



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

MARIÉLLEN LONGO

***“ ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO
DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO DA DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS”***

ARAÇATUBA – SP

2012



UNESP

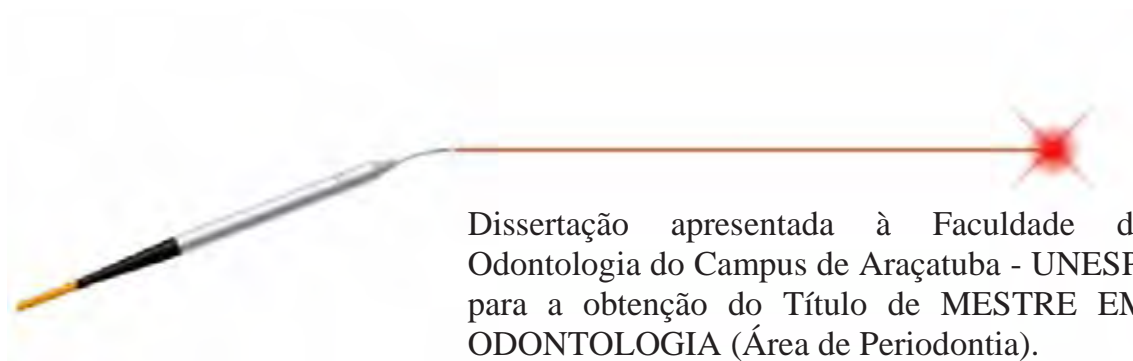
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

MARIÉLLEN LONGO

***“ ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO
DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO DA DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS ”***



Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, para a obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de Periodontia).

Orientador: Professor Titular Valdir Gouveia Garcia

ARAÇATUBA – SP

2012

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

L856e	<p>Longo, Mariéllen. Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico dos efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida em ratos / Mariéllen Longo. - Araçatuba : [s.n.], 2011 83 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Valdir Gouveia Garcia</p> <p>1. Doenças periodontais 2. Fotoquimioterapia 3. Lasers 4. Ligante RANK 5. Perda óssea alveolar</p> <p>Black D6 CDD 617.63</p>
-------	--

Dados curriculares

Mariellen Longo

Nascimento: 26.01.1987 Porto Ferreira- SP

Filiação: Sebastião Longo
Roseli Aparecida dos Santos Longo

2006- 2009: Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba -
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP

2010-2012: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Periodontia
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

*Durante toda minha vida venho escrevendo minha
história, e hoje concluo mais um capítulo.
Quantos episódios a lembrar...
Lutei, sonhei, sorri e várias vezes chorei, conheci pessoas
maravilhosas, amigos eternos, professores fascinantes.*

*Mas foi Deus sem o qual minha vida não tem sentido algum, que consegui este meu pequeno
legado de vitórias, sonhos e conquistas.*

À Deus

*Deus está aqui neste momento
Sua presença é real em meu viver
(Noites traiçoeiras)*

*Pela vida, Por ter me dado uma família maravilhosa, saúde, disposição, Por ter me
protegido,*

*Por ter me garantido serenidade, paciência e perseverança,
Abrindo-me as portas em todos os momentos em que precisava de luz, obrigada por
estar sempre em meu caminho e colocando ao meu lado pessoas que sempre ajudaram
a me levantar nos momentos onde a queda fez parte do aprendizado em minha jornada.*

*Por todas as graças concedidas, por saber que posso Te encontrar em todos os
momentos de minha vida...*

*Obrigada Senhor por cada momento que esteve comigo,
Por não permitir que desistisse nesta longa caminhada,*

Por me manter sempre nos melhores caminhos, os Teus caminhos...

*O Senhor sempre presente em todas as batalhas,
E hoje somos vitoriosos... como todos aqueles que caminham em Sua santa presença!*

*“Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver,
Apesar de todos os desafios, compreensões e períodos de crise...
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo...
Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”
(Fernando Pessoa)*

Com amor dedico este trabalho...

Aos Meus Pais ...

Gratidão, orgulho, amor e respeito são meras palavras que tentam expressar meus sentimentos por vocês.

*Não há gesto mais bonito do que esse.
Quando um filho pede a bênção a seus pais e
acredita fielmente que essa bênção vem de Deus
que o fará seguir em paz.
(Deus é família)*

Sebastião e Roseli

Que por meio de muita renúncia, compreensão, enorme incentivo e imenso amor compreenderam as minhas escolhas e tornaram possível esta conquista.

Que nunca mediram os esforços para me proporcionar tudo o que fosse realmente importante, e que são meus maiores exemplos de vida.

Pela confiança, paciência, dedicação e ajuda na conquista de mais uma etapa. Espero poder retribuir tudo o que fizeram por mim, pelas orações e amor único, pelo exemplo de trabalho e força de vontade.

Que me deram a vida me ensinou qual caminho seguir e nunca deixaram de me apoiar... Vocês tiveram participação significativa nessa conquista. Vocês me ensinaram que ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar dos desafios e frustrações.

Tenho orgulho de ser filha de vocês! Jamais existirão palavras que descreva tudo o que representam pra mim!

Vocês são aqueles que serão eternos em minha vida...

Amo muito vocês.

*“Teus ombros suportam o mundo
e ele não pesa mais que a mão de uma criança...”*

(Carlos Drummond de Andrade)

À Minha Irmã

À minha querida irmã *Mayara*

Irmã é uma dádiva de Deus... faz parte de mim!!! É a certeza de que nunca estou sozinha, de que tenho uma eterna amiga em quem posso confiar,

Pessoa maravilhosa, maior riqueza da minha vida...

*Sempre em meu coração e pensamento, agradeço por tê-la em meu caminho, a você por estar sempre perto de casa e poder estar mais perto do pai e da mãe, ajudando eles no que precisava enquanto eu estava longe, agradeço pelos incentivos e orações para que eu vencesse mais uma etapa em minha vida, sei que a ausência, a distância, foi muito difícil no começo, mas com o tempo pudemos verificar como uma faz falta a outra, e a importância de você em minha vida, amo você e agradeço pelo carinho, preocupação e paciência que teve comigo durante essa etapa. Por entender que a minha distância teve um motivo nobre, e por saber que nossa ligação e amizade tem laços inquebráveis
Você é fundamental em minha jornada. Obrigada por seu amor e por sua amizade!*

*Vou te contar meus olhos já não podem ver
Coisas que só o coração pode entender
Fundamental é mesmo o amor é impossível ser feliz sozinho,
O resto é mar, é tudo que não sei contar
São coisas lindas que eu tenho pra te dar
Vem de mansinho à brisa e me diz é impossível ser feliz sozinho.”
(Wave -Tom Jobim)*

Aos Meus Familiares

Família...

O bem maior de ter uma comunidade unida pelos laços sanguíneos e protegidas pelas bênçãos divinas. Um canto de paz no mundo, o aconchego da morada, a fonte de descanso e a renovação das energias.

A toda a minha família, obrigada por caminharem ao meu lado! Mesmo distante, de alguma forma estiveram presentes nessa caminhada. Agradeço pelas orações, pelo amor e carinho. Amo vocês.

*A família é o caminho da esperança.
A certeza que se tem pra onde voltar.
Não há nada mais divino e
é por isso que a presença de Jesus
nela está. (Deus é família)*

Ao Meu Namorado e Melhor Amigo

Artur

Por ter compreendido e respeitado minha dedicação aos estudos, e acima de tudo me apoiando e estimulando a ir cada vez mais longe. Serei eternamente grata pelo seu carinho, compreensão, amizade, paciência em todos os momentos, sempre estando ao meu lado para me ouvir, me apoiando, ajudando em tudo que precisei. Por ter respeitado os momentos que estava ausente para realização deste trabalho e pelo imenso amor depositado em nossa relação, que com certeza saberei retribuir.

*Você é minha força, meu guia, Estando presente em todos os momentos deste trabalho, nos momentos de alegria e de tristeza, assim como em todo o desenvolvimento do meu curso, você se tornou uma pessoa essencial em minha vida, sempre me motivando nos momentos difíceis. Muito obrigada por estar ao meu lado! Obrigada por ter, numa pessoa só, a soma de tudo que às vezes procuramos em muitas. É muito bom poder contar com você nos momentos difíceis, fáceis, alegres e tristes, **Amo Você!***

*“Ainda que fale a língua dos homens e dos anjos,
e não tiver amor, serei como o sino que ressoa ou prato que retine. Ainda que eu tenha o dom de profecia
e saiba todos os mistérios e
todo o conhecimento, e tenha uma fé capaz de mover montanhas,
se não tiver amor, nada serei...”*

Aos meus colegas e amigos que torceram sempre por mim. A todos que de alguma maneira sonharam este sonho comigo e tiveram a oportunidade de vivê-lo, meus sinceros agradecimentos.

Obrigada! Nada Seria possível sem vocês!

*“Deus não disse que a viagem seria fácil mas,
Ele disse que a chegada valeria a pena”.* **(Max Lucado)**

Ao meu querido orientador *Professor Dr. Valdir Gouveia Garcia*, um dos melhores professores e orientadores que poderia ter, uma pessoa *preciosa!* Nosso maior exemplo de garra e determinação.

Que transcendendo o papel de orientador demonstrou que ensinar é mostrar que é possível. Aprender é tornar possível a si mesmo.

Toda a minha admiração por sua sabedoria e profissionalismo acadêmico se torna secundária quando contemplo o seu lado humano simples, sensato e honesto, que contribui para construir um mundo bem mais bonito.

