação se envolvia com o trabalho de seus alunos

na pós-graduação.

Minha eterna gratidão.

***À Professora Doutora Letícia Helena Theodoro
Co-orientadora***

***O carinho e a alegria com que acolhe seus orientados
e co-orientados serão sempre lembrados por mim.
Você é das pessoas fundamentais na realização de
projetos. Da polimento e brilho a eles.
Obrigado pelo acolhimento e os cuidados com meu
trabalho.***

Dr. Juliano Milanezi de Almeida (JU)

Alguns poucos fazem mais do que é preciso.

Alguns poucos fazem mais do que são obrigados.

Alguns poucos fazem a história.

Meu muito obrigado, Juliano!

Pelo desprendimento em me ajudar a chegar até o fim.

Tus passos são largos e firmes, e por ser tão mais velho,

posso vislumbrar teu futuro profissional e

pessoal de muito amor e sucesso

***Às amigas e colegas Samara Bonfante (Sami)
e Danielle Shima Luize (Dani)***

A amizade é o melhor dos propósitos.

A amizade é o melhor dos desígnios.

***A amizade é brindar o silêncio ou a algazarra
dos nossos encontros de trabalho.***

Obrigado pelo sorriso e pelo carinho desses anos.

***A felicidade de vocês será sempre muito importante e
especial para mim.***

Agradecimentos

À direção da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-UNESP, nas pessoas 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, nas pessoas 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, pelo incentivo e empenho no desenvolvimento do curso de Pós-Graduação.

À ex-coordenação do curso de Pós-Graduação em Odontologia na pessoa do Professor Dr. Wilson Roberto Poi pela disposição em dar suporte nos momentos difíceis e desenvolver novos parâmetros no ensino e na valorização da pós-graduação

Aos dedicados professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba pelos ensinamentos que proporcionaram durante o curso.

Ao amigo e Professor Valdir Gouveia Garcia, minha gratidão eterna pela orientação, amizade, paciência e, sobretudo, pela confiança em mim depositada. Seus exemplos de humildade e seu apreço pelo ser humano e pela pesquisa, mais do que comoventes, serão objeto de reflexão por toda minha vida.

Ao amigo e Professor Alvaro Francisco Bosco, pela distinção pessoal e profissional com que sempre me acolheu. Minhas palavras não seriam capazes de dimensionar sua importância para toda uma geração de periodontistas e, pessoalmente, para mim.

À Professora e amiga Maria José Hitomi Nagata, meu reconhecimento pela nobreza das suas palavras de ensinamento, disciplina e incentivo.

À amiga e Professora Doutora Letícia Helena Theodoro, co-orientadora, pelos cuidados e carinho que teve com meu trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente-UNOESTE, na pessoa da Digníssima Diretora e amiga Dr^a Claudia de Oliveira Lima Coelho pelo apoio e pela franquia das instalações da Faculdade, além das palavras de incentivo e simpatia.

Ao Professor Luiz Fernando Nogueira, Titular da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente pela amizade desses anos e o acolhimento que me recebeu na disciplina de Periodontia da FOPP-UNOESTE.

À Professora Rosalinda Venturin pela amizade de tantos anos e pelas palavras de incentivo.

A todos os professores da Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente-UNOESTE pela amizade, cordialidade e incentivo.

Ao professor Dr. Tetuo Okamoto pelos ensinamentos e seu incansável amor pela pesquisa

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Milanezi, grande formador de profissionais, pesquisadores e de professores, que me honrou com sua amizade e sinceras palavras de estímulo.

A Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende, meus especiais agradecimentos pela amizade de muitos anos, companheirismo e ensinamentos.

Ao Prof. Dr e grande amigo Celso Kendji Nishiyama, pela fraternidade da sua amizade pessoal e científica de tantos anos.

Ao Dr. Haroldo Lima de Castro, que, por muito tempo, tem sido o amigo, o professor e companheiro de profissão, oferecendo segurança e coleguismo à difícil carreira da odontologia.

Ao Prof. Dr Acir Lima de Castro, por ter me ensinado, desde o início da minha formação profissional, os valores da observação e da sensibilidade no diagnóstico.

Ao Prof. Dr José Humberto Damante, por me ajudar a compreender a grandeza e a responsabilidade da nossa profissão.

Ao Prof. Dr. Mario Eduardo Algodoal Ferreira Alves, por me iniciar na arte da Periodontia com amor ao ensino e dedicação.

Ao Prof. Dr. Sebastião Jorge Chammé, “in memoriam”, que, enquanto viveu, auxiliou-me sobremaneira nas disciplinas básicas de metodologia do ensino e da pesquisa, tão importante no meu Mestrado, além de ter sido grande amigo e incentivador constante.

Ao Odair, funcionário do Departamento de Periodontia, amigo sempre presente nos trabalhos experimentais.

A todos os funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

A todos os funcionários da Biblioteca da Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” Campus de Araçatuba.

Aos funcionários da secção de Pós-Graduação, Marina, Valéria e Diogo por estarem sempre dispostos a ajudar com simpatia e empenho.

Aos funcionários do Biotério, Camilo e João pelo empenho nos nossos trabalhos.

Aos meus grandes e fraternos amigos Samara, Danielle, Ana Cristina, Flávia, Luciana, Juliano, Tatiana, Thiago e Leandro. Meus mais sinceros agradecimentos pela simpatia e esforço nos trabalhos experimentais.

Aos colegas do curso de Mestrado e Doutorado em Periodontia, Guto, Alex, Sérgio, Michel e Mychele, pela amizade e convivência.

Ao Sr. Amilson e Gérson, coordenadores do Biotério da UNOESTE, sempre solícitos e dispostos a ajudar.

À Graciele e a Ligia pela força durante os experimentos laboratoriais e por me iniciarem na carreira de orientador

À Dayara e Michele, minhas dedicadas auxiliares no consultório.

À professora Arlene pela revisão do abstract.

Aos meus amigos verdadeiros, que sempre me apoiaram e me ajudaram com muito incentivo.

Àqueles traídos por minha injusta e negligente memória, minhas desculpas e meus agradecimentos.

Lista de Figuras

Figura 1: Protocolo e Cronograma Experimental.	77
Figura 2: Fotomicrografia ilustrando a área de furca dos animais não diabéticos (a); e diabéticos (b) sem a indução da doença periodontal experimental. (Tricrômico de Masson, magnificação original 24x do original).	78
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 B, tratamento I (RAR) 30 dias; (c) Grupo A, tratamento II (LLLT) 30 dias; (d) Grupo B, tratamento II (LLLT) 30 dias; (Coloração de Tricrômico de Masson, magnificação original 12,5x).	79
Figura 4 - Aplicação endovenosa da aloxano (42 mg/ml) -----	82
Figura 5 - Coleta e monitoramento sanguíneo. -----	82
Figura 6 - Hemostasia. -----	82

Figura 7 - Kit Kit Accu-CHEK® Advantage. -----	82
Figura 8 - Registro do nível glicêmico. -----	82
Figura 9 - Animal posicionado na mesa operatória. -----	83
Figura 10 - Pinça modificada utilizada na passagem do fio. -----	83
Figura 11 - Posicionamento do fio. -----	83
Figura 12 - Ligadura posicionada. -----	83
Figura 13 - Doença Periodontal após 7 dias de indução - Ratos não-Diabéticos. ---	83
Figura 14 - Doença Periodontal após 7 dias de indução - Ratos Diabéticos. -----	83
Figura 15 - Cureta de Gracey mine-five 13-14. -----	83
Figura 16 - Raspagem e Alisamento Radicular. -----	83
Figura 17 - Aplicação do Laser. . -----	84
Figura 18- Unidade Laser GaAlAs; Laser Bio Wave LLLT; Kondortech Equipamentos. -----	84
Figura 19 - Rato não diabético – Ausência de catarata. -----	85
Figura 20 - Rato diabético – Presença de catarata. -----	85

- Figura 21** - Tamanho dos animais de mesma idade no final do experimento. (A) Rato diabético; (B) Rato não diabético. ----- 85
- Figura 22** - Alterações Vasculares. (A) Rato diabético; (B) Rato não diabético. 85
- Figura 23** - (A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupo 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). 86
- Figura 24** - (A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupo 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). 87
- Figura 25** - (A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupo A e Tratamento II (LLLT), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); (B) Área de tecido conjuntivo organizado, ausência de infiltrado inflamatório e de reabsorções ósseas evidentes. (H.E. magnificação original 25x). 88
- Figura 26** - (A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupo A e Tratamento II (LLLT), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); (B) Área de tecido conjuntivo organizado, ausência de infiltrado inflamatório e de reabsorções ósseas evidentes. (H.E. magnificação original 25x). 89

12,5x); **(B)** Área de tecido conjuntivo organizado, ausência de infiltrado inflamatório e de reabsorções ósseas evidentes. (H.E. magnificação original 25x).

Lista de Tabelas

Tabela 1. Médias e Desvio padrão ($M \pm DP$) dos níveis glicêmicos (mg/dl) nos animais não-diabéticos e diabéticos nos diferentes grupos e períodos experimentais.	73
Tabela 2. Média e Desvio padrão ($M \pm DP$) dos dados histométricos da área do ligamento periodontal (mm^2) 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).	74
Tabela 3. Médias e desvio padrão ($M \pm DP$) dos dados histométricos (mm^2) da perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental induzida, de acordo com cada grupo, tratamento e período – Análise intra-grupo.	75
Tabela 4. Médias e desvio padrão ($M \pm DP$) dos dados histométricos (mm^2) da perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental induzida, de acordo com cada grupo, tratamento e período – Análise inter-grupos.	76
Tabela 5. Peso Médio e desvio padrão ($M \pm DP$) dos animais Diabéticos e não-diabéticos e Desvio padrão nos diferentes grupos e períodos experimentais.	86

Lista de Abreviaturas

RAR - Raspagem e alisamento radicular

DP- Doença Periodontal

SS- Solução salina

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

AsGaAl- Arseneto de Gálio e Alumínio

nm- Nanômetro: Bilionésima parte do metro (10^{-9} metros).

µg - Microgramas, equivalente a um milhão de vezes menor que o grama.

µg/mL- Microgramas por mililitros.

ATP- Adenosina Trifosfato.

DNA- Ácido desoxirribonucleico.

HE - Expressa a técnica de coloração das lâminas. Hematoxilina e eosina.

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

J- Joule: Uma unidade de energia.

Kg - Unidade fundamental de medida de massa.

Laser AsGaAl - Laser de Arseneto-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.

mg - Miligramas, equivalente à milésima parte do grama.

mg/Kg- Miligramas por quilo.

Mj - Milijoule: Joule dividido por 1000, a abreviatura é mJ.

mL- Mililitros, equivalente à milésima parte do litro.