Professor Valdir eu lhe agradeço pela sua dedicação, disponibilidade e competência na orientação deste meu trabalho e de todas as outras coisas que aprendi com o senhor, por sua amizade, que se tornou um grande amigo em minha vida, desde a graduação, na minha iniciação científica e agora no mestrado, sempre me mostrando o melhor caminho, com um entusiasmo contagiante, sempre alegre, comemorando as vitórias de tudo e de todos, nunca mediu esforços para que estivéssemos bem e que nada nos faltasse, muito obrigada por cada palavra de estímulo e sorrisos, que quando eu achava que tudo estava difícil o senhor sempre abria um sorriso e dizia: calma, tudo vai dar certo.

O senhor me mostrou uma grande virtude: a humildade, e seu apreço pelo ser humano e pela pesquisa, mais do que comoventes, serão objeto de reflexão por toda minha vida.

Por ser esse professor maravilhoso, de um coração enorme, admirável, por esta formação orientada com amor, valores e conhecimentos eternos, por quem a convivência só fez aumentar o respeito e a admiração pelo senhor.

Um mestre para toda a vida ... Tenho muito orgulho e agradeço muito de ter sido sua aluna e me alegro quando falo do senhor com os que o conhecem, pois todos compartilham a pessoa maravilhosa que o senhor é.

O senhor é um exemplo a ser seguido,

Para mim foi um privilégio, a oportunidade da sua convivência, uma verdadeira bênção de Deus, encontrar o senhor em minha jornada acadêmica. Por mais que eu procure não encontrarei palavras suficientes que expressem o meu agradecimento ao senhor, por tudo que fez por mim. Um ser humano fantástico e iluminado por Deus!!

Assim, peço a Deus que inunde toda a sua vida de Graça, Paz, Amor, Alegria e bênçãos sem fim. E que Deus lhe permita realizar os desejos de seu coração.

Professor Valdir seu exemplo ajudou-me chegar até aqui.

Obrigada por acreditar em mim!

*“Às vezes estamos sem rumo,
mas alguém entra em nossa vida
e se torna o nosso destino.”
(Luiz Fernando Veríssimo)*

Ao querido **Prof. Dr. Álvaro Francisco Bosco**, pela distinção pessoal e profissional com que sempre me acolheu. Uma grande pessoa! Muito obrigada pelo conhecimento partilhado sempre, por seus ensinamentos transmitidos, com a sabedoria e simplicidade de um grande mestre, por ser essa pessoa maravilhosa, competente, que sempre buscou nos ensinar o melhor e com muita força de vontade, sempre disposto a ajudar, com paciência e confiança.

Obrigada pela agradável convivência toda semana, é uma alegria poder estar com o senhor sempre, essa pessoa calma, carinhosa, alegre que o senhor é!

O senhor é um exemplo de ser humano, de professor, clínico e de família. Uma pessoa íntegra e humilde. Muito obrigada por tudo, jamais esquecerei tudo o que o senhor fez e faz pela gente, nos ensinando sempre, pelo carinho e por sua grande amizade! Nem sei como agradecer o senhor por toda essa disponibilidade e a honra de poder fazer parte desta família da periodontia, tendo o senhor também como professor.

Obrigada do Fundo do meu coração!

À **Prof.^a Dra. Maria José Hitomi Nagata**, uma respeitosa professora, ética, justa, apaixonada pelo seu trabalho, exemplo de dignidade, e competência profissional, agradeço pela cooperação, conhecimento, atenção e dedicação inigualável.

Pelo convívio, sempre presente e disponível, fazendo o máximo para nos ajudar e ensinar, nos passando um pouco do seu conhecimento científico, sendo um exemplo de dedicação à pesquisa e de pessoa, estando sempre preocupada em melhorar o nosso curso.

Obrigada por tudo.

À minha também orientadora *Prof.^a Dr.^a Leticia Helena Theodoro,*

Ah como é bom encontrar pessoas como você Leticia em nossa caminhada.... sua presença me deixa calma, sua bondade me inspira, seu carinho não me deixa desistir...uma pessoa mais que especial que tive a honra de conhecer e trabalhar junto....sem seu esforço e dedicação jamais estaria aqui hoje, muito obrigada por toda a ajuda proporcionada e pela sua amizade... Sempre fez com que nossos momentos fossem bons como sonhos... Meu eterno carinho, reconhecimento e agradecimento por tudo o que você fez por mim e por este trabalho!

Existem pessoas que quando passam por nossas vidas, deixam um pouco de si e levam um pouco de nós, e você é uma delas. Você é uma pessoa maravilhosa, muito especial que me ensinou muito durante esses anos. Uma pessoa como poucas, mulher batalhadora, inteligente, com um coração enorme. Profissional exemplar. Agradeço toda a atenção, carinho e ensinamentos transmitidos.

Muito obrigada pelo convívio maravilhoso, por me ajudar no desenvolvimento do trabalho, com os meus artigos, me ajudando em tudo que precisei, pela amizade e confiança, muitas vezes deixando seus afazeres para me atender, sou muita grata à você por tudo que me ajudou durante o mestrado, nem tenho palavras para lhe agradecer por tudo que fez por mim.

Leticia você se tornou uma grande amiga, uma pessoa muito especial para mim.

Eu agradeço a Deus a possibilidade de estar ao seu lado, de aprender com você e levarei para sempre o seu exemplo de dignidade, ética, alegria e humanidade. Muito Obrigada.

Ao **Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida**, um exemplo de pesquisador, agradeço pela orientação, por sua grande amizade, carinho, respeito, pelo constante apoio, conhecimentos transmitidos, sua imensa colaboração durante vários momentos desta pesquisa, pela confiança, e por sua presença sempre tranqüila e amiga, cuja convivência proporcionou uma grande admiração. Muito Obrigada por tudo.

Ao Professor **Edilson Ervolino**, Obrigada por toda a ajuda, paciência e ensinamentos enriquecedores para que meu trabalho fosse finalizado. Professor extremamente competente, o qual tenho orgulho de ser aluna. Muito obrigada por compartilhar seus conhecimentos comigo.

...pelos preciosos ensinamentos transmitidos,
pela dedicação e paciência durante estes anos de convivência
e pela certeza de que se descortina à nossa frente um mundo de idéias...

Ao meu amigo *Leandro Araújo Fernandes*, obrigada por tudo que você fez por mim, me ajudando desde o começo com tudo, como na iniciação científica, desde achar artigo na internet lembra, até as cirurgias, cortar bloco, escrever...um exemplo de pessoa. Eu agradeço muito por tudo que me ensinou, pelo convívio, respeito e pelo apoio em tudo, sempre disposto a ajudar, mesmo depois que você estava longe, você me ajudou muito mesmo, com meus artigos com esse meu trabalho, com tudo, obrigada pela disponibilidade, preocupação e carinho, você é um grande amigo que vou levar para vida toda, uma pessoa maravilhosa, torço muito por você. Agradeço por ter você como amigo você é uma pessoa muito especial.

Ao meu amigo *Eriwan Clementino Gualberto Junior*, Uma pessoa muito especial, determinado e que sempre está disposto a nos ajudar! Uma pessoa brilhante, com talentos admiráveis. Muito obrigada por tudo, você foi uma das pessoas essenciais neste meu trabalho, me ajudando com todas as minhas coisas. Você me ensinou muito durante todos esses anos, uma ótima companhia que eu sempre pude contar, obrigada por todos os momentos que convivemos, jamais terei como agradecer toda a ajuda, todas as gargalhadas, alegrias, até os cansaços, na periodontia, desde nos laboratórios até nas padarias.. rrsrrs, muitas vezes deixava de fazer suas coisas para me ajudar. Obrigada pela grande amizade que cultivamos, pelo respeito, carinho e aprendizado um com o outro, pelo grande apoio, torço muito por você. Jamais teria feito meu trabalho sem você!

Obrigada pelo carinho e companhia sempre!

“A gente não faz amigo
reconhece-os”

(Vinicius de Moraes)

À amiga **Paula Faleiros (Paulinha)**, pessoa maravilhosa, com quem sempre pude contar sempre feliz e sorrindo, obrigada por me ajudar com tudo, no meu projeto, nas cirurgias podendo me ajudar a anestesiá-los... Pelas conversas no fim de tarde, por sua amizade sincera e verdadeira, Desejo toda a felicidade do mundo à você. Você é muito especial! Obrigada pela convivência, carinho e companhia.

À amiga **Carol**, uma pessoa dedicada, alegre, prestativa, obrigada pela amizade e companheirismo, uma pessoa muito especial.

À amiga **Natália Pola**, Pessoa alegre, guerreira, obrigada pela disponibilidade, amizade, companheirismo na periodontia e até mesmo na academia, pelas boas gargalhadas, você é muito especial.

À amiga **Natalia Campos**, uma pessoa iluminada, admirável, obrigada por toda a ajuda, carinho, otimismo, ensinamentos, pelo convívio maravilhoso, energia positiva, e alegria que você sempre demonstrou e por sua grande amizade. Torço muito por você!

À amiga **Vivian Novaes**, é bom saber que temos amigos em quem podemos confiar... Pessoas que nos apóiam e nos acolhem com tanto carinho, uma grande amiga, obrigada pela companhia, amizade, por me ajudar com meu projeto, com os ratos, Você se tornou uma pessoa muito especial para mim.

Ao **Samuel**, uma pessoa alegre, sempre de bem com a vida, muito obrigada pela ajuda, amizade, e convivência.

Podem ter certeza que aprendi muito mesmo com cada um de vocês, nos tornamos uma família dentro da periodontia, trabalhando em grupo. Obrigada do fundo do meu coração!