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

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

Lista de Anexos

Anexo 1: Comitê de ética.-----	81
Anexo 2: Indução do diabetes melittus e controle glicêmico (ilustração).-----	82
Anexo 3: Indução da Doença Periodontal e Tratamento.-----	83
Anexo 4: Aplicação do Laser-----	84
Anexo 5: Aspectos Clínicos dos animais diabéticos e não diabéticos-----	85
Anexo 6: Tabela demonstrativa do Peso Médio e desvio padrão ($M \pm DP$) dos animais Diabéticos e não-diabéticos e Desvio padrão nos diferentes grupos e períodos experimentais.-----	86
Anexo 7: Fotomicrografias ilustrando a área de perda óssea na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos (grupos A e B)- Tratamentos I e II nos períodos de 7,15 e 30 dias(H.E. magnificação original 12,5x e 25x)-----	87
Anexo 8: Instructions of Author Journal of Peridontology).-----	91

Macarimi VC. Ação do Laser em Baixa Intensidade como Coadjuvante no Tratamento da Doença Periodontal Induzida em Ratos Diabéticos ou Não Diabéticos: estudo histológico e histométrico. [tese]. Araçatuba: UNESP – Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho; 2007.

R E S U M O

Resumo

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar histológica e histometricamente a ação do Laser em baixa intensidade (LLLT) como coadjuvante ao tratamento da doença periodontal induzida em animais diabéticos e não diabéticos.

Métodos: Foram utilizados 120 ratos divididos em 2 grupos: Grupo A: 60 animais não-diabéticos e Grupo B: 60 animais diabéticos induzidos pela aloxana à 2% (42 mg/Kg). Nos animais de ambos os Grupos a doença periodontal (DP) foi induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Após 7 dias de evolução da DP, em todos os animais dos Grupos A e B a ligadura foi removida e 30 animais de cada grupo foram submetidos aos seguintes tratamentos: tratamento I (RAR) – raspagem e alisamento radicular e irrigação com 1 ml de solução salina (SS); Tratamento II (LLLT) - RAR + SS seguido da irradiação com laser em baixa intensidade (LLLT). A irradiação laser foi realizada (AsGaAl, 660 nm) em 3 pontos equidistantes na face vestibular e 3 pontos equidistantes na lingual. Cada ponto recebeu uma energia de 4 J. Dez animais de cada grupo experimental foram sacrificados nos períodos de 7, 15 e 30 dias para a análise histológica e histométrica. Os dados histométricos da perda óssea foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$).

Resultados: As áreas de furca tratadas com LLLT nos grupos A e B apresentaram tecido conjuntivo organizado com trabéculas ósseas em toda extensão da furca. Nas áreas tratadas com RAR em ambos os grupos o tecido conjuntivo apresentava-se desorganizado com intenso infiltrado inflamatório e áreas de reabsorções ósseas e cementárias. Histometricamente aos 7, 15 e 30 dias o tratamento RAR nos grupos A ($1,11 \pm 0,11$; $0,84 \pm 0,12$; $0,97 \pm 0,13$) e B ($2,27 \pm 0,47$; $3,23 \pm 0,34$; $2,82 \pm 0,75$) promoveu maior perda óssea ($p < 0,05$) na região de furca quando comparado ao tratamento LLLT nos grupos A ($0,33 \pm 0,05$; $0,35 \pm 0,06$; $0,27 \pm 0,07$) e B ($0,37 \pm 0,05$; $0,35 \pm 0,02$; $0,37 \pm 0,02$). A perda óssea alveolar foi significativamente maior no grupo B tratado com RAR quando comparado ao grupo A tratado com RAR. Não houve diferenças significantes entre os espécimes dos grupos A e B que receberam o tratamento com LLLT.

Conclusão: O LLLT mostrou-se efetivo como coadjuvante ao tratamento convencional de RAR na doença periodontal nos animais diabéticos e não diabéticos.

Palavras chaves: Doença Periodontal, Diabetes, Tratamento periodontal, Laser.

Macarimi VC, Influence of the Low Level Intensity Laser as an adjuvant therapy in the periodontal disease ligature-induced in diabetic and non-diabetic rats: Histometric and Histological study:[thesis].Araçatuba: UNESP-São Paulo State University; 2007.

ABSTRACT

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

One hundred and twenty rats were assigned to 2 groups as follows: Group A: Sixty non-diabetic rats and Group B: Sixty diabetic animals kept on alloxan-diabetic induction for 7 days(42 mg/ml). In both groups, the periodontal disease (PD) was induced at the first left side mandibular molar. Seven days after the establishment of PD, ligatures were removed from all animals of both groups. Afterwards, 30 animals of each group were submitted following protocol treatments: I (SRP)- SRP and irrigation with saline solution (1mL)(SS). II (SRP+LLLT)- SRP, irrigation with 1 mL with SS plus Low-level laser therapy (LLLT). The LLLT GaAlAs (4 J/cm^2) was performed in 3 equidistant points at each bucal and lingual aspect of the first mandibular molar. Each point received 4 J of energy. Ten animals in each experimental treatment group were sacrificed at 7th, 15th and 30th day of the experiment in order to provide histologic and histometric analyses ($p<0,05$).

Results:

The furcations areas treated with LLLT in Groups A and B showed well-organized connective tissue (CT) and bone trabeculae presence in all extension of the furcation. In animals treated with SRP, in both groups, the CT was poorly organized with intense inflammatory infiltrate and areas with bone and cement reabsorption. Histometrically, at the 7th, 15th and 30th day of SRP treatment, the animals of groups A ($1,11\pm0,11$; $0,84\pm0,12$; $0,97\pm0,13$) and B ($2,27\pm0,47$; $3,23\pm0,34$; $2,82\pm0,75$) developed significative bone loss ($p<0,05$) at the furcation area compared with LLLT treatment in group A ($0,33\pm0,05$; $0,35\pm0,06$; $0,27\pm0,07$) and B ($0,37\pm0,05$; $0,35\pm0,02$; $0,37\pm0,02$). The alveolar bone loss was especially higher in group B treated with SRP than in group A treated with SRP. There were not any expressive differences among groups A and B specimens submitted to LLLT treatment. The LLLT showed to be effective as a adjuvant treatment on the conventional treatment SRP in periodontal disease experimentally induced in diabetic and non-diabetic animals.

Key words: Periodontal disease, Diabetes, Periodontal treatment, Laser.

Sumário

1 - INTRODUÇÃO -----	48
2 - PROPOSIÇÃO-----	50
3 - MATERIAL E MÉTODO-----	51
4 - RESULTADOS-----	56
5 - DISCUSSÃO-----	59
6 - CONCLUSÃO-----	64
REFERÊNCIAS -----	65
ANEXOS-----	80

Título: Ação do Laser em Baixa Intensidade como Coadjuvante no Tratamento da Doença Periodontal Induzida em Ratos Diabéticos ou Não Diabéticos: estudo histológico e histométrico.

Valmir Campos Macarimi, Cirurgião-Dentista, Mestre¹

Valdir Gouveia Garcia, Cirurgião-Dentista, Doutor¹

¹ Disciplina de Periodontia, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Brasil.

Título resumido (“Running title”): Laser de baixa intensidade na reparação periodontal de ratos diabéticos.

Autor correspondente:

Valdir Gouveia Garcia

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP)

Rua José Bonifácio, 1193, Centro

CEP: 16015-050 - Araçatuba, SP, Brasil

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

Número de Figuras: 3

Número de Tabelas: 4

Palavras-chave: Doença Periodontal, Diabetes, Tratamento periodontal, Laser.

Resumo

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar histológica e histometricamente a ação do Laser em baixa intensidade (LLLT) como coadjuvante ao tratamento da doença periodontal induzida em animais diabéticos e não diabéticos.

Métodos: Foram utilizados 120 ratos divididos em 2 grupos: Grupo A: 60 animais não-diabéticos e Grupo B: 60 animais diabéticos induzidos pela aloxana (42 mg/Kg). Nos animais de ambos os Grupos a doença periodontal (DP) foi induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Após 7 dias de evolução da DP, em todos os animais dos Grupos A e B a ligadura foi removida, 30 animais de cada grupo foram submetidos aos seguintes tratamentos: tratamento I (RAR) – raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação com 1 ml de solução salina (SS); Tratamento II (LLLT) - RAR + SS seguido da irradiação com LLLT. A irradiação com laser (AsGaAl, 660 nm) foi realizada em 3 pontos equidistantes na face vestibular e 3 pontos equidistantes na lingual. Cada ponto recebeu uma energia de 4 J. Dez animais de cada grupo experimental foram sacrificados nos períodos de 7, 15 e 30 dias para a análise histológica e histométrica. Os dados histométricos da perda óssea foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$).

Resultados: As áreas de furca tratadas com LLLT nos grupos A e B, apresentaram tecido conjuntivo organizado com trabéculas ósseas em toda extensão da furca. Nas áreas tratadas com RAR em ambos os grupos o tecido conjuntivo apresentava-se desorganizado com intenso infiltrado inflamatório e áreas de reabsorções ósseas e cementárias. Histometricamente aos 7, 15 e 30 dias o tratamento RAR nos grupos A ($1,11 \pm 0,11$; $0,84 \pm 0,12$; $0,97 \pm 0,13$) e B ($2,27 \pm 0,47$; $3,23 \pm 0,34$; $2,82 \pm 0,75$) promoveu maior perda óssea ($p < 0,05$) na região de furca quando comparado ao tratamento LLLT nos grupos A ($0,33 \pm 0,05$; $0,35 \pm 0,06$; $0,27 \pm 0,07$) e B ($0,37 \pm 0,05$; $0,35 \pm 0,02$; $0,37 \pm 0,02$). A perda óssea alveolar foi significativamente maior no grupo B tratado com RAR quando comparado ao grupo A tratado com RAR. Não houve

diferenças significantes entre os espécimes dos grupos A e B que receberam o tratamento com LLLT.

Conclusão: O LLLT mostrou-se efetivo como coadjuvante ao tratamento convencional, de RAR na doença periodontal nos animais diabéticos e não diabéticos.

Palavras-chave: Doença Periodontal, Diabetes, Tratamento periodontal, Laser.

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Segundo relatos encontrados na literatura, 150 milhões de indivíduos ao redor do mundo são portadores desta enfermidade, podendo atingir o expressivo número de 300 milhões até o ano de 2025.¹

A presença do DM não controlado, à longo prazo, pode provocar danos, disfunções e falências em vários órgãos, como rins, olhos, nervos, coração, vasos sanguíneos além da doença periodontal, que apresenta-se como a sexta complicação.²

A periodontite é uma doença inflamatória que resulta na desorganização e degradação dos tecidos periodontais. Esta doença multifatorial afeta aproximadamente 30 a 50% da população adulta e está associada a fatores locais e sistêmicos.³ Componentes da microbiota periodontal, em especial as bactérias anaeróbicas Gram-negativas, podem causar danos diretos e indiretos ao periodonto por ativarem uma variedade de resposta no hospedeiro que resultará em destruição do tecido conjuntivo e ósseo.⁴

Os fatores de risco para a doença periodontal incluem fator genético,⁵ cigarro⁶ e diabetes mellitus não controlado.⁷ 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.⁸ Embora, o mecanismo pelo qual a hiperglicemia pode induzir a alteração periodontal não esteja totalmente elucidado,⁹ 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 collagenase 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).^{10,11} Estes mecanismos podem levar a uma diminuição da resistência do hospedeiro à infecção, prejuízo na cicatrização e exagerada resposta inflamatória,² 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, o que leva o profissional à utilização de terapias complementares para compensar 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. Dentre estas inclui-se o uso de antibióticos, sendo o mais utilizado os derivados da tetraciclina,¹² administrados local¹³ ou sistemicamente.¹⁴

O LLLT têm sido utilizado como terapia alternativa no reparo tecidual desde o trabalho pioneiro de Mester et al.¹⁵ Vários estudos demonstraram que o LLLT promove aceleração da reparação de feridas cutâneas em condições de normalidade ou retardadas como no diabetes.^{16,17} Promove também a aceleração da reparação óssea¹⁸ e têm-se mostrado efetivo in vitro na inibição de algumas bactéria,¹⁹ embora este fato não esteja ainda bem esclarecido. O LLLT é capaz de promover ainda aumento da proliferação celular,²⁰ aceleração da síntese de colágeno e formação precoce do tecido de granulação cicatricial.²¹ No tecido ósseo pode acelerar sua neo-formação, por promover aumento da atividade osteoblástica,²² aumento da vascularização,²³ organização das fibras colágenas²⁴ e aumento do nível de ATP.²⁵

Recentemente estudos em animais^{26,27,28} têm avaliado o efeito do LLLT sobre a evolução da doença periodontal, porém, raros²⁹ são os estudos que avaliaram o efeitos do LLLT associado à terapia periodontal convencional, na presença ou não de alterações sistêmicas. Diante destes fatos, **constituiu objetivo do presente estudo** avaliar, histológica e histometricamente a ação

do Laser em baixa intensidade (LLLT) como coadjuvante a RAR no tratamento da doença periodontal experimental induzida em ratos diabéticos e não diabéticos.