“...Que bom que não estou sozinho.
Se você não existisse, não perceberia o quanto preciso corrigir-me.
Que bom que somos uma equipe,
que necessitamos uns dos outros,
que buscamos caminhos e alternativas para transformar e crescer...”
(Autor desconhecido)

A *todos os professores do mestrado,*

Vocês foram importantes e contribuíram muito em todo meu aprendizado e caminhada durante estes anos.

À *todos os colegas de mestrado,*

Agradeço pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e pela amizade criada neste período.

*O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".*

(Fernando Pessoa)

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas do ex Diretor **Prof. Titular Pedro Felício Estrada Bernabé** e da Senhora Vice-Diretora **Profa. Adj. Ana Maria Pires Soubhia**, e atuais Diretor **Profa. Adj. Ana Maria Pires Soubhia** e Vice-Diretor **Prof. Adj. Wilson Roberto Poi** por proporcionar a realização desta pesquisa e pelos anos de graduação, pós-graduação e crescimento profissional.

À atual coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa da Professora **Maria José Hitomi Nagata**, por sua dedicação ao Curso e gosto pela docência.

Aos colegas do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nas Áreas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Integrada, Estomatologia, Ortodontia e Prótese Dental.

Ao **Bruno Theodoro Luciano** pela ajuda nas traduções de inglês dos meus trabalhos, muito obrigada.

Aos Funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - **Cleide, Dirce, Gilmar e Paulo** obrigada pela ajuda e disposição.

A todos os funcionários e estimados amigos da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Ana Claudia Grieger Manzatti, Cláudio Hideo Matsumoto, Cláudio Marciel Júnior, Fernando Fukunishi, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da Silva Freitas, Luzia Anderlini e Maria Cláudia de Castro Benez**, pela atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Diogo Reatto, Marina Midori Sakamoto Hawagoe e Valéria Queiroz Marcondes Zagatto**, pelo excelente trabalho, atenção dispensada, grande disposição em atender e ótimo relacionamento.

A todos os funcionários de todos os setores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por proporcionarem o conforto e o bom funcionamento desta instituição

Aos funcionários e professores do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por sempre me acolherem tão bem.

Aos funcionários do Biotério, **Camilo, Arnaldo**, que contribuíram para realização da parte experimental.

Ao Sr. **Odair**, sempre dispostos a nos ensinar e ajudar, obrigada pela constante disposição e convivência.

Aos professores da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, pelos ensinamentos durante todo o decorrer do curso.

Aos pacientes, que nos depositando confiança, deram-nos a oportunidade de aprender e a satisfação de tratá-los no decorrer deste curso.

Aos animais, por servir à humanidade com suas vidas.

À **PROPG** pela concessão de Bolsa de Estudo.

À **FAPESP**, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo n° 2010/12570-8) e auxílio (Processo n° 2010/13120-6) para realização deste trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram durante todo o decorrer do curso e que passaram em minha vida e colaboraram no desenvolvimento da pessoa que hoje sou.

Finalmente, agradeço à **Deus**, ser superior, por ter me concedido essa oportunidade e ter colocado todas essas pessoas maravilhosas em meu caminho.

OBRIGADA!

*Cada pessoa que passa em nossa
vida, passa sozinha
pois cada pessoa é única para nós
e, nenhuma substitui a outra.
Cada pessoa que passa em nossa vida,
passa sozinha
mas não se vai só, nem nos deixa só
leva um pouco de nós e deixa um pouco
de si mesma.
Há as que deixam muito,
mas não há as que deixam nada
Há as que levam muito
mas não há as que levam nada
Essa é a mais bela responsabilidade
de nossas vidas
e a prova tremenda de que as almas
não se aproximam ao acaso.
(Chaplin)*

“Ser mestre é ser um sonhador...
Crer, mais além, no espírito do homem.
Crer, que um dia, ao final do caminho,
Podemos transferir esta tocha a um discípulo,
...Outro sonhador.”

(Lídia Maria Riba)

Se eu pudesse...

" Se eu pudesse deixar algum presente a vocês...

Deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora.

Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.

Deixaria a capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para vocês se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável:

Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação.

E, quando tudo mais faltasse, um segredo:

O de buscar no interior de si mesmo,

a resposta e a força para encontrar a saída."

(Gandhi)

Longo, M. **Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico dos efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida em ratos.** [Dissertação]. Araçatuba: UNESP – Universidade Estadual Paulista; 2012.

Este estudo avaliou histomorfometricamente e imunoistoquimicamente os efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), usando dois fotossensibilizadores com diferentes concentrações, como coadjuvante no tratamento da periodontite induzida em ratos. A doença periodontal (DP) foi induzida por adaptação de uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior esquerdo em 162 ratos. Os animais foram randomicamente divididos em 9 grupos: **G1** - raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação com soro fisiológico; **G2** - RAR e irrigação com azul de metileno (MB) (100 µg / ml); **G3** - RAR e irrigação com MB (10 mg / ml); **G4** - RAR e irrigação com azul de toluidina- O (TBO) (100 µg / ml); **G5** - RAR e irrigação com TBO (10 mg / ml); **G6** – RAR, irrigação com MB (100 µg / ml) e Laser (InGaAlP; 660nm; 4,94J/cm²/ponto; 24 segundos); **G7** – RAR, irrigação com MB (10 mg / ml) e Laser; **G8** – RAR, irrigação com azul de TBO (100 µg / ml) e Laser; **G9** – RAR, irrigação com TBO (10 mg/ml) e Laser. A área de perda óssea (PO) na região de furca (RF) foi analisada histomorfometricamente. A quantidade de osteoclastos e os reguladores locais da atividade osteoclástica foram avaliados qualitativamente na RF via detecção imunoistoquímica de TRAP e RANKL-OPG, respectivamente. Os dados da PO foram analisados estatisticamente ($P < 0,05$). Os animais do G1 apresentaram maior PO ($2,17 \pm 0,54$) comparado ao G6 ($0,55 \pm 0,14$), G7 ($0,77 \pm 0,17$) e G8 ($0,73 \pm 0,17$) aos 7 dias e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com fotossensibilizadores ou aPDT. A análise imunoistoquímica qualitativa revelou uma tendência a uma diminuição na imunorreatividade de RANKL e TRAP e um aumento

na expressão de OPG nos grupos tratados com aPDT/MB. A aPDT usando o MB como uma terapia coadjuvante a RAR agiu como “downregulador” dos mecanismos moleculares que controlam a reabsorção óssea, reduzindo a PO na área de furca em ratos com periodontite induzida, enquanto que a aPDT mediada pelo TBO foi capaz de reduzir a PO apenas em baixa concentração.

Palavras chaves: Doença Periodontal, Fotoquimioterapia; Lasers, Perda óssea alveolar.

Longo, M. **Histomorphometric and Immunohistochemical study of the effect of the antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of the induced periodontal disease in rats.** [Dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2012.

The aim of this study was to evaluate histomorphometric and immunohistochemical the effects of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), using two photosensitizers with different concentrations, as an adjunct in the treatment of induced periodontitis in rats. Periodontal disease was induced by placing a ligature around the left first mandibular molar in 162 rats. The animals were randomly divided into nine groups: G1- scaling and root planning (SRP) and irrigation with saline solution, G2- SRP and irrigation with methylene blue (MB) (100 µg/ml); G3- SRP and irrigation with MB (10 mg/ml); G4- SRP and irrigation with toluidine blue O (TBO) (100 µg/ml); G5- SRP and irrigation with TBO (10 mg/ml); G6- SRP, irrigation with MB (100 µg/ml) and Laser (InGaAlP; 660 nm; 4.94 J/cm²/point; 24 seconds); G7-SRP, irrigation with MB (10 mg/ml) and Laser; G8- SRP, irrigation with TBO (100 µg/ml) and Laser; G9- SRP, irrigation with TBO (10 mg/ml) and Laser. The area of bone loss (BL) in the furcation region (FR) was histometrically analyzed. The amount of osteoclasts and the local regulator of osteoclastic activity were evaluated qualitatively in the FR via immunohistochemical detection of TRAP and RANKL-OPG, respectively.

Data were analyzed statistically (P<0.05). The animals of G1 presented more BL (2.17±0.54) compared to animals of G6 (0.55±0.14), G7 (0.77±0.17) and G8 (0.73±0.17) at 7 days. There was no statistically significant difference between the groups treated with photosensitizers or aPDT. The qualitative immunohistochemical analysis revealed that there was a tendency to decrease immunostaining of RANKL and

TRAP, and a tendency to increase expression of OPG in the groups treated with aPDT/MB. The aPDT using the MB, as an adjunctive therapy to SRP was effective to act as a downregulator in local molecular mechanisms that control bone resorption, reducing bone loss (BL) in the furcation area in rats with induced periodontitis, while the aPDT mediated by TBO was able to reduce the BL only in low concentrations.

Key words: Alveolar bone loss, Lasers, Periodontitis, photochemotherapy.

Manuscript for publication

Tabela 1	Médias e desvio padrão (M±DP) dos dados histométricos da perda óssea alveolar (mm ²) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo com doença periodontal induzida, de acordo com cada grupo, tratamento e período.	68
----------	--	----

Manuserito para publicação

- Figura 1 Aspecto histológico da região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal induzida. **A-D**: fotomicrografias de cortes longitudinais da região de furca, corados pelo tricrômico de Masson, evidenciando a magnitude da perda óssea alveolar apresentada aos 7 dias pelos grupos G1 (A), G6 (B), G7 (C) e G8 (D). Abreviações: INF, infiltrado inflamatório; TO, tecido ósseo. Barras de escala: A-D = 500 μ m. 69
- Figura 2 Aspecto histopatológico detalhado da região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal induzida. **A-B**: fotomicrografias de cortes longitudinais da região de furca, corados pela hematoxilina e eosina, evidenciando o grau de inflamação e as características histológicas apresentadas pelo tecido conjuntivo e ósseo dos grupos G1 (A) e G6 (B) aos 7 dias. **C-D**: fotomicrografias em maior aumento das regiões indicadas em A e B. Abreviações: INF, infiltrado inflamatório; ON, tecido ósseo neoformado; TO, tecido ósseo. Barras de escala: A-B = 500 μ m e C-D = 200 μ m. 70

Manuscríto para publicação

- Figura 3** Imunomarcaco de TRAP, RANKL e OPG na regio de furca do primeiro molar inferior com doena periodontal induzida. **A:** G1 (RAR) – 7D – fotomicrografia evidenciando osteoclastos –TRAP positivos (setas pretas). **B:** G6 (RAR/aPDT-MB) – 7D - fotomicrografia evidenciando diminuio na quantidade de osteoclastos – TRAP positivas. **C:** G1 (RAR) – 7D – fotomicrografia evidenciando imunomarcaco de RANKL (setas verdes). **D:** G6 (RAR/aPDT-MB) – 7D – fotomicrografia evidenciando diminuio na imunomarcaco de RANKL (setas verdes). **E:** G1 (RAR) – 15D – fotomicrografia evidenciando imunomarcaco para OPG (setas vermelhas). **F:** G6 (RAR/aPDT-MB) – 15D – fotomicrografia evidenciando aumento na imunomarcaco para OPG (setas vermelhas). Abreviaoes: aPDT, terapia fotodinmica antimicrobiana; MB, azul de metileno; RAR, raspagem e alisamento radicular; TO, tecido ósseo. Barras de escala = 40 µm. 71

Lista de Abreviaturas e Siglas

DP - Doença Periodontal.

RAR - Raspagem e Alisamento Radicular.

aPDT - Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

FS - Fotossensibilizador.

PS - Profundidade de Sondagem.

SS - Sangramento a Sondagem.

GI - Ganho Clínico de Inserção.

nm - Nanometro. Bilionésima parte do metro, utilizado para medir comprimento de onda.

MB -Azul de Metileno.

TBO - Azul de Toluidina-Orto.

DNA - Ácido desoxiribonucleico.

µg/ml - Microgramas por mililitros.

PO - Perda Óssea.

mg/ml - Miligramas por mililitros.

g - Grama.

ml - Mililitros, equivalente à milésima parte do litro.

Lista de Abreviaturas e Siglas

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

LLLT - Terapia a Laser em Baixa Intensidade.

InGaAlP - Índio, Gálio, Alumínio, Fósforo.

AsGaAl - Arseneto de Gálio e Alumínio.

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

J/cm² - Joules por centímetro quadrado.

Laser contínuo - Laser que emite energia continuamente.

Joule - Unidade de energia, abreviada como J.

mg/Kg - Miligramas por quilo.

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético.

H&E - Hematoxilina e Eosina.

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

OPG – Osteoprotegerina.

TRAP - Fosfatase Ácida Tartarato Resistente.

RANKL - Receptor ativador de NF-Kappa B ligante.

RANK - Receptor ativador de NF-Kappa B.

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro.

Lista de Anexos

- Anexo A Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) 72
- Anexo B Normas de publicação segundo o Periódico “Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology”. 73

Sumário

Manuscrito para publicação	33
Página de título	34
Resumo	35
Introdução	37
Materiais e Métodos	40
Resultados	46
Discussão	50
Agradecimentos	56
Referências	57
Anexos	72

Manuscrito
*para Publicação*¹

¹ Normalização Segundo a Revista Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.

Título

Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico dos efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da doença periodontal induzida em ratos.

Autores:

Valdir Gouveia Garcia ^{a,b,*}, Mariéllen Longo ^a

^aGEPLO – Group of study and research of lasers in dentistry, Department of Surgery and Integrated Clinic - Division of Periodontics; São Paulo State University (UNESP) – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

^bDepartment of Periodontology, University Center of the Educational Foundation of Barretos (UNIFEB), Barretos, SP, Brazil

***Corresponding author:**

Valdir Gouveia Garcia

Address: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP:

Rua Jose Bonifácio 1193, Centro.

CEP: 16050-300 Araçatuba, SP, Brasil.

Tel/Fax 55- 1836363239

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

Número de figuras: 2

Número de tabela: 1

Running title: Efeito da aPDT na periodontite induzida em ratos.

Resumo

Este estudo avaliou histomorfometricamente e imunoistoquimicamente os efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), usando dois fotossensibilizadores com diferentes concentrações, como coadjuvante no tratamento da periodontite induzida em ratos. A doença periodontal (DP) foi induzida por adaptação de uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior esquerdo em 162 ratos. Os animais foram randomicamente divididos em 9 grupos: **G1** - raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação com soro fisiológico; **G2** - RAR e irrigação com azul de metileno (MB) (100 µg / ml); **G3** - RAR e irrigação com MB (10 mg / ml); **G4** - RAR e irrigação com azul de toluidina- O (TBO) (100 µg / ml); **G5** - RAR e irrigação com TBO (10 mg / ml); **G6** – RAR, irrigação com MB (100 µg / ml) e Laser (InGaAlP; 660nm; 4,94J/cm²/ponto; 24 segundos); **G7** – RAR, irrigação com MB (10 mg / ml) e Laser; **G8** – RAR, irrigação com TBO (100 µg / ml) e Laser; **G9** – RAR, irrigação com TBO (10 mg/ml) e Laser. A área de perda óssea (PO) na região de furca (RF) foi analisada histomorfometricamente. A quantidade de osteoclastos e os reguladores locais da atividade osteoclástica foram avaliados qualitativamente na RF via detecção imunoistoquímica de TRAP e RANKL-OPG, respectivamente. Os dados da PO foram analisados estatisticamente (P<0,05). Os animais do G1 apresentaram maior PO (2,17±0,54) comparado ao G6 (0,55±0,14), G7 (0,77±0,17) e G8 (0,73±0,17) aos 7 dias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com fotossensibilizadores ou aPDT. A análise imunoistoquímica qualitativa revelou uma tendência a uma diminuição na imunorreatividade de RANKL e TRAP e um aumento na expressão de OPG nos grupos tratados com aPDT/MB. A aPDT usando o MB como uma terapia coadjuvante a RAR agiu como “downregulador” dos mecanismos moleculares que controlam a reabsorção óssea, reduzindo a PO na área de furca em ratos com periodontite induzida, enquanto

que a aPDT mediada pelo TBO foi capaz de reduzir a PO apenas em baixa concentração.

Palavras chaves: Doença Periodontal, Fotoquimioterapia; Lasers, Perda óssea alveolar.

1. Introdução

Periodontite é uma doença que leva ao colapso das estruturas de suporte do dente. É desencadeada por espécies bacterianas periodontopatogênicas e influenciada pela resposta imune do hospedeiro causando a destruição dos tecidos [1]. O tratamento convencional da doença periodontal (DP) é baseado na redução da microbiota patogênica pela raspagem e alisamento radicular (RAR) [2]. No entanto, a terapia mecânica utilizada isoladamente pode falhar em eliminar as bactérias patogênicas localizadas no tecido mole, e também em áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais, tais como áreas de furca e depressões radiculares [3,4].

Considerando estas limitações, métodos adjuvantes ao tratamento periodontal convencional, que promovam a eliminação de patógenos periodontais, tais como antibióticos locais e sistêmicos, têm sido investigados [5-7]. Porém, esta terapia pode trazer efeitos colaterais indesejáveis e desenvolvimento de resistência bacteriana [8], como conseqüência, existe um crescente interesse no desenvolvimento do tratamento antimicrobiano alternativo da periodontite [9].

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) requer dois componentes: uma fonte de luz e um fotossensibilizador (FS) capaz de se ligar à células-alvo. A fotossensibilização pode ser importante no tratamento da periodontite agressiva, pois o FS é capaz de penetrar através do epitélio e do tecido conjuntivo [10]. O efeito foto-destrutivo nas diferentes espécies patogênicas periodontais é mediado por reações: Tipo I (iniciada por superóxido, hidroxila aniônica ou radicais livres) ou pela reação tipo II (iniciada pelo oxigênio singlete) [11,12]. O oxigênio singlete é responsável por danos irreversíveis na

membrana citoplasmática bacteriana, incluindo modificação de proteína, cadeia respiratória e alterações de ácido nucleico [12].

Dentre as principais vantagens da aPDT está sua especificidade à células-alvo sem efeitos colaterais. Sua atividade é iniciada somente quando exposta à luz e não leva a seleção de espécies de bactérias resistentes [13]. A aPDT pode conseguir melhor acesso às áreas não alcançadas pela terapia convencional além disso, a seletividade bacteriana do FS evita danos aos tecidos do hospedeiro na área de infecção [14].

Resultados satisfatórios têm sido observados com o uso da aPDT no tratamento da DP experimental [10,15-18], inclusive em condições sistêmicas adversas como a diabetes melitus [19], imunossupressão [20] e alterações sistêmicas mediadas pela nicotina [21]. Porém, estudos clínicos com a aPDT como tratamento coadjuvante da DP são inconclusivos e têm mostrado dados controversos. Em pacientes com periodontite crônica o uso coadjuvante da aPDT mostrou melhor resultados nos parâmetros profundidade de sondagem (PS), sangramento a sondagem (SS) e ganho clínico de inserção (GI) [22]. Chondros et al. [23] relataram que uma única aplicação da aPDT em pacientes de manutenção levou a uma redução da PS. Porém, uma recente metanálise concluiu que a aPDT como tratamento independente ou adjunto não é superior a RAR [24].