Material e Método

Animais

No presente estudo foram utilizados 120 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 pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia e Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Araçatuba (Protocolo 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=60) receberam por via endovenosa (veia caudal), dose única de Aloxana à 2%¹ na concentração de 42 mg/Kg do peso corpóreo. Os animais do Grupo A (n=60) 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. Após 7 dias da administração da Aloxana (Grupo B) foi comprovado o quadro diabético por meio de análise da taxa glicêmica, a qual foi monitorada por coleta de sangue via caudal dos animais durante os períodos

¹ Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

experimentais, antes da indução do diabetes, 7 dias após e nos períodos de sacrifício, utilizando o método de glicose-oxidase^{2,30}. 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 (nº 24), mantido em posição subgengival para induzir a doença periodontal experimental.³¹ O primeiro molar inferior contra-lateral dos animais 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. A seguir tanto os animais do Grupo A quanto os do Grupo B foram distribuídos em 2 subgrupos experimentais que receberam os seguintes tratamentos: Tratamento I (RAR): estes animais foram tratados com raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação com 1 ml de soro fisiológico; Tratamento II (LLLT): estes animais foram tratados com RAR, irrigação com 1 ml de soro fisiológico e a seguir, tratados com irradiação com laser em baixa intensidade (LLLT). A raspagem e alisamento radicular foi realizada com cureta mini-five 13-14.³ A solução de soro fisiológico foi depositada lentamente no interior da bolsa

² Accu-Chek Advantage system, Roche Diagnostics, Indianápolis, IN.

³ Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, USA.

periodontal, lentamente utilizando seringa (1 ml) e agulha de insulina (13 mm x 4,5 mm)⁴, sem bisel.

Tratamento com Laser (LLLT)

O laser em baixa intensidade empregado foi o de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)⁵ 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 J.

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).⁶ As mandíbulas foram removidas e fixadas em solução de formol neutro a 10% por um período mínimo de 48 horas.

Processamento Laboratorial

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

⁴ Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda, Curitiba, PR, Brasil.

⁵ AsGaAl; Laser Bio Wave LLLT; Kondortech Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil.

⁶ Cristália, Produtos químicos farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

Análise Histológica

Os cortes histológicos corados pela técnica de HE e TM foram analisados por microscopia de luz. Foi realizada descrição das características do tecido ósseo e do ligamento periodontal na região de furca dos primeiros molares inferiores com doença periodontal experimental e dos molares contra-laterais sem doença periodontal induzida.

Análise Histométrica

A área (mm^2) 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 eqüidistantes 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.³² 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 espécime foram medidos três vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes²⁸ 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.[#]

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

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

Glicemia

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 intra-grupos 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 ($p < 0,05$).

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. 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 perenização 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 detectada diferença estatística nos níveis glicêmicos entre os animais após administração da aloxana.(Tabela 1), confirmando o estado diabético nos animais do grupo B.

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 (Fig.2).

No Grupo A aos 7, 15 e 30 (Fig.3) dias, nos animais que receberam o tratamento I (RAR) foi observado um tecido conjuntivo com elevado número de neutrófilos polimorfonucleares em degeneração, tecido ósseo com áreas de reabsorção e pouca quantidade de trabéculas ósseas.

No Grupo B aos 7, 15 e 30 (Fig.3) 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.

Aos 7, 15 e 30) dias (Fig.3), nos Grupos A e B, nos animais que receberam o tratamento II (LLLT) notou-se ligamento periodontal íntegro organizado, com tecido conjuntivo bem desenvolvido e ausência de infiltrado inflamatório. As trabéculas ósseas apresentavam-se espessas e bem definidas em toda extensão da furca.

Análise Histométrica

Na comparação inter-grupo dos resultados histométricos, aos 7, 15 e 30 dias, 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 (Tabela 2)

Na análise dos resultados obtidos das medidas de perda óssea na região de furca, no grupo dos animais não-diabéticos (Grupo A) com indução da DP, foi detectada significativa perda óssea, em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$) entre os tratamentos I ($1,11 \pm 0,11 \text{ mm}^2$; $0,84 \pm 0,12 \text{ mm}^2$; $0,97 \pm 0,13 \text{ mm}^2$) e II ($0,33 \pm 0,05 \text{ mm}^2$; $0,35 \pm 0,06 \text{ mm}^2$; $0,27 \pm 0,07 \text{ mm}^2$) (Tabela 3).

Na análise dos resultados obtidos das medidas de perda óssea na região de furca no grupo dos animais diabéticos (Grupo B), houve significativa perda óssea, em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$), nas furcas que receberam o tratamento I ($2,27 \pm 0,47 \text{ mm}^2$; $3,23 \pm 0,34$

mm²; 2,82±0,75mm²), quando comparadas as que receberam o tratamento II (0,37±0,05 mm²; 0,35±0,02 mm² , 0,37±0,02 mm²) (Tabela 3).

Na comparação entre os tratamentos I e II nos animais diabéticos e não diabéticos observou-se em todos os períodos experimentais maior perda óssea nas furcas tratadas apenas com RAR (Tratamento I) nos animais diabéticos quando comparadas com o tratamento II (LLLT) nos grupos A e B e com o tratamento I no grupo A (não diabético) em todos os períodos experimentais (p<0,05).

Discussão

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

O método de indução da doença periodontal utilizado no presente estudo foi realizado através da adaptação de fio de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo,³¹ o qual mostrou-se eficiente na indução da doença periodontal experimental, utilizando-se o rato como modelo de estudo. Esta ligadura favoreceu a formação de placa bacteriana e o estabelecimento de uma resposta inflamatória. A doença periodontal estabelecida 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.

Por outro lado nas áreas de furca dos primeiros molares direitos, que não receberam ligadura, tanto os animais diabéticos quanto os não diabéticos, não mostraram evolução de doença periodontal, não diferindo entre si. Tal fato confirma a hipótese de que o diabetes não controlado modifica a DP na presença de bactérias, mas não é um agente primário da DP; justificando também, a importância do controle da placa bacteriana.

Neste estudo utilizou-se a aloxana, um potente agente diabetogênico, capaz de promover destruição seletiva das células β do pâncreas, reduzindo experimentalmente a secreção de insulina promovendo consequentemente níveis elevados de açúcar no sangue. Os resultados do presente estudo confirmam a ação diabetogênica da aloxana, face ao aumento nos níveis de glicose sanguínea nos ratos tratados com a aloxana, fato que corrobora os relatos de outros estudos.^{2,33}

Os resultados demonstraram ainda que nos animais diabéticos, as alterações periodontais na região de furca encontravam-se mais evidentes, caracterizadas por: maior perda óssea, desorganização do tecido conjuntivo com discreto número de fibroblastos e intenso infiltrado

inflamatório, detectados em todos os períodos experimentais quando comparado aos animais não diabéticos.

Estudos demonstraram que entre as complicações do diabetes e da doença periodontal a hiperatividade inata da resposta imune pode ser um antecedente insidioso para essas doenças, a qual provavelmente acarreta um efeito sinérgico quando ambas co-existem no hospedeiro.³⁴

Assim, os resultados do presente estudo são corroborados por achados de outros pesquisadores que atestaram que o estado de diabetes afeta todos os parâmetros periodontais incluindo sangramento a sondagem, profundidade de sondagem, perda de inserção clínica³⁵ e perda óssea alveolar.³⁶ Indivíduos com diabetes apresentam prejuízo no fluxo sanguíneo, na oxigenação tecidual, aumento na produção de radicais livres³⁷ e alteração na resposta aos lipopolissacarídeos. Estas modificações exacerbam a secreção de mediadores inflamatórios como as PGE₂, IL-1 α , 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.³⁸ Apresentam também queda na resistência à infecção, prejuízo na cicatrização,³⁹ exagerada resposta inflamatória² e aumento da extensão e severidade da doença periodontal.³⁹

Com relação aos tratamentos propostos no presente estudo, a terapia não cirúrgica convencional de RAR não se mostrou efetiva no controle da perda óssea alveolar, tanto nos animais diabéticos como nos não diabéticos, quando utilizada isoladamente no tratamento da doença periodontal experimental. Há evidências que, clinicamente, a RAR com instrumentos manuais é a terapia mais efetiva no tratamento da doença periodontal.^{40,41} No presente estudo, a limitação da RAR provavelmente se deve ao difícil acesso para instrumentação mecânica convencional na região de furca.^{42,43} Para compensar esta limitação, terapias coadjuvantes ao tratamento convencional nestas áreas, têm sido propostas.^{12-14,44,45}

A busca por terapias alternativas complementares para favorecer o processo de reparo em indivíduos diabéticos têm sido motivo de muitos estudos.^{12,14} Neste estudo, a utilização do LLLT, como método alternativo complementar no tratamento da doença periodontal experimental induzida em ratos diabéticos, favoreceu significativamente o processo de reparo periodontal, quando comparado com o método convencional de tratamento (RAR) independentemente do período analisado. Estudos relataram 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.⁴⁶ Desta forma, um aumento na difusão de oxigênio no tecido pode ocorrer,⁴⁷ favorecendo conseqüentemente 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.⁴⁸

De maior relevância, ficou evidenciado no presente estudo foi que apesar dos animais diabéticos, submetidos ao tratamento de RAR apresentarem maior perda óssea que os não diabéticos, não houve diferenças significativas na perda óssea alveolar entre as áreas tratadas com LLLT, tanto nos animais diabéticos como não diabéticos.