Os estudos disponíveis atualmente apresentam uma série de limitações que dificultam a comparação entre si. O tipo de FS, a concentração do FS, tempo de permanência do FS e pré-irradiação, laser utilizado, comprimento de onda, potência e tempo de irradiação têm variado entre os trabalhos. Isto pode ser uma explicação para a discrepância de resultados. A efetividade do FS para o tratamento de infecções requer que ele seja catiônico com cargas positivas capaz de se ligar e penetrar em diferentes classes de células microbianas [25]. A variedade de tipos e concentrações dos

fotossensibilizadores encontrados na literatura alerta para a necessidade de estudos que esclareçam melhor a sua dosagem bem como a sua duração de administração [24].

Os principais fotossensibilizadores estudados são: derivados de hematoporfirina (620-650nm), fenotiazínicos, (como azul de toluidina-O e azul de metileno - 620-700nm) e cianina (600-805nm) [26-28]. O azul de metileno (MB) e azul de toluidina-O (TBO) como FS têm sido utilizados com sucesso na aPDT contra vários tipos de bactérias [29,30]. Estes fotossensibilizadores podem reagir com os polissacarídeos de bactérias gram-negativas e causar danos a estas substâncias na presença de luz ou não [29,31].

O MB interage com DNA [32] e o TBO [33] tem efeito sobre a membrana plasmática. Os corantes fenotiazínicos têm sido os mais avaliados em estudos recentes sobre aPDT coadjuvante ao tratamento periodontal. Pesquisas do nosso grupo realizadas em animais [15,16,19-21] utilizando-se o MB e o TBO na concentração de 100 µg/ml evidenciaram resultados promissores da aPDT no controle da perda óssea (PO). Por outro lado estudos em humanos em sua maioria [34,35,23] utilizam o TBO a 10mg/ml, o que corresponde a uma concentração 100 vezes maior a utilizada em animais.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar histologicamente, histometricamente e imunoistoquimicamente a influência do MB e TBO, em duas concentrações diferentes (100 µg e 10 mg/ml), como agentes fotossensibilizadores para a aPDT no tratamento adjunto da DP induzida em ratos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Foram utilizados 162 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250 a 300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram mantidos num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 5 dias. Todos os protocolos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, (protocolo nº 002326-2010). A pesquisa foi realizada seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a legislação em vigor.

2.2. Protocolo Experimental

2.2.1. Protocolo da doença periodontal experimental e grupos experimentais

Para todos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de 0,4 ml/ 100 g de peso corporal de cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa – EUA) associado à 0,2 ml/ 100g de peso corporal de cloridrato de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil).

Nos primeiros molares inferiores esquerdos foi induzida a DP, com um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão nº10; Coats Corrente, SP, Brasil) mantido em posição sub-gengival por meio de nós cirúrgicos para induzir periodontite experimental [20].

Após 7 dias da indução da DP experimental, a ligadura adaptada nos primeiros molares inferiores esquerdos dos animais de todos os grupos foi removida. A seguir os animais foram divididos aleatoriamente, seguindo uma tabela gerada em computador em 9 grupos. Para melhor padronização, o animal 1 foi a primeira escolha, seguido pelos animais 2 e 3. Os 9 grupos de 18 animais cada um foram definidos de acordo com os seguintes tratamentos locais a serem realizados nos primeiros molares inferiores esquerdos: G1 – raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação com 1 ml de soro fisiológico; G2 - RAR, irrigação com 1 ml de MB na concentração de 100 µg / ml; G3 – RAR, irrigação com 1 ml de MB na concentração de 10 mg / ml; G4 - RAR , irrigação com 1 ml de TBO na concentração de 100 µg / ml; G5 – RAR, irrigação com 1 ml de TBO na concentração de 10 mg / ml; G6 – RAR, irrigação com 1ml de AM na concentração de 100 µg / ml e após 1 minuto, irradiação com laser (aPDT); G7 – RAR, irrigação com 1 ml de MB na concentração de 10 mg / ml e após 1 minuto, irradiação com laser (aPDT); G8 – RAR, irrigação com 1 ml de TBO na concentração de 100 µg / ml e após 1 minuto, irradiação com laser (aPDT); G9 – RAR, irrigação com 1 ml de TBO na concentração de 10 mg / ml e após 1 minuto, irradiação com laser (aPDT).

2.2.2. Raspagem e alisamento radicular

Nos molares de todos os animais foi realizada a RAR com curetas manuais mini – Five #1-2 (Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, EUA), através de 10 movimentos de tração disto-mesial nas faces vestibular e lingual. As áreas interproximais e de furca foram raspadas com as mesmas curetas através de movimentos de tração cérvico-oclusais. Os procedimentos de RAR foram realizados por um mesmo operador experiente.

2.2.3. Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

Para o tratamento com aPDT, foi realizada irrigação com 1ml MB e TBO nas duas concentrações de 100 µg/ml e 10 mg/ml. A irrigação foi feita com o auxílio de seringa de insulina, tomando-se o cuidado de dirigir a ponta da agulha no espaço dente/tecido gengival. Decorrido 1 minuto após a permanência da droga no tecido, utilizou-se o tratamento com laser em baixa intensidade (LLLT).

O Laser utilizado no presente estudo foi o TheraLase® (DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, São Paulo, Brasil - Auxílio FAPESP – Processo 2008/00297-5) que possui as seguintes características: Emissores de InGaAlP 660 nm, laser visível e AsGaAl 808nm, infra-vermelho de comprimento de onda, potência útil do emissor 100mW, potência máxima 10 a 100 J/cm², emissão contínua e pulsada e fibra ótica de 600 µ de diâmetro.

A luz laser foi direcionada ao interior da bolsa periodontal em 3 pontos equidistantes na superfície vestibular e 3 pontos equidistantes na superfície lingual, seguindo o seguinte protocolo de tratamento: Comprimento de onda: 660nm (laser visível), Potência: 35 mW, Modo de aplicação: Laser contato – pontual, Modo de operação: Laser contínuo, Energia: 0,14 J, Energia total: 0,70 J, Área do spot : 0,0283 cm², Densidade energética: 4,9 J/cm², Tempo de exposição por ponto: 4 s, Tempo de exposição total: 24 s.

2.2.4. Períodos experimentais

Seis animais de cada grupo foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após a realização dos tratamentos locais da DP pela administração de uma dose letal de Tiopental (150 mg/kg de peso corporal) (Cristália, Ltda., Itapira, SP, Brasil). A mandíbula de cada animal foi removida, separada em duas partes removidas e fixadas em formol tamponado a 4% por um período de 48 horas.

2.3. Processamento Laboratorial

Após fixação, os espécimes obtidos foram lavados em água corrente e descalcificados em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 18% por 6 a 8 semanas. Após inclusão dos espécimes em parafina, cortes semi-seriados (4 µm) foram obtidos no sentido méso-distal. Alguns cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e Tricrômico de Masson (TM) para análise por microscopia de campo claro e outros foram submetidos ao processamento para análise imunoistoquímica.

2.4. Análise dos Resultados

2.4.1. Análise histomorfométrica

Os cortes corados pela técnica de H&E foram analisados para verificar a PO e as características do ligamento periodontal na região de furca dos primeiros molares. As fibras colágenas foram analisadas nos cortes corados pela técnica de TM. Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca foi evidente, cinco cortes equidistantes de cada espécime foram selecionados para análise histomorfométrica. Esta seleção foi realizada por um examinador treinado e cego ao tratamento efetuado. Outro examinador calibrado e cego ao tratamento efetuado realizou a análise histomorfométrica. A PO na região de furca foi histometricamente determinada utilizando um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany).

A PO de cada espécime foi medida três vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados [16]. As três medidas obtidas foram analisadas estatisticamente para análise de concordância com nível de 5% de significância (Teste Kappa).

2.4.2. Análise Imunoistoquímica

Para as reações imunoistoquímicas, as lâminas foram submetidas a imunoperoxidase indireta empregando os anticorpos primários policlonais para OPG (Osteoprotegerina) (Goat anti-opg –Santa Cruz Biotechnology, EUA - concentração de 1:100, SC 8468, Lot#H2208), TRAP (Fosfatase Ácida Tartarato Resistente) (Goat anti-trap – Santa Cruz Biotechnology, EUA - concentração de 1:100, SC 30833, Lot#B1805) RANKL (receptor ativador nuclear do fator ligante Kappa-B) (Goatanti-rankl – Santa Cruz Biotechnology, EUA - concentração de 1:100, SC 7628, Lot#20908). Os anticorpos primários foram diluídos em tampão fosfato de sódio, pH 7.4, 0.1M, acrescido de albumina de soro bovino (3%, Sigma, CA, USA) e soro normal de burro na incubação para OPG (1:50, Jackson Immunoresearch Inc., CA, EUA).

Inicialmente, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, reidratados em soluções decrescentes de álcoois e lavados em sucessivos banhos de PBS. Estes cortes histológicos foram tratados para bloqueio da peroxidase endógena empregando peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos e lavados com PBS. Em seguida, os cortes histológicos foram incubados com um dos anticorpos primários mencionados acima a temperatura ambiente durante 18 a 24 horas e lavados com PBS. Uma segunda incubação foi realizada através do uso de anticorpo secundário biotilado universal (anti-camundongo, anti-cabra e anti-coelho, K 0690, Lot 10025449, DAKO – Carpinteria, CA, EUA.) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavagens com PBS. Uma terceira incubação foi realizada com uma solução contendo estreptavidina conjugada com peroxidase (K 0690, Lot 10025449, DAKO – Carpinteria, CA, EUA.) a temperatura ambiente, durante 1 hora. A revelação da reação de imunoperoxidase foi realizada com tampão de revelação (DAB-Substrato, K 3468, Lot 1002290 – DAKO – Carpinteria, CA, EUA.) e diaminobenzidina (DAB- Cromógeno K

3468, Lot 1002290 – DAKO - Carpinteria, CA, EUA.) entre 10 a 60 segundos, em temperatura ambiente. Finalmente, os cortes histológicos foram lavados varias vezes em PBS e submetidos a coloração pela hematoxilina. Todas as reações de imunoperoxidase foram acompanhadas por um controle negativo, através da omissão dos anticorpos primários. As marcações imunoistoquímicas foram analisadas qualitativamente no tecido ósseo e no ligamento periodontal na região de furca dos primeiros molares inferiores com doença periodontal experimental induzida, através de microscopia de campo claro [36].

2.4.3 Análise Estatística

A análise estatística dos dados histométricos obtidos foi realizada pelo programa BioEstat 3.0 (Bioestat Windows 1995 Sonopress. Indústria Brasileira, Manaus, A.M, Brasil). 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 periodontie induzida foi testada. Após análise da normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk. A análise intragrupo e intergrupo foi realizada pela análise de variância Kruskal – Wallis, com $p < 0,05$ (dados não paramétricos). Quando o Kruskal – Wallis detectou diferença estatística, as comparações múltiplas foram realizadas e complementadas pelo teste de Dunn.

3. Resultados

3.1. *Análise Histológica*

No grupo tratado apenas com RAR (G1), a maioria dos espécimes aos 7 dias apresentou um tecido conjuntivo com intenso infiltrado inflamatório, principalmente por neutrófilos. Nas adjacências do septo interradicular os espécimes apresentaram uma discreta quantidade de tecido conjuntivo menos inflamado, composto por uma grande quantidade de fibroblastos e vasos sanguíneos, entremeados em uma delicada rede de fibras colágenas. Na região do septo interradicular apresentaram uma severa reabsorção óssea. O tecido ósseo desta área se mostrava constituído por uma fina rede de trabéculas ósseas de contorno externo bastante irregular, devido a presença de inúmeras lacunas de reabsorção e osteoclastos em franca atividade. Alguns dos espécimes apresentaram espículas de osso necrosado envoltas por células inflamatórias na região da furca. Aos 15 dias as características histopatológicas se mantiveram similares às descritas anteriormente, no entanto houve uma redução do volume ocupado pelo infiltrado inflamatório. Aos 30 dias o infiltrado inflamatório apresentou alterações quantitativas e qualitativas. Houve uma redução maior do volume ocupado pelo infiltrado inflamatório, predominantemente por linfócitos e macrófagos, e o tecido conjuntivo situado nas adjacências do osso do septo interradicular exibiu uma quantidade moderada de fibroblastos e fibras colágenas (Fig. 1.A, Fig. 2.A e Fig. 2.C).

Em todos os espécimes a PO alveolar estava presente e o tecido ósseo ainda se mostrava composto por trabéculas ósseas delicadas, no entanto, com o contorno da superfície menos irregular. Os grupos tratados com RAR em associação com as diferentes concentrações dos fotossensibilizadores (G2, G3, G4 e G5) exibiram, em

todos os períodos, uma menor quantidade no volume ocupado pelo infiltrado inflamatório e um aumento na quantidade do tecido conjuntivo menos inflamado nas adjacências do tecido ósseo. O tecido conjuntivo apresentou, ao longo dos períodos analisados, um aumento gradativo na quantidade de fibras colágenas e uma redução no número de fibroblastos e das raras células inflamatórias ainda presentes, o que denota uma reorganização tecidual em estágio mais avançado que a apresentada pelo grupo G1. A PO alveolar foi ligeiramente menor, enquanto a espessura das trabéculas ósseas se manteve similar àquela apresentada pelo grupo G1.

Nos grupos tratados com RAR e aPDT, aos 7 dias os espécimes apresentaram um processo inflamatório mais discreto, predominantemente por neutrófilos. O tecido conjuntivo adjacente ao septo interradicular exibiu uma moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas, mostrando-se rara a presença de células inflamatórias. A PO alveolar foi menos acentuada que a apresentada pelo grupo tratado apenas com RAR, exceto no grupo G9 (RAR/aPDT – TBO 10 mg/ml). O tecido ósseo apresentava-se por delgadas trabéculas ósseas. Aos 15 dias, houve uma redução mais acentuada do processo inflamatório e nítida organização do tecido conjuntivo, apresentando maior quantidade de fibras colágenas e moderada quantidade de fibroblastos. Aos 30 dias, observaram-se pequenos focos de infiltrado inflamatório em um tecido conjuntivo denso, constituído de grande quantidade de fibras colágenas e poucos fibroblastos. O tecido ósseo do septo interradicular apresentou trabéculas ósseas mais espessas e em inúmeras áreas a presença de osso neoformado (Fig. 1.B, Fig. 1.C, Fig. 1.D, Fig. 2.B e Fig. 2.D).

3.2. Análise histométrica e análise estatística

Os resultados estão apresentados na tabela 1. Ao se comparar os diferentes tratamentos realizados, observou-se aos 7 dias que os animais tratados apenas com a RAR (G1), apresentaram uma maior PO ($2,17 \text{ mm}^2 \pm 0,54$; $p < 0,05$), comparada aos grupos G6 ($0,55 \text{ mm}^2 \pm 0,14$), G7 ($0,77 \text{ mm}^2 \pm 0,17$) e G8 ($0,73 \text{ mm}^2 \pm 0,17$).

Em todos os períodos analisados, os animais tratados com a aPDT (G6, G7, G8 e G9) não mostraram diferença estatística na área de PO quando comparados entre si. No entanto, houve uma tendência de menor PO no grupo G6 ($0,55 \text{ mm}^2 \pm 0,14$) e G7 ($0,77 \text{ mm}^2 \pm 0,17$) em comparação ao G8 ($0,73 \text{ mm}^2 \pm 0,17$) e G9 ($0,98 \text{ mm}^2 \pm 0,30$).

3.3. Análise imunoistoquímica

Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando-se anticorpos primários contra as proteínas RANKL, TRAP e OPG no processo de reparo da região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos.

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de RANKL, OPG e TRAP mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo das reações. As imunomarcações apresentaram-se com uma coloração que variou do castanho ao marrom e confinadas exclusivamente ao compartimento citosólico das células imunorreativas. A RANKL e OPG foram detectadas em osteoblastos, fibroblastos e linfócitos. A imunomarcação para RANKL foi maior aos 7 dias (Fig. 2.C) e para OPG aos 30 dias nos grupos G1, G2, G3, G4, G5, G8 e G9 (Fig. 2.E), porém nos grupos G6 e G7, onde se associou a aPDT empregando-se o azul de metileno como FS a RAR, houve uma forte tendência a uma menor marcação de RANKL, especificamente aos 7 e 15 dias (Fig. 2.D), e um aumento de OPG aos 15 e 30 dias (Fig. 2.F). Além disto, as células TRAP-positivas

estavam situadas na superfície do osso alveolar do septo interradicular, frequentemente se apresentando com mais de três núcleos e nas proximidades de lacunas de reabsorção em todos os grupos. A maior quantidade de células imunomarcadas com TRAP foi detectada aos 7 dias (Fig. 2.A), sendo que nos grupos tratados com RAR e aPDT (G6, G7, G8 e G9) houve uma tendência a diminuição na quantidade tais células (Fig. 2.B).

4. Discussão

Em estudos que avaliaram o efeito da aPDT para o tratamento de infecções microbianas, a eritrosina B [37], rosa bengal [38], violeta cristal [39], photofrin [40], TBO [38] e o MB [38] têm sido usados como fotossensibilizadores. Estudos recentes mostraram um efeito terapêutico favorável da aPDT *in vivo* usando o TBO ou MB em modelos animais de infecção microbiana localizada [41,42].

Os estudos encontrados na literatura avaliaram os efeitos da aPDT, mediada por MB e pelo TBO em diferentes concentrações, no tratamento da DP e demonstraram divergências entre os resultados obtidos em animais [15,16,20,21] com os estudos em humanos [43,34,35,23,44].

No presente estudo foi avaliada a influência do MB e TBO, nas concentrações de 100 µg e 10 mg/ml, como agentes fotossensibilizadores para a aPDT no tratamento coadjuvante da DP induzida em ratos. Na análise dos resultados observou-se nas áreas de furca nos animais tratados com RAR seguida de irrigação com fotossensibilizadores (MB e TBO), uma diminuição do processo inflamatório e uma redução não significativa da PO, que pode ser justificada pelo efeito bactericida destes fotossensibilizadores [45,46,29].

A análise histológica também demonstrou que as áreas de furca dos animais tratados com aPDT exibiram aos 7 dias um tecido conjuntivo com moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas além da redução do processo inflamatório, denotando uma melhor reorganização tecidual que a dos espécimes tratado apenas com RAR.

Na análise histométrica aos 7 dias, os animais tratados com a aPDT mediada por MB e por TBO 100 µg/ml, exibiram menor PO quando comparados aos animais tratados somente com RAR. No entanto, nos períodos de 15 e 30 dias a aPDT não demonstrou vantagens no controle da PO alveolar, quando comparado à RAR, independente do FS e da concentração utilizada.

Trabalhos do nosso grupo utilizando aPDT com MB na concentração de 100 µg/ml [15,16] ou utilizando TBO na mesma concentração [19,20,21] mostraram resultados positivos com o uso da aPDT como tratamento coadjuvante da DP induzida em ratos nos períodos de 7, 15 e 30 dias. Por outro lado, vários estudos em humanos tem utilizado a concentração de 10 mg/ml do MB [43,34,35,23] e alguns destes não verificou vantagens da utilização da aPDT como método coadjuvante ao tratamento da DP [35,23].