No diabetes, há um aumento do stress oxidativo nos tecidos e no plasma ocasionados pelo acúmulo de AGEs (produtos finais da glicolisação avançada), o qual é amplificado pelo contínuo ciclo de stress metabólico, dano tecidual e morte celular, levando a uma subsequente produção de radicais livres e aumento da disfunção vascular.⁴⁹ Os efeitos benéficos do LLLT na doença periodontal dos animais diabéticos poderiam ser explicados pelo aumento da susceptibilidade à irradiação laser nos tecidos dos diabéticos,⁵⁰ os quais se apresentam com diminuição do potencial redox.⁴⁷ A susceptibilidade à irradiação e capacidade para ativação depende do estado fisiológico das células irradiadas. As células com diminuição do potencial redox (alguns estados patológicos) são mais sensíveis a irradiação.⁵⁰

O processo de reparo dos tecidos em diabéticos está alterado pelas modificações de uma série de eventos que incluem quimiotaxia, liberação de fatores de crescimento, baixo pH, alta concentração de lactato e baixa tensão de oxigênio. A quimiotaxia de macrófagos e a liberação de fatores de crescimento de proliferação fibroblástica podem ocorrer na presença ou não de altas tensões de oxigênio. Entretanto a polimerização e secreção do colágeno na matriz extracelular somente ocorre na presença de altas tensões de oxigênio.⁴⁷

A especificidade da resposta biológica tecidual não é determinada pelo nível de reação da cadeia respiratória, mas sim pelo nível de transcrição durante a sinalização celular da cascata.⁵⁰ Outra justificativa dos efeitos benéficos do LLLT nos tecidos com déficit metabólico, como o observado nos animais diabéticos, é a sua capacidade em promover angiogênese, o que promove aumento do aporte de oxigênio na área.⁴⁷ Avaliando a influência do laser na evolução da doença periodontal in vivo, Almeida et al.²⁷ demonstraram que o LLLT utilizado isoladamente, sem RAR, promoveu uma maior extensão do infiltrado inflamatório crônico no tecido conjuntivo gengival aos 15 dias, devido ao aumento da angiogênese local.

Outro estudo recente,²⁸ realizado em nosso laboratório, demonstrou que o laser quando utilizado isoladamente no tratamento da doença periodontal, somente controlou a perda óssea na região de furca de molares inferiores de ratos no período de 15 dias. Neste caso a baixa ação do LLLT pode ser explicada pela sua discreta interação com as bactérias presentes no biofilme dentário, já que nesta pesquisa as áreas analisadas não foram tratadas com instrumentação mecânica. No entanto Yilmaz et al.²⁹ em estudo clínico em humanos, não observaram nenhum efeito benéfico do LLLT associado ou não a terapia periodontal convencional. Estas evidências conflitantes podem ser devido às diferenças metodológicas na utilização do Laser e dos diferentes parâmetros de irradiação utilizados.

A ação do LLLT na viabilidade bacteriana é ainda muito discutida. A ação do LLLT na viabilidade ou atividade de células bacterianas é espécie dependente⁵¹ e diretamente relacionada à absorção do comprimento de onda pelas porfirinas endógenas, as quais estão presentes em algumas bactérias⁵². A maioria das bactérias não têm componentes capazes de absorver luz visível ou infra-vermelha, com exceção das *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, as quais apresentam photohemina e photoporfirina, respectivamente em suas estruturas.⁵³ Sigush et al.²⁶ demonstraram in vivo, que a aplicação isolada do laser não influenciou significativamente a frequência de *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. Por outro lado, Karu⁵⁰ contra-indica o uso do LLLT isolado em áreas infectadas. No presente estudo, o LLLT associado a RAR foi efetivo no tratamento da doença periodontal não cirúrgico. Este fato fortalece o seu uso em diabéticos não controlados, que não estejam aptos à terapia cirúrgica.

A radiação laser é capaz de alterar o comportamento celular na dependência do comprimento de onda, além de apresentar uma complexidade na dispersão da luz pelos componentes teciduais.⁵⁴ A potência de saída do laser, o tempo de exposição empregado (energia liberada) e o diâmetro de saída do feixe podem influenciar na resposta biológica. Além destes, os fatores inerentes aos tecidos irradiados como pH, cor, condutividade térmica, conteúdo de água, material orgânico e densidade da população celular também podem influenciar.⁵⁵

As terapias que têm sido mais empregadas como coadjuvantes ao tratamento mecânico convencional na doença periodontal em diabéticos, são baseadas no uso de antimicrobianos.^{12,14} Apesar do LLLT, isoladamente, não ser muito efetivo na redução do biofilme dentário, tem a vantagem de possuir ação restrita ao local de tratamento, assegurando a manutenção da microbiota entérica, que normalmente é muito afetada pelos antibióticos; além de não agir indiscriminadamente no organismo do hospedeiro e não promover o desenvolvimento de cepas resistentes.

Dentro dos limites do presente estudo, **pode-se concluir** que o LLLT melhora os resultados, como terapia coadjuvante ao tratamento convencional de RAR no tratamento da doença periodontal experimental induzida por placa bacteriana e na modificada pelo diabetes mellitus, levando a redução da perda óssea a níveis semelhantes aos animais que sofreram o mesmo tratamento no grupo de animais não diabéticos. Outros estudos devem ser realizados para comprovar os mecanismos de ação do LLLT nas áreas com doença periodontal e os efeitos deste sobre os parâmetros clínicos periodontais à longo prazo.

Referências

1. Web sites. World Health Organization (2002). Diabetes mellitus. Fact sheet n° 138. Available at: www.who.int/inf-fs/en/fact138.html. Accessed January 10, 2007.
2. 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.
3. 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.
4. Deas DE, Mackey SA, McDonnell HT. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontol 2000* 2003;32:82-104.
5. Michalowicz B. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol* 1994;65:479-488.
6. 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.
7. Papapanou PN. 1996 World Workshop in Clinical Periodontics. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1996; 1:1–36.
8. Mealey BL, Oates TW; American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289-1303.
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. 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.
13. Moskow BS, Tannenbaum P. Enhanced repair and regeneration of periodontal lesions in tetracycline-treated patients. Case reports. *J Periodontol* 1991;62:341-350.
14. Mealey BL, Rethman MP. Periodontal disease and diabetes mellitus. Bidirectional relationship. *Dent Today* 2003; 4:107-113.
15. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg* 1971;122:532-535.
16. Stadler I, Lanzafame RJ, Evans R, Narayan V, Dailey B, Buehner N, Naim JO. 830-nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. *Lasers Surg Med* 2001;28:220-6.
17. Byrnes KR, Barna L, Chenault VM, Waynant RW, Ilev IK, Longo L, Miracco C, Johnson B, Anders JJ. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. *Photomed Laser Surg* 2004;22:281-90.
18. Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehabil* 2006 ;33:619-924.
19. 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* 2002; 20: 325-333.
20. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 2001; 29:179-184.

21. Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, Garcia VG. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. *Photomed Laser Surg* 2004;22:199-204.
22. Freitas LGF, Baranauskas V, Cruz-Höfling MA. Laser effects on osteogenesis. *Appl Surface Sci* 2000;155: 548-554.
23. Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med* 1987;7:36-45.
24. Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Höfling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B* 2003;70:81-9.
25. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B* 1995 ;27:219-23.
26. 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.
27. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2007;78:566-575.
28. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In Vivo Effect of Photodynamic Therapy on Periodontal Bone Loss in Dental Furcations. *J Periodontol* [no prelo].
29. 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.

30. 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.
31. Johnson JH. Effects of local irritation and dextran and sufat administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res* 1975;10:332-345.
32. 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.
33. 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.
34. Grossi SG, Skrepinski F, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG, Genco RJ. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol* 1997; 68:713-719.
35. 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.
36. 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.
37. 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.

38. 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
39. Mealey BL, Oates TW; American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289-1303.
40. Baderstein A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of non-surgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1981;8:57-72.
41. Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Heijl L. Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1992;9:115-128.
42. Sherman PR, Hutchens LH, Jewson LG, Moriarty JM, Greco GW, McFall WT. The effectiveness of subgingival scaling and root planing. I. Clinical detection of residual calculus. *J Periodontol* 1990;61:3-8.
43. Cobb CM. Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann Periodontol* 1996;1: 443-490.
44. 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.
45. 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.
46. Garavello I, Baranauskas V, da Cruz-Höfling MA. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. *Histol Histopathol.* 2004 Jan;19(1):43-8.
47. Al-Watban FAH, Zhang XY. Comparison of wound healing process using argon and krypton lasers. *J Clin Laser Med Surg* 1997;15: 209-215.

48. Reenstra WR, Veves A, Orlow D et al. Decrease proliferation and cellular signaling in primary dermal fibroblasts derived from diabetics versus non diabetic sibling controls. *Acad Emerg. Med* 2001;8:519.
49. 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.
50. Karu, T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys* 1989;56:691-704.
51. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003;18:51-55.
52. Soukos NS, Mullholland SE, Socransky S, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: Enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Laser Surg Med* 2003;33:161-168.
53. Soukos NS, Som S, Abernethy AD, et al. Phototargeting oral blackpigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1391-1396.
54. Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg* 2006;24:169-178.
55. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J* 1994;44:181-189.

Lista de Figuras

Figura 1: Protocolo e Cronograma Experimental.

Figura 2: Fotomicrografia ilustrando a área de furca dos animais não diabéticos (**a**); e diabéticos (**b**) sem a indução da doença periodontal experimental. (Tricrômico de Masson, magnificação original 24x do original).

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 B, tratamento I (RAR) 30 dias; (c) Grupo A, tratamento II (LLLT) 30 dias; (d) Grupo B, tratamento II (LLLT) 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				
RAR	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*
RAR+ILT	78,57±4,1	74,78±4,2	81,49±5,3	82,67±4,3	69,94±5,9	88,71±3,8	398,67±7,1*	521,13±5,6	402,65±7,8*	556,34±2,4*

* 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).

Grupos	A Não diabéticos - M±DP			B Diabéticos - M±DP		
	7	15	30	7	15	30
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	20	20	20	20	20	20

Diferença estatisticamente não detectada (p=0.087) pela análise de variância ANOVA.

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

<i>Grupos</i>	<i>A</i> <i>Não diabéticos – $M \pm DP$</i>			<i>B</i> <i>Diabéticos – $M \pm DP$</i>		
	<i>7</i>	<i>15</i>	<i>30</i>	<i>7</i>	<i>15</i>	<i>30</i>
<i>Tratamentos</i>						
I - RAR	$1,11 \pm 0,11^A_a$	$0,84 \pm 0,12^A_a$	$0,97 \pm 0,13^{Aa}$	$2,27 \pm 0,47^{Aa}$	$3,23 \pm 0,34^{Ab}$	$2,82 \pm 0,75^{Ac}$
II - RAR+LLLT	$0,33 \pm 0,05^B_a$	$0,35 \pm 0,06^B_a$	$0,27 \pm 0,07^{Ba}$	$0,37 \pm 0,05^{Ba}$	$0,35 \pm 0,02^{Ba}$	$0,37 \pm 0,02^{Ba}$
N	20	20	20	20	20	20

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

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

Tabela 4. Médias e desvio padrão (M±DP) dos dados histométricos (mm²) da perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com periodontite experimental induzida, de acordo com cada grupo, tratamento e período – Análise inter-grupos.

		<i>Períodos</i>		
		<i>7</i>	<i>15</i>	<i>30</i>
<i>Grupos</i>	<i>Tratamentos</i>			
A	I - (RAR)	1,11±0,11 ^A	0,845±0,12 ^A	0,97±0,13 ^A
	II - (RAR+LLLT)	0,33±0,05 ^B	0,35±0,06 ^B	0,27±0,07 ^B
B	I - (RAR)	2,27±0,47 ^C	3,23±0,34 ^C	2,82±0,75 ^C
	II - (RAR+LLLT)	0,37±0,05 ^B	0,35±0,02 ^B	0,37±0,02 ^B
	N	40	40	40

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

Figura 1. Protocolo e Cronograma Experimental.