Embora no presente estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa na PO entre os grupos da aPDT (G6, G7 e G8), os animais tratados com aPDT no grupo G6 (MB a 100 µg/ml) apresentaram uma tendência de menor PO na área de furca comparado aos demais grupos tratados com a aPDT.

O MB é uma droga catiônica e seu metabolismo e absorção por bactérias podem ser influenciados pela liberação local de exotoxinas por bactérias periodontopatógenas [47]. Sua absorção também pode ser melhorada através de sua associação com um sistema laser, que pode modificar a membrana celular bacteriana, permitindo assim maior absorção da droga, e conseqüentemente, interferir com a viabilidade bacteriana [15].

O efeito da aPDT no controle da PO alveolar pode ter ocorrido pois compostos polissacarídeos presentes na matriz extracelular do biofilme bucal são altamente sensíveis ao oxigênio singlete produzido pela aPDT [48].

Além disto, durante a DP há a estagnação venosa e redução do consumo de oxigênio pelos tecidos, podendo aumentar o crescimento de espécies anaeróbicas [49]. Nestes casos, a aPDT pode melhorar o fluxo sanguíneo no sistema microcirculatório e reduzir a congestão venosa no tecido gengival, podendo aumentar a oxigenação dos tecidos gengivais. Tais fatos poderiam acelerar a liberação e utilização do oxigênio, impedindo o crescimento destes microorganismos [49].

Assim o uso clínico da aPDT, como terapia coadjuvante ao tratamento da DP poderia ser justificado devido a capacidade de alguns periodontopatógenos, como *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, invadirem o epitélio da bolsa e o tecido conjuntivo subjacente [50,51] e, desta forma apresentarem-se resistentes aos efeitos da RAR subgengival [52]. Além destes fatos a remoção completa da placa bacteriana em sítios de difícil acesso como áreas de furca, pelo método convencional torna-se muito limitada [8,5].

Combinado ao seu efeito antimicrobiano, a aPDT pode também atuar sobre o processo de reparo acelerando a cicatrização. A aPDT age antecipando os eventos biológicos da fase exudativa do processo inflamatório para a proliferativa, principalmente nos períodos iniciais da reparação [53]. Este efeito bioestimulador da aPDT pode ter contribuído para uma menor PO observada nos animais tratados com a aPDT aos 7 dias. A escolha do FS viável não é o único fator para otimizar os efeitos da aPDT. É bem estabelecido que as características ópticas do tecido devem ser observadas antes da radiação [54]. Os tecidos extinguem a luz em um processo exponencial, que é diretamente relacionado à distância na qual a luz se propaga por meio dele [54]. Na aPDT a luz absorvida é espalhada pelo tecido e pode afetar fortemente a quantidade de radiação útil e diminuir a morte microbiana. O sucesso da aPDT depende: da otimização do FS (tipo e concentração); de parâmetros da irradiação (comprimento de

onda e potência); do protocolo da fototerapia (tempo de exposição e energia liberada) e do tipo de microorganismo [54].

A PO na DP pode estar relacionada com a quebra do equilíbrio entre RANKL e OPG [55], que estão associados com a severidade da doença [56-58]. Na periodontite, o aumento da concentração de RANKL é encontrado nos tecidos doentes [56-58]. A interação entre RANKL e o receptor ativador nuclear fator kappa B (RANK) mostrou-se importante para a diferenciação dos osteoclastos [59]. A OPG age como receptor antagonista da RANKL, impedindo sua ligação e ativação com a RANK [59].

No presente estudo, a imunorreatividade a RANKL foi melhor evidenciada aos 7 dias pós-tratamento, enquanto a imunorreatividade a OPG alcançou seu pico aos 30 dias pós-tratamento. A análise destes marcadores entre os grupos experimentais revelou que os animais tratados com aPDT usando como fotossensibilizador o MB, exibiram menor imunorreatividade a RANKL aos 7 e 15 dias e maior imunorreatividade a OPG aos 15 e 30 dias pós-operatórios. Os resultados demonstram que a aPDT com MB afetou o balanço de RANKL:OPG, expressando uma menor imunorreatividade a RANKL e maior a OPG.

O MB demonstra forte absorção à radiações emitidas com comprimento de onda de 660nm [60]. Por sua vez, o TBO que é outro corante da família dos fenotiazínicos, possui uma máxima absorção pelo comprimento de onda de 630nm [61].

O comprimento de onda utilizado neste estudo (660nm) pode ter influenciado no controle do metabolismo da reabsorção óssea do grupo G6 e G7 que demonstraram menor PO, pois este comprimento de onda é altamente absorvido pelo MB e os efeitos bactericidas da aPDT são intensificados quando a faixa de absorção do FS é ressonante com a radiação emitida [60].

Tais resultados podem ser justificados também pela aPDT favorecer o processo de reparo face a associação do uso do laser em baixa intensidade, que tem a vantagem de promover a biomodulação do tecido a ser reparado [62] e acelerar o processo de reparo ósseo [63,64]. Estes resultados corroboram os de Min Xu et al. [65] que demonstraram a ação do laser em baixa intensidade em promover diretamente a proliferação e diferenciação de osteoblastos, e indiretamente inibir a diferenciação de osteoclastos, por diminuir a proporção de RNAm da RANKL:OPG nos osteoblastos.

No presente estudo, o efeito do FS e da aPDT sobre a atividade reabsortiva do osso na DP foi demonstrada por meio da imunorreatividade das células à TRAP. Os resultados do presente estudo mostraram uma elevada atividade reabsortiva aos 7 dias que progressivamente foi diminuída aos 15 e 30 dias. Observou-se também que os animais tratados com aPDT mostraram uma tendência de serem menos imunorreativos a TRAP, independente do FS. Estes resultados corroboram com os resultados de Garcia et al [21] onde os animais tratados com aPDT mostraram expressão mais intensa de OPG e menos intensa de RANKL e TRAP.

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a aPDT usando o MB como uma terapia coadjuvante a RAR agiu como “downregulador” dos mecanismos moleculares que controlam a reabsorção óssea, reduzindo a PO na área de furca em ratos com periodontite induzida, enquanto que a aPDT mediada pelo TBO foi capaz de reduzir a PO apenas em baixa concentração.

5. Abreviações

DP doença periodontal

RAR raspagem e alisamento radicular

aPDT terapia fotodinâmica antimicrobiana

FS fotossensibilizador

PS profundidade de sondagem

SS sangramento a sondagem

GI ganho clínico de inserção

MB azul de metileno

TBO azul de toluidina-orto.

PO perda óssea

LLLT terapia a laser em baixa intensidade

InGaAlP índio, gálio, alumínio, fósforo

AsGaAl arseneto de gálio e alumínio

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético

H&E hematoxilina e eosina

TM expressa a técnica de coloração das lâminas. Tricrômico de Masson

OPG osteoprotegerina

TRAP fosfatase ácida tartarato resistente

RANKL receptor ativador de NF-Kappa B ligante

RANK Receptor ativador de NF-Kappa B

Agradecimentos

Ao Departamento de Periodontia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade de São Paulo – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. À Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão de bolsa (Processo FAPESP 2010/12570-8) e pelo auxílio para o desenvolvimento desta pesquisa (Processo FAPESP 2010/13120-6).

- [1] R.C. Page, S. Offenbacher, H.E. Schroeder, G.J. Seymour, K.S. Kornman, Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions, *Periodontol.* 2000 14 (1997) 216–248.
- [2] W.B. Kaldahl, K.L. Kalkwarf, K.D. Patil, A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies, *J. Periodontol.* 64 (1993) 243–253.
- [3] P.A. Adriaens, C.A. Edwards, J.A. DeBoever, W.J. Loesche, Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth, *J. Periodontol.* 59 (1988) 493–503.
- [4] J.I. Matia, N.F. Bissada, J.E. Maybury, P. Ricchetti, Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access, *Int. J. Periodontics. Restorative Dent.* 6 (1986) 24–35.
- [5] A.J. van Winkelhoff, T.E. Rams, J. Slots, Systemic antibiotic therapy in periodontics, *Periodontol.* 2000 10 (1996) 45-78.
- [6] K. Schwach-Abdellaoui, N. Vivien-Castioni, R. Gurny, Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 83–99.

- [7] D. F. Kinane, Local antimicrobial therapies in periodontal disease, *Ann.R. Australas. Coll. Dent. Surg.* 15 (2000) 57–60.
- [8] N.J. López, J.A. Gamonal, B. Martinez, Repeated metronidazole and amoxicillin treatment of periodontitis. A follow-up study, *J. Periodontol.* 71 (2000) 79-89.
- [9] M.A. Atieh, Photodynamic therapy as an adjunctive treatment for chronic periodontitis: a meta-analysis, *Lasers Med. Sci.* 25 (2010) 605–613.
- [10] N. Komerik, H. Nakanishi, A.J. Mac Robert, B. Henderson, P. Speight, M. Wilson, In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 932-940.
- [11] M. Ochsner, Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours, *J. Photochem. Photobiol. B* 39 (1997)1–18.
- [12] M. Wainwright, Photodynamic antimicrobial chemotherapy, *J. Antimicrob. Chemother.* 42 (1998) 13–28.
- [13] T. Maisch, Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med. Sci.* 22 (2007) 83–91.
- [14] M.R. Hamblin, T. Hasan, Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 (2004) 436-450.