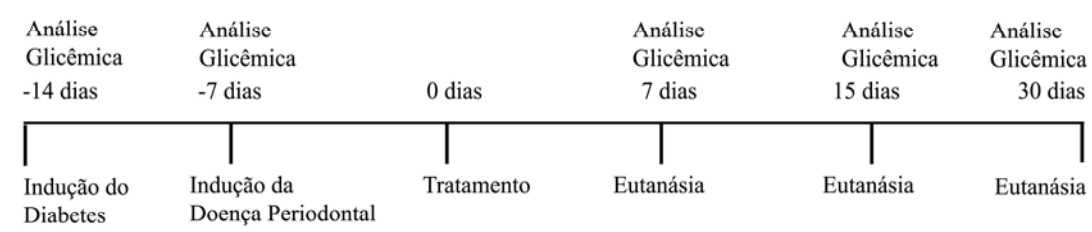


Figura 2: Fotomicrografia ilustrando a área de furca dos animais não diabéticos (**a**); e diabéticos (**b**) sem a indução da doença periodontal experimental. (Tricrômico de Masson, magnificação original 24x do original).

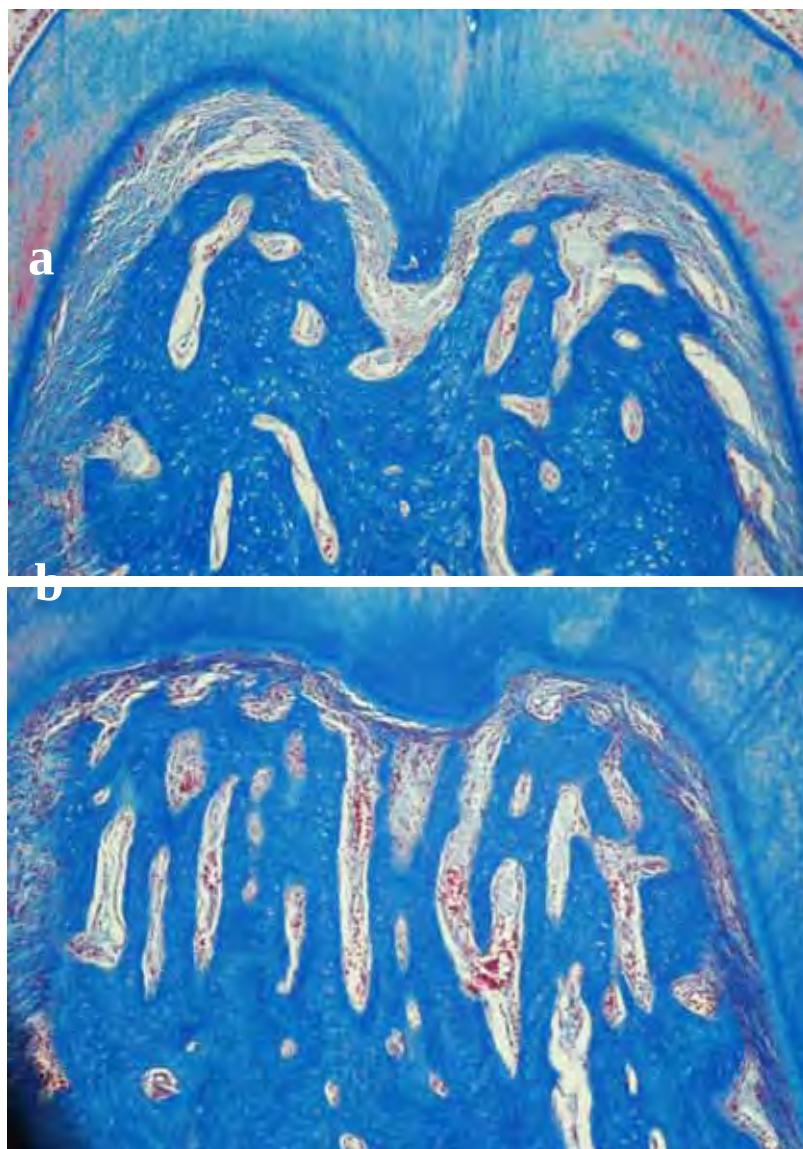
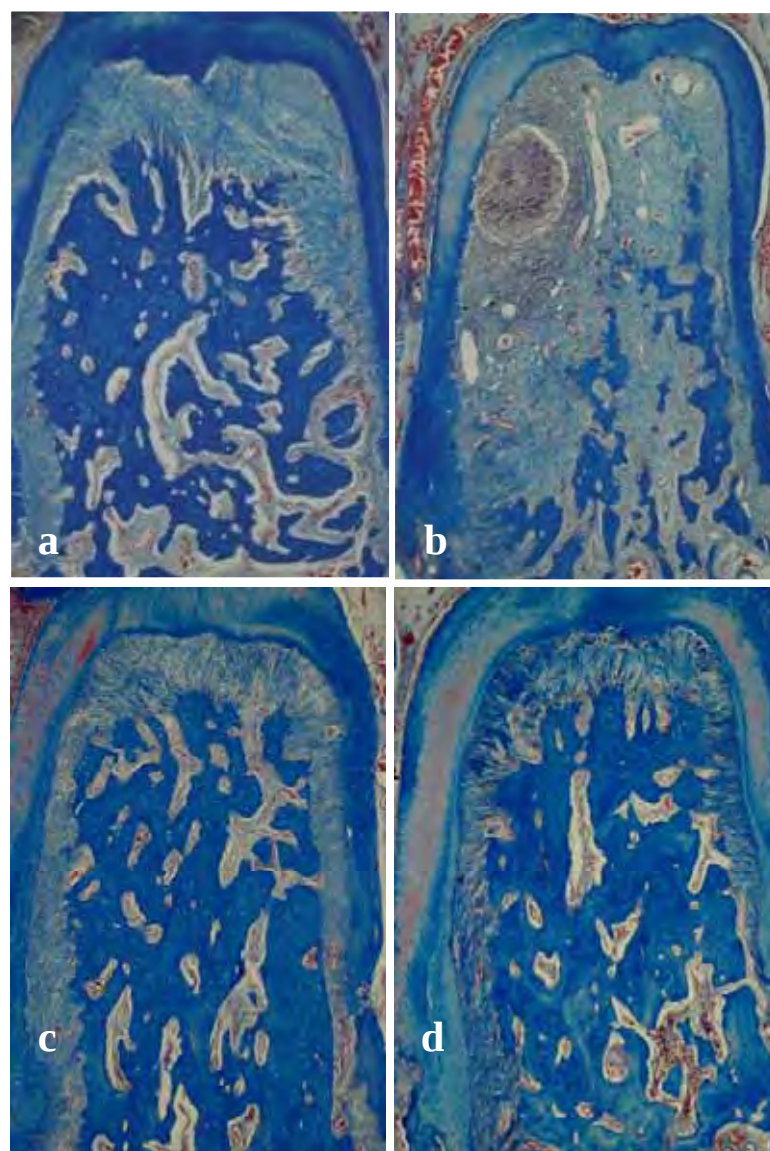


Figura 3: Fotomicrografia ilustrando a área de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida nos diferentes Grupos (A e B) e Tratamentos: (a) Grupo A, tratamento I (RAR) 30 dias; (b) Grupo B, tratamento I (RAR) 30 dias; (c) Grupo A, tratamento II (LLLT) 30 dias; (d) Grupo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



Anexo 1- 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

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.

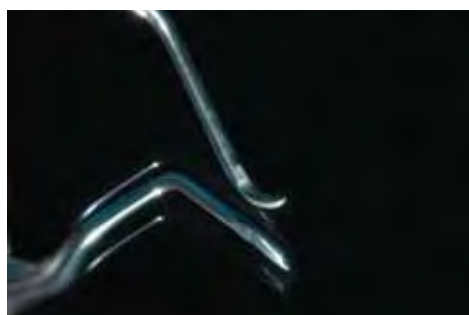


Figura 15 - Cureta de Gracey mine-five 13-14.



Figura 16 - Raspagem e Alisamento Radicular.

Anexo 4. Aplicação do Laser



Figura 17 – Aplicação do Laser



Figura 18 – Unidade Laser GaAlAs; Laser Bio Wave LLLT; Kondortech Equipamentos.

Anexo 5 - Aspecto Clínico dos Animais Diabéticos e não Diabéticos.



Figura 19 – Rato não diabético – Ausência de catarata.



Figura 20 Rato diabético – Presença de catarata.



Figura 21 – Tamanho dos animais de mesma idade no final do experimento.
(A) Rato diabético; (B) Rato não diabético.



Figura 22 – Alterações Vasculares.
(A) Rato diabético; (B) Rato não diabético.

Anexo 6 – Tabela de pesos dos animais diabéticos e não diabéticos

Tabela 4 – Peso Médio e desvio padrão ($M \pm DP$) dos animais não-diabéticos e Desvio padrão nos diferentes grupos e períodos experimentais.

Ratos não diabéticos – Grupo A						
Tratamentos	-14 dias	-7 dias	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I RAR	128.67 $\pm$ 17.3	168.04 $\pm$ 15.9	188.40 $\pm$ 21.3	191.34 $\pm$ 20.1	230.40 $\pm$ 14.6	260.65 $\pm$ 27.1
II LLLT	137.59 $\pm$ 13.2	156.41 $\pm$ 20.5	182.91 $\pm$ 14.3	197.32 $\pm$ 11.2	244.41 $\pm$ 19.6	258.56 $\pm$ 21.7
Ratos diabéticos – Grupo B						
Tratamentos	-14 dias	-7 dias	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I RAR	124.23 $\pm$ 14.6	128.23 $\pm$ 12.7*	134.23 $\pm$ 17.0*	139.23 $\pm$ 17.4*	145.23 $\pm$ 23.4*	151.23 $\pm$ 15.3*
II LLLT	124.15 $\pm$ 15.9	129.10 $\pm$ 17.2*	135.10 $\pm$ 16.3*	140.09 $\pm$ 14.5*	150.12 $\pm$ 13.5*	166.17 $\pm$ 16.7*

*Diferença estatisticamente detectada pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) na comparação com os animais do Grupo A fixando o período e tratamento.

Anexo 7 - Fotomicroscopia dos Animais Diabéticos e não Diabéticos.

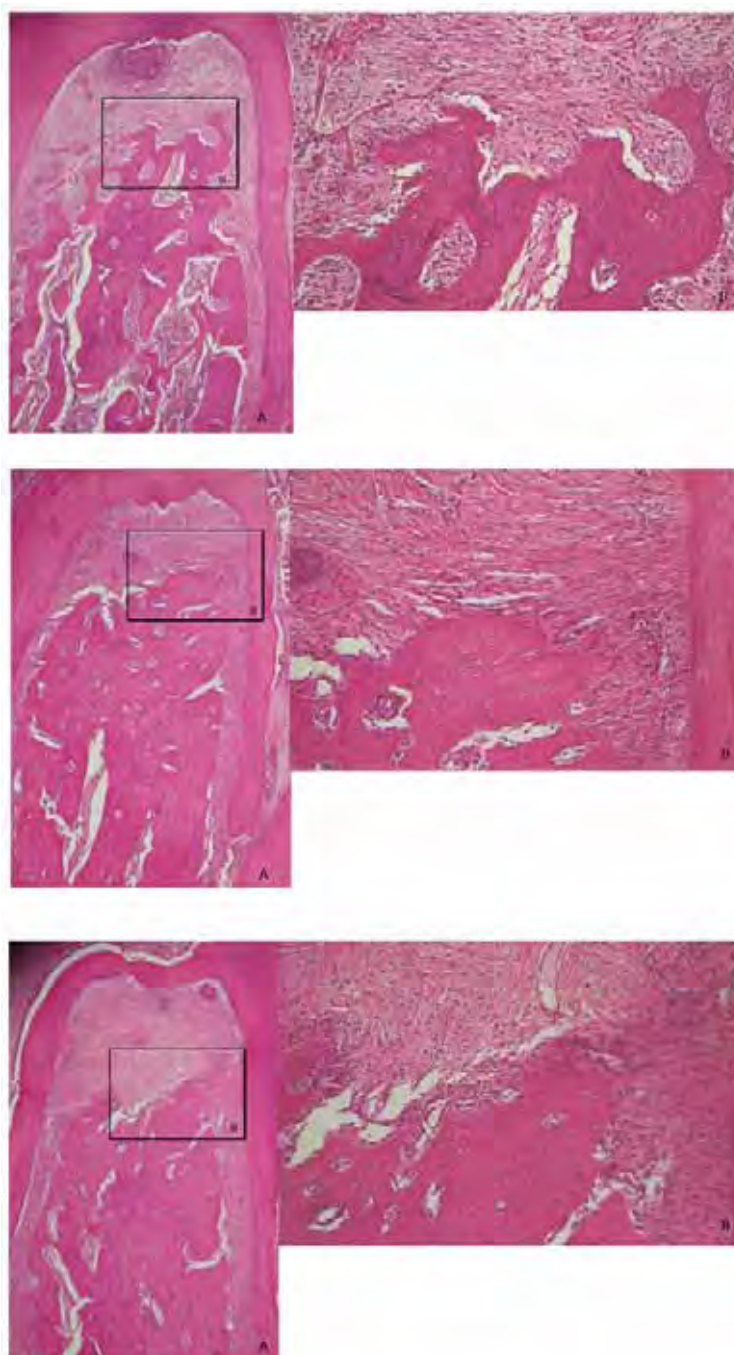


Figura 23 – (A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos A e Tratamento I (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); **(B)** observar área do tecido conjuntivo desorganizado, com infiltrado inflamatório evidente e áreas de reabsorções ósseas. (H.E. magnificação original 25x).

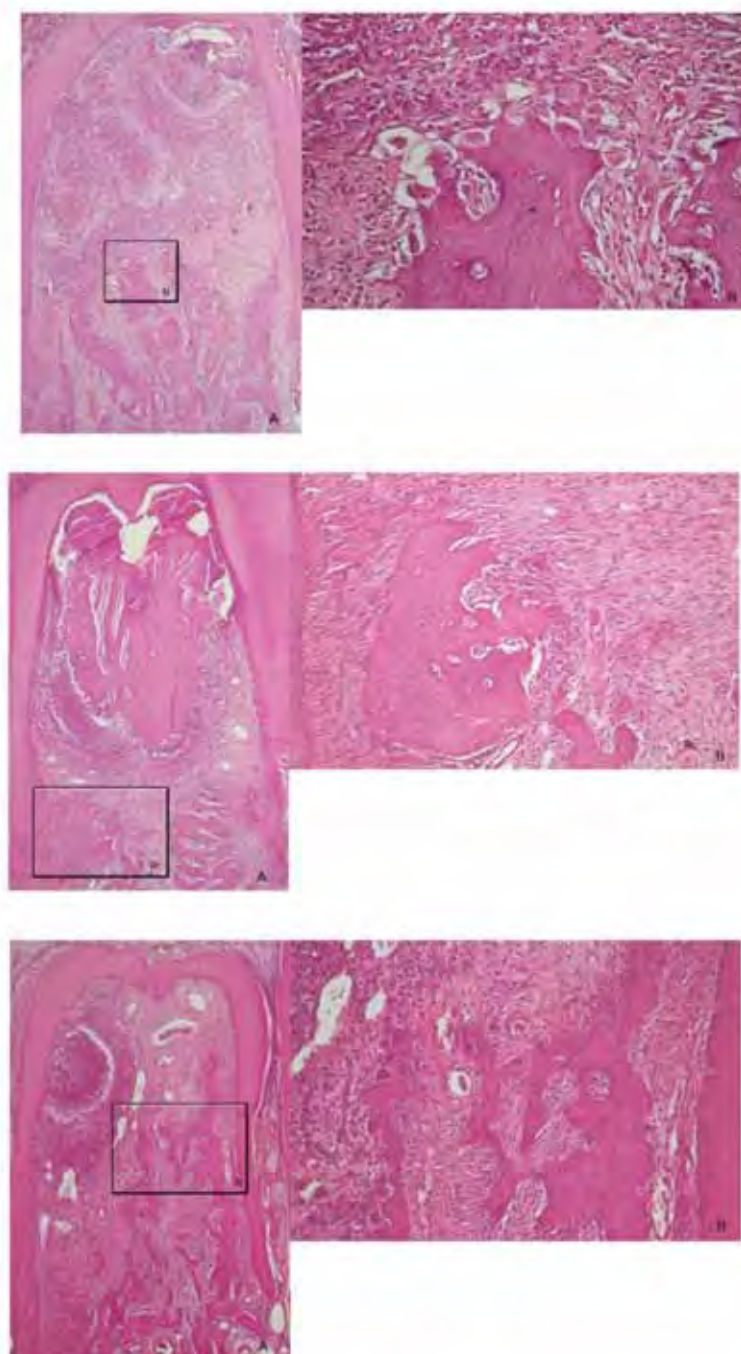


Figura 24 – (A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos B e TratamentoI (RAR), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); **(B)** observar área do tecido conjuntivo desorganizado,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

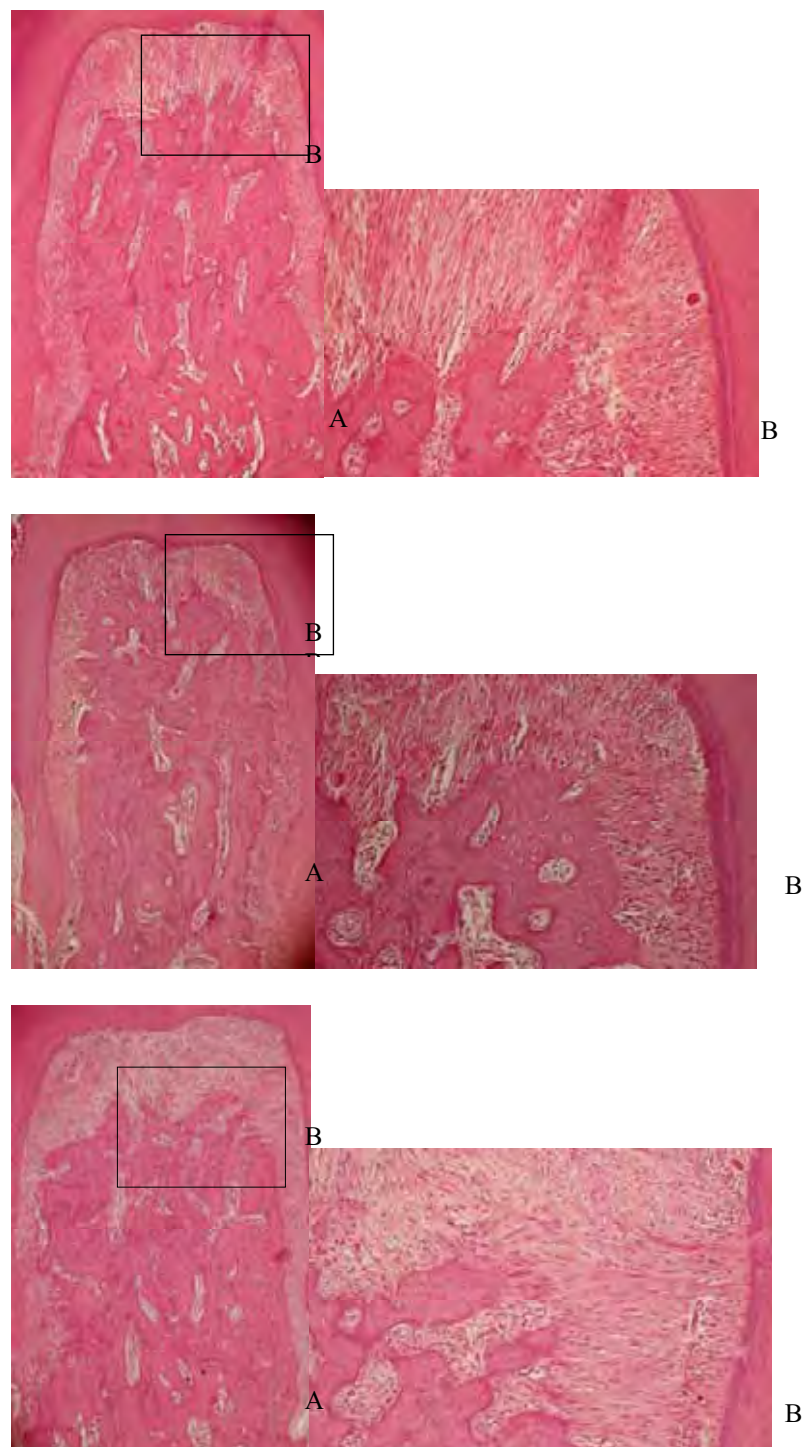


Figura 25 –(A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos A e Tratamento II (LLLT), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); **(B)** observar área do tecido conjuntivo organizado,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

B

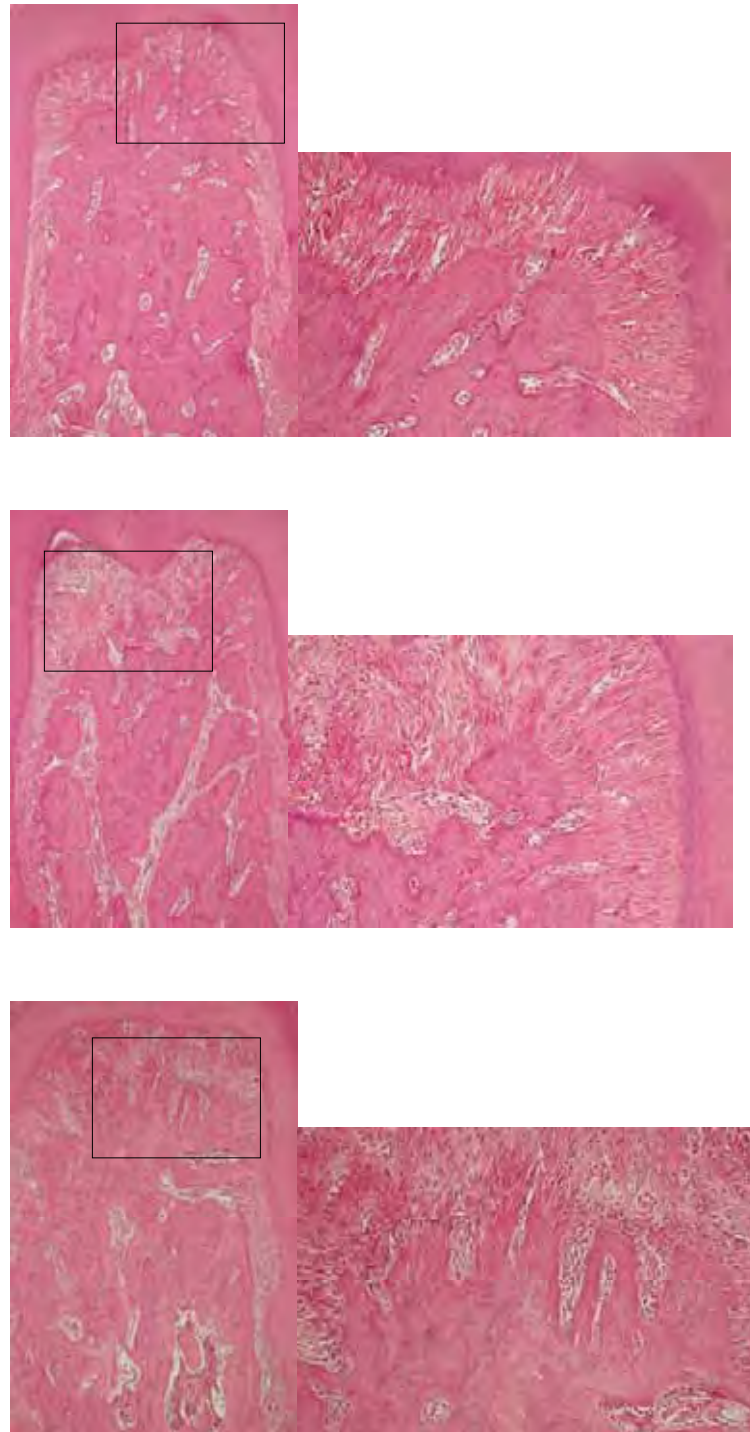


Figura 26 –(A) Fotomicrografia ilustrando a área de perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal experimental induzida no Grupos A e Tratamento II (LLLTT), aos 7, 15 e 30 dias. (H.E. magnificação original 12,5x); **(B)** observar área do tecido conjuntivo organizado,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

Anexo 8 - Instruction to Authors

Instruction to Authors

Up date 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. All manuscripts will be reviewed by the Editors for novelty, potential to extend knowledge, and relevance to clinicians and researchers in the field. Some manuscripts will be returned without review, based on the Editors' judgment of the appropriateness of the manuscript for the Journal of Periodontology.

ORIGINAL ARTICLES

These are papers that report significant clinical or basic research on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the different forms of periodontal disease. Papers dealing with design, testing, and other features of dental implants are also included. Format Original articles must be limited to 4,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the combined number of figures and tables must be 6 or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

All original articles should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

* Background: Describes the problem being addressed. * Methods: Describes how the study was performed. * Results: Describes the primary results. * 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.

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.

STATE OF THE ART REVIEWS

are focused reviews of basic and clinical science related to periodontics and implant dentistry. These reviews should be concise and address an important and timely clinical question. The review should be based on a critical assessment of the literature, and may include data or examples from the research or clinical experience of the author(s).

Authors should discuss clinical relevance and future projections. At-large submissions will be considered, but authors should contact the Editor-in-Chief before developing a manuscript to avoid duplicating a topic already in preparation. Papers should be balanced, literature-based reviews that are concise (2,000 to

3,000 words) with about 100 key references. Articles should be written at a level instructive to Journal readers. For example, clear definitions of abbreviations and a glossary of terms may be useful for defining highly technical or new terminology. Since critical reviews require selection of reports and interpretation of data, authors should not have a financial interest in the companies making products or providing services described in the review.

Abstract

The abstract should summarize the main conclusions of the review in 350 words or less. Introduction. A question or series of related questions to be addressed should be given; rationales for asking these questions and why the questions are timely should be explained. Methods The method of reviewing the literature should be discussed (e.g., bibliographic indexes and databases used, limits on years covered by the search, languages searched, and other important information regarding the search process should be described).

Body

A sequence of logical subsections that reflect the area being reviewed should be developed. This section should be a critical analysis of the literature, including arguments needed to support the conclusions reached; why certain papers not meeting well-described critical standards, such as randomized clinical trials, were not used as evidence; and what issues remain unresolved and need further study.

Evidence tables are often useful in summarizing reviewed literature, and various statistical analyses appropriate to reviewing literature, such as metaanalysis, should be considered.

COMMENTARY

The purpose of these papers is to provide a forum for discussion of controversies and other issues as they relate to the practice of periodontics and implant dentistry. Full and balanced discussion of controversies on important issues is encouraged. This may result in several authors each presenting a relevant viewpoint. Commentary articles should be concise (2,000 to 3,000 words); however, they should be complete and balanced, which may require that the issue or controversy addressed be highly focused.

Appropriate references should be cited.

Introduction

This section should clearly state the clinical question or issues to be discussed and document their importance and timeliness.

Body

The body should present the information supporting all aspects of the issues. This portion of the Commentary

may be subdivided as appropriate with headings.

Figures, tables, and other illustrative materials may be incorporated.

Summary

The summary should place the issue in perspective and point a way for future directions in addressing the controversy. **Acknowledgments** Since these papers allow authors to express their opinions on a subject, it is extremely important that authors disclose any and all affiliations, financial position, or any other information that constitutes a real or perceived conflict of interest.

CASE REPORTS

These manuscripts emphasize clinical periodontics and related oral medicine and pathology. Unusual cases illustrating lesions affecting the orofacial structures that may be expected to influence management of periodontal and implant patients could be presented. Case reports should describe: 1) unique cases that may represent a previously undescribed condition; 2) unexpected association of two or more diseases; 3) adverse or unexpected treatment response; or 4) any other clinical observation based upon well-documented cases that provide important new information.

CASE SERIES

These papers report a sufficient number of consecutive or randomized cases to make a persuasive argument for or against the procedure, technique, or concept under discussion. Cases should be relatively homogeneous so that a systematic evaluation of one type of disease, lesion, or condition is made for the procedure under consideration. Also, treatment and documentation should be consistent and standardized for all cases. It is recognized that definitive evidence for the safety and efficacy of any procedure, drug, or device comes primarily from well-designed, randomized, controlled trials. However, well-executed case series may lead to hypotheses about the usefulness of new and innovative procedures, drugs, or devices and may therefore be of value to the progress of clinical science.

Abstract

Case Reports and Case Series should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- * **Background:** Describes the clinical situation being discussed.

- * **Methods:** Describes the clinical procedures (surgical and non-surgical) performed.
- * **Results:** Describes the clinical results.

- * **Conclusions:** Reports what authors have concluded, specifically clinical implications in practice situations.

Introduction

This section should include a critical review of the pertinent literature.

Case Description and Results

This section describes the case or cases, including all relevant data. For ease of presentation, tables describing longitudinal data in a chronological form may be useful. Carefully selected, high-quality clinical photographs in full color, as well as radiographs, are encouraged.

Discussion

This should include findings, put into perspective with respect to the field and literature. Unique arguments and new information gained should be summarized. Consideration of the clinical significance of the case(s) should be emphasized in all sections.

CLINICAL PRACTICE (FORMERLY INNOVATIONS IN PERIODONTICS)

These manuscripts should emphasize methods, such as the application of new technology, materials, and techniques to patient management, and should be illustrated carefully and fully, with radiographs and color clinical photographs. The innovation/method should be described in detail so that readers can duplicate the procedures.

In addition, the innovation/method should have been used on a sufficient number of cases or subjects to demonstrate its utility and any adverse effects.

Also, experience in use of the technique should allow the author(s) to describe situations or conditions where

the procedure may not work as effectively. Only procedures that give consistent results documented over a sufficiently large number of cases should be submitted for publication.

Manuscripts should be concise and should consist of an abstract, an introduction, a description of the innovation/method in conjunction with management of a case(s), and a discussion.

It should be noted that certain new innovations might require human subject review and informed consent. It is the responsibility of the author to obtain these. In particular, the Editors are seeking papers describing how practitioners manage site preservation, pre-implant surgery, guided tissue regeneration, furcation preparation, root resection, suturing, and root coverage of extensively prepped teeth and/or previously restored roots, although other topics are encouraged as well.

GUEST EDITORIALS

Guest Editorials may be invited or may be submitted from authorities in certain areas as a means of offering their perspective on one or more articles published in the Journal, or on other items of interest to the readership.

LETTERS TO THE EDITOR

Letters may comment on articles published in the Journal and should offer constructive criticism. If a letter comments on a published article, the author(s) will be provided 60 days to respond to the observations.

Letters to the Editor may also address any aspect of the profession, including education and training, new modes of practice, and concepts of disease and its management. Letters should be brief, focused on one or a few specific points or concerns, and can be signed by no more than five individuals.

Citations should be handled as standard references.

MANUSCRIPT SUBMISSION, PREPARATION, AND FORMAT

The Journal of Periodontology accepts manuscript submissions online at the following URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>. 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 "WebUploading Policies and Instructions."

Inquiries regarding current submissions should be sent to: Managing Editor, Journal of Periodontology, 737 North Michigan Avenue, Suite 800, Chicago, IL 60611-6660. Telephone: 312/573-3224; e-mail: julie@perio.org.

SUBMISSION

Authorship Individuals identified as authors must meet the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual

content; and 3) final approval of the version to be published. Once the Journal has received a manuscript, any changes in authorship must be faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator) and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (described under "Acknowledgments and Conflicts of Interest"). Letter of Submission / Conflicts of Interest A conflict of interest and financial disclosure form must be submitted for each author. A template form can be found on JOP Manuscript Central_ (<http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>) in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms." More information on conflicts of interest can be found under "Conflicts of interest" below.

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 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 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 <http://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 *, †, ‡, §, k, ¶, #, **, 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; 8) word count and number of figures and tables in the manuscript; 9) a short running title of no more than 60 characters, including spaces; and 10) a one-sentence summary describing the key finding(s) from the study.

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 CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgments

At the end of the Discussion, acknowledgments may be made to individuals who contributed to the research or the manuscript preparation at a level that did not qualify for authorship. This may include technical help or participation in a clinical study. Authors are responsible for obtaining written permission from persons listed by name. Acknowledgments must also include a statement that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author.

Conflicts of interest

In the interest of transparency and to allow readers to form their own assessment of potential biases that may have influenced the results of research studies, the Journal of Periodontology now requires that all authors declare potential competing interests relating to papers accepted for publication. Conflicts of interest are defined as those influences that may potentially undermine the objectivity or integrity of the research, or create a perceived conflict of interest.

Authors are required to submit:

1) A statement in the manuscript, following Acknowledgments, that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author. If an author has no commercial relationships to declare, a statement to that effect should be included. This statement should include financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include financial support for research (salaries, equipment, supplies, travel reimbursement); employment or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper; and personal financial interests such as shares in or ownership of companies affected by publication of the research, patents or patent applications whose value may be affected by this publication, and consulting fees or royalties from organizations which may profit or lose as a result of publication. An example is shown below. 2) A conflict of interest and financial disclosure form for each author. This form can be found on JOP Manuscript Central_ (<http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>) in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms." The form should be completed by each author and provided to the corresponding author. The corresponding author is responsible for submitting these forms from each author when the manuscript is submitted. These

forms should be sent to Bethanne Wilson, Editorial Coordinator, either via e-mail at bethanne@perio.org or fax at 312/573-3225. These forms can also be uploaded in the cover letter area during the manuscript submission process. Conflict of interest information will not be used as a basis for suitability of the manuscript for publication. Example of conflict of interest statement: This study was supported by a grant from the Acme Implant Corporation, Seoul, Korea. Drs. Able, Kim, and Bruce report no financial relationships related to any products involved in this study. Dr. Lee is on the scientific advisory board for Acme Implant Corporation and gives lectures sponsored by the company. Dr. Smith is a consultant and shareholder of the Brownstone Implant Corporation, Boston, MA. Dr. Wang is employed full-time as chief technical officer of the Acme Implant Corporation.

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://nmlpubs.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. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the Journal of Periodontology's preferred reference style.

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. 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 peri-implant disease (in German). *Z Zahnärztl Implantol* 1996;12:152-157. Books and Other Monographs
5. Personal author(s). Tullman JJ, Redding SW. *Systemic Disease in Dental Treatment*. St. Louis: The CV Mosby Company; 1983:1-5.
6. Chapter in a book. Rees TD. Dental management of the medically compromised patient. In: McDonald RE, Hurt WC, Gilmore HW, Middleton RA, eds. *Current Therapy in Dentistry*, vol. 7. St. Louis: The CV Mosby Company; 1980:3-7.
7. Agency publication. Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, 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.

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. 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. For graphs and charts, do not use patterned fills. Solid tones or colors are recommended instead.

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.

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

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.

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 30 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. A file containing this form always accompanies the acceptance e-mail.

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.

The following information will help in preparing and submitting your manuscript to the Journal of Periodontology

Web-based peer review system, JOP Manuscript Central. Also refer to the previous pages for guidelines on preparing and formatting manuscripts. Submit manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>. You will be able to monitor the progress of your manuscript through the peer review process.

PREPARING AND FORMATTING ELECTRONIC MANUSCRIPTS

Text file: Submission of manuscripts must be in Microsoft Word (.doc). This applies to both Windows and Macintosh platforms. If you are using any other word processing program, you must save the text file as .rtf. Use basic fonts such as Arial, Courier, Times, or Times New Roman. Special or mathematical characters and Greek letters that are not on a standard keyboard must be created using the Symbol font. **Tables:** The system will easily read tables created with Word's table utility or when inserted into Word from Excel. **Equations:** Create an equation as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.

Figures and illustrations: To prevent problems during the review process, figures and illustrations should be submitted only in the following formats: EPS or TIFF, and at the highest resolution possible (at least 600 dpi for CMYK or halftones [grayscale mode] and 1,000 dpi for line art [bitmap mode]). Any other format might not be readable by a reviewer. Illustrations and graphics for revised manuscripts should be submitted in EPS or TIFF only. Submit only one file per figure (combine and label panels). If panels are in different formats, save the entire file at the highest applicable resolution (see page 6). Save figures and illustrations with clear and simple file names, such as "Figure 1.tif" or "Fig1.tif." File names should match the labeling that appears in the legends in the text document.

SUBMITTING

For user account information, log on to Journal of Periodontology Manuscript Central_ at <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>. Here, you will be able to either create an account or enter an existing

account. If you believe you may already have an account, enter your e-mail address in the Password Help box on the right-hand side of the page. If the address you entered is found in the account records, an e-mail will be sent to you at that address containing your User ID and a temporary password. If you do not have an account in the system, click "Create Account" in the upper right-hand corner. Please fill in all fields accurately. All fields with "req" are required. If a required field does not apply to you, enter "none" or "N/A" in the space provided. When you are finished with a screen, click "Next" to continue to the next screen. When you reach the final screen and all information is entered, click "Finish" to submit your information. **Author Center:** To start the submission process, go to the Author Center and click "Click here to submit a new manuscript." The following are explanations of the 7 steps required to submit a manuscript: **Screen 1 – Type, Title, & Abstract.** Select a manuscript type from the pull-down menu. Enter the title, running head, and abstract for your manuscript in the appropriate boxes. You can either copy-and-paste your information from your manuscript text file into the box or type it directly into the box. Use the "Special Characters" button for special characters such as Greek letters and mathematical symbols or for formatting such as italics, boldface, or superscript. For example, when you click on the lowercase alpha, the appropriate code for the character appears where your cursor was placed on the previous screen. You can also use the "Preview" button to make sure all the codes are placed in the correct locations. If you are submitting a manuscript that does not require an abstract, please type "N/A" in the abstract box. Click "Next" when you are finished with this screen.

Screen 2 – Attributes. Enter a minimum of 3 or a maximum of 6 key words or short phrases, drawn from MeSH documentation, into the box. You can either copy-and-paste the key words from your manuscript text file into the box or type them directly into the box. Use the "Special Characters" button for special characters such as Greek letters and mathematical symbols or for formatting such as italics, boldface, or superscript. Click "Next" when you are finished with this screen or "Previous" to return to the previous screen. **Screen 3 – Authors & Institutions.** Your name and institution should be completed and located at the top of the page. Click "Edit" if you need to make any changes to your

information. Once your information is correct, you may add co-authors to the paper. Fill in the information under "Add a New Author" for each co-author. After typing in an e-mail address, you may search to see if that person's information is already in the database by clicking "Find." If an e-mail is matched, the information for that author will be displayed. You may make any necessary changes to the institutional information and click "Add to My Authors" to add this author to your paper. If an incorrect author is found, click the "Clear" button to search again. If a match is not found, fill in the required information and click "Add to My Authors." If a specific author has more than one affiliation, follow the link at the bottom of the "Add a New Author" box to add more affiliations. You must click the "+ Add" button for each affiliation. Make sure to click the "Save" checkmark before closing the "Add More Affiliations" screen. Once all authors have been added to the manuscript, click "Next" to proceed to the next screen or "Previous" to return to the previous screen. Please note that once the Journal of Periodontology has received a manuscript, any changes in authorship must be faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator) and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form.

Screen 4 – Reviewers. This step requests you to identify preferred or non-preferred reviewers but is not a mandatory part of the submission process. Fill in the required information and select "Designate as Preferred Reviewer" or "Designate as Non-Preferred Reviewer" as applicable. Once you have entered all information about reviewers, click "Next" to proceed to the next screen or "Previous" to return to the previous screen.

Screen 5 – Details and Comments. In the box provided, you should either copy-and-paste your cover letter/comments or type them directly into the field. Also, you can upload your cover letter/ comments by clicking the "Browse" button and selecting a file on your computer. Click the "Attach this Cover Letter" button to attach it to your manuscript. You may also upload your conflict of interest and financial disclosure forms here. Do not attach any files from your manuscript itself in this section. In the boxes provided, fill in the total number of figures and tables. If there are no figures or tables in your manuscript, please enter "0" in the appropriate box. Your word count should also be entered in this area. Be sure to read the submission statement and select "yes" from the pull-down menu. The Journal of Periodontology also requires the signatures of all authors on the conflict of interest and financial disclosure form as part of the submission process. If these forms were not uploaded in the previous cover letter area, they may be e-mailed to bethanne@perio.org or faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator). You must check the box next to this explanation to acknowledge that you have read it and will provide conflict of interest and financial disclosure forms for each author. This form can be found on JOP Manuscript Central_ (<http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>) in the upper righthand corner under "Instructions & Forms." Click "Next" to proceed to the next screen or "Previous" to return to the previous screen.

Screen 6 – File Upload. When you upload your manuscript in Microsoft Word format (.doc), the file will automatically be converted to both .PDF and HTML formats. Any figure or illustration will also be converted to .PDF and HTML. A .PDF and HTML proof will be created, combining your document and images. Follow steps 1 through 4 to upload your manuscript files: 1. Browse to find the desired file. 2. Select the file designation: image file (includes color and grayscale figures; color and black & white line art); main document (includes title page, abstract, key words, text, footnotes, acknowledgments, references, figure legends, and tables); or supplemental file (multimedia or other necessary documents). 3. You may upload as many as 5 files at a time. Repeat steps 1 and 2 for each file. 4. Click "Upload Files." You will see a "file details" window for each file that you have uploaded. On this screen, you are able to write a file tag or caption (if it is an image). Please note that if you have uploaded an image in EPS, TIFF, or JPEG format, it is recommended to place "Fig. 1, Fig. 2," etc. in the captions area for ease of viewing. Once you have done this, click "Save." You will be brought back to the File Upload (Screen 6), where you can continue uploading files. When you have no additional files to upload, click "Next" to proceed to the final screen or "Previous" to return to the previous screen.

Screen 7 – Review & Submit. Please verify that all screens have been completed (a green checkmark will appear if all required information is completed). You must also preview your .PDF proof before submitting your manuscript. Click the .PDF button at the bottom of the page (Step 7) to preview your manuscript. An option to preview your submission in HTML is also available, but not required. After you have confirmed that all information is correct and have previewed your .PDF proof, click "Submit." Confirmation of your submission will be noted. Print your manuscript ID number. Please include this number on any correspondence you send to the editorial office. If for any reason you exit the system before completing any screen, you can continue where you left off by logging in, going to the Author Center, and clicking the "Continue Submission" button under "Unsubmitted Manuscripts."

FINALIZING SUBMISSION

If you did not upload a conflict of interest and financial disclosure form for each author during the online submission process, please fax these forms to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator).

CHECKING THE STATUS OF YOUR MANUSCRIPT

You can return to your Author Center at any time to check the status of your manuscript (click "Submitted Manuscripts"). Once a decision has been made, you will be notified by e-mail. No hard copy letters will be mailed.

SUBMITTING REVISED MANUSCRIPTS

To submit a revised paper, log on to JOP Manuscript Central_ at <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>. Select Author Center, then "Manuscripts with Decisions." Under the Actions column, click "create a revision" to begin your revision. The manuscript will now be moved to the "Revised Manuscripts in Draft" queue. Once you have begun your revision, you will be prompted through the following screens: Screen 1 – View and Respond to Decision Letter. Here you will be able to view the decision letter and comments from the reviewers. In the box below, please place a detailed response to each reviewer comment for the original manuscript. Your response to reviewers should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews. Screens 2 – 5 – Please see the above explanations under "Submitting."

Screen 6 – Please upload your revised manuscript files. All files uploaded with your original submission will be included on this screen. Include only the latest set of files. If you have updated a file, please delete the original version and upload the revised file. Please note that even if your figures have not been revised, they should be resubmitted with your revised manuscript. Screen 7 – Please confirm that all information is correct and that you have previewed your .PDF proof before submitting. Once you have submitted your revised manuscript, you will receive a confirmation e-mail message from the system when your revised paper has been successfully uploaded and received in the editorial office.

MANUSCRIPTS ACCEPTED FOR PUBLICATION

If your manuscript is accepted for publication, all authors must complete a copyright form, which can be found at <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio> under "Instructions & Forms" in the upper right-hand

corner of the screen. A file containing this form also accompanies the acceptance e-mail. Please fax this form to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator). You will be notified about a publication date by the Managing Editor.