- [15] J.M. Almeida, L.H. Theodoro, A.F. Bosco, M.J. Nagata, M. Oshiiwa, V.G. Garcia, Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats, *J. Periodontol.* 78 (2007) 566 - 575.
- [16] J.M. Almeida, J.H. Theodoro, A.F. Bosco, M.J. Nagata, M. Oshiiwa., V.G. Garcia, In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations, *J. Periodontol.* 79 (2008) 1081-1088.
- [17] A.L. Carvalho, M.H. Napimoga, J. Coelho-Campos, Jr, V.J. Silva-Filho, G. Thedei, Jr., Photodynamic Therapy Reduces Bone Resorption and Decreases Inflammatory Response in an Experimental Rat Periodontal Disease Model, *Photomed. Laser Surg.* 29 (2011) 735-740.
- [18] R.A. Prates , A.M. Yamada, L.C. Suzuki, C.M. França, S. Cai, M.P. Mayer, A.C. Ribeiro, M.S. Ribeiro, Histomorphometric and Microbiological Assessment of Photodynamic Therapy as an Adjuvant Treatment for Periodontitis: A Short-Term Evaluation of Inflammatory Periodontal Conditions and Bacterial Reduction in a Rat Model, *Photomed. Laser Surg.* 12 (2011) 835 – 844.
- [19] J.M. Almeida, L.H. Theodoro, A.F. Bosco, M.J. Nagata, S. Bonfante, V.G. Garcia, Treatment of Experimental Periodontal Disease by Photodynamic Therapy in Rats With Diabetes, *J. Periodontol.* 79 (2008) 2156-2165.

- [20] L.A. Fernandes, J.M. de Almeida, L.H. Theodoro, A.F. Bosco, M.J. Nagata, T.M. Martins, T. Okamoto, V.G. Garcia, Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats, *J. Clin. Periodontol.* 36 (2009) 219-28.
- [21] V.G. Garcia, L.A. Fernandes, V.C. Macarini, J.M de Almeida, T.M. Martins, A.F. Bosco, M.J. Nagata, J.A. Cirelli, L.H. Theodoro, Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats, *J. Clin. Periodontol.* 38 (2011) 1106–1114.
- [22] R. Andersen, N. Loebel, D. Hammond, M. Wilson, Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing, *J. Clin. Dent.* 18 (2007) 34-38.
- [23] P. Chondros, D. Nikolidakis, N. Christodoulides, R. Rössler, N. Gutknecht, A. Sculean, Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial, *Lasers Med. Sci.* 24 (2009) 681–688.
- [24] A. Azarpazhooh, P.S. Shah, H.C. Tenenbaum, M.B. Goldberg, The Effect of Photodynamic Therapy for Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis, *J. Periodontol.* 81 (2010) 4-14.

- [25] S.K. Sharma, T. Dai, G.B. Kharkwal, Y.Y. Huang, L. Huang, V.J. De Arce, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models, *Curr. Pharm. Des.* 13 (2011) 1303-19.
- [26] P. Meisel, T. Kocher, Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art, *J. Photochem. Photobiol. B*, 79 (2005) 159–170.
- [27] B.W. Sigusch, A. Pfitzner, V. Albrecht, E. Glockmann, Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model, *J. Periodontol.* 76 (2005) 1100–1105.
- [28] A. Minnock, D.I. Vernon, J. Schofield, J. Griffiths, J.H. Parish, S.B. Brown, Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic watersoluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gramnegative and Gram-positive bacteria, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 32 (1996) 159–164.
- [29] M. Usacheva, M.C. Teichert, M.A. Biel, Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram-positive and Gram-negative microorganisms, *Lasers Surg. Med.* 29 (2001) 165-173.
- [30] M. Wainright, and K.B. Crossley, Methylene blue-A therapeutic dye for all seasons? *J. Chemother.* 14 (2002) 431–443.
- [31] N. Komerik, M. Wilson, S. Poole, The effect of photodynamic action on two virulence factors of Gramnegative bacteria, *Photochem. Photobiol.* 72 (2000) 676-680.

- [32] S. Menezes, M.A. Capella, L.R. Caldas, Photodynamic action of methylene blue: Repair and mutation in *Escherichia coli*, *J. Photochem. Photobiol. B* 5 (1990) 505–517.
- [33] Y. Wakayama, M. Takagi, K. Yano, Photosensitized inactivation of *E. coli* cells in toluidine blue-light system, *Photochem. Photobiol.* 32 (1980) 601–605.
- [34] A. Braun, C. Dehn, F. Krause, S. Jepsen, Short term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial, *J. Clin. Periodontol.* 35 (2008) 877-884.
- [35] N. Christodoulides, D. Nikolidakis, P. Chondros, J. Becker, F. Schwarz, R. Rössler, A. Sculean, Photodynamic therapy as an adjunct to nonsurgical periodontal treatment: a randomized controlled clinical trial, *J. Periodontol.* 79 (2008) 1638-1644.
- [36] A. Khojasteh, M.B. Eslaminejad, H. Nazarian, Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 106 (2008) 356-362.
- [37] S. Wood, D. Metcalf, D. Devine, C. Robinson, Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms, *J. Antimicrob. Chemother.* 57 (2006) 680–684.
- [38] T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Photodynamic inactivation of *Bacillus* spores, mediated by phenothiazinium dyes, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 6918–6925.

- [39] R.S.N. Docampo, R.P. Moreno, F.S. Muniz, Cruz, R.P. Mason, Light-enhanced free radical formation and trypanocidal action of gentian violet (crystal violet), *Science* 220 (1983) 1292–1295.
- [40] M.M. Tanaka, Y. Kinoshita, N. Yoshihara, S. Shinomiya, K. Seki, Nemoto, Y. Morimoto, Influence of intra-articular neutrophils on the effects of photodynamic therapy for murine MRSA arthritis, *Photochem. Photobiol.* 86 (2010) 403–409.
- [41] P.S. Zolfaghari, S. Packer, M. Singer, S. P. Nair, J. Bennett, C. Street, M. Wilson, In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent, *BMC Microbiol.* 4 (2009) 9, 27.
- [42] X. Ragàs, T. Dai, G.P. Tegos, M. Agut, S. Nonell, M.R. Hamblin, Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: In vitro and in vivo studies, *Lasers Surg. Med.* 42 (2010) 384-390.
- [43] R.R. de Oliveira, H.O. Schwartz-Filho, A.B. Novaes Jr, M. Taba Jr., Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study, *J. Periodontol.* 78 (2007) 965-73.
- [44] L.H. Theodoro, S.P. Silva, J.R. Pires, G.H. Soares, A.E. Pontes, E.P. Zuza, D.M. Spolidório, B.E. de Toledo, V.G. Garcia, Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month

follow-up, *Lasers Med. Sci.* (2011) Jun 18. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s10103-011-0942.

[45] M. Wilson, T. Burns, J. Pratten, G.J. Pearson, Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by lowpower laser light in the presence of a photosensitizer, *J. Appl. Bacteriol.* 78 (1995) 569-574.

[46] A. Skripchenko, D. Robinette, S.J. Wagner, Comparison of methylene blue and methylene violet for photoinactivation of intracellular and extracellular virus in red cell suspensions, *Photochem. Photobiol.* 65 (1997) 451-455.

[47] F. Gad, T. Zahra, T. Hasan, M.R. Hamblin, Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of Gram-positive pathogenic bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 2173-2178.

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

[49] M. Tanaka, T. Hanioka, K. Takaya, S. Shizukuishi, Association of oxygen tension in human periodontal pockets with gingival inflammation, *J. Periodontol.* 10 (1998) 1127-1130.

- [50] J. Shiloah, M.R. Patters, DNA probe analyses of the survival of selected periodontal pathogens following scaling, root planing, and intra-pocket irrigation, *J. Periodontol.* 65 (1994) 568–575.
- [51] S. Renvert, M. Wikstrom, G. Dahlen, J. Slots, J. Egelberg, On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets, *J. Clin. Periodontol.* 17 (1990) 351–355.
- [52] A.D. Haffajee, R.P. Teles, S.S. Socransky, The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota, *Periodontol.* 2000. 42 (2006) 219–258.
- [53] V.G. Garcia, M.A. de Lima, T. Okamoto, L.A. Milanezi, E.C. Junior, L.A. Fernandes, J.M. de Almeida, L.H. Theodoro, Effect of photodynamic therapy on the healing of cutaneous third-degree-burn: histological study in rats, *Lasers Med. Sci.* 25 (2010) 221-228.
- [54] R.A. Prates, E.G.d. Silva, A.M. Yamada-Jr, L.C. Suzuki, C.R. Paula, M.S. Ribeiro, Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manne, *Laser Phys.* 19 (2009) 1038–1044.
- [55] D.F. Lappin, B. Eapen D. Robertson, J. Young, P.J. Hodge. Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus, *J. Clin. Periodontol.* 36 (2009) 634–641.

- [56] D. Liu, J.K. Xu, L. Figliomeni, N.J., Pavlos, M. Rogers, A. Tan, P. Price, M.H. Zheng, Expression of RANKL and OPGmRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction, *Int. J. Mol. Med.* 11 (2002) 17–22.
- [57] T. Crotti, M.D. Smith, R. Hirsch, S. Soukoulis, H. Weedon, M. Capone, M.J. Ahern, D. Haynes, Receptor activator NF kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis, *J. Periodontal Res.* 38 (2003) 380–387.
- [58] G.P. Garlet, C.R. Cardoso, T.A. Silva, B.R. Ferreira, M.J. Avila-Campos, F.Q. Cunha, J.S. Silva, Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors, *Oral Microbiol. Immunol.* 21 (2006) 12–20.
- [59] S. Theoleyre, Y. Wittrant, S.K. Tat, Y. Fortun, F. Redini, D. Heymann, The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling, *Cytokine Growth Factor Rev.* 15 (2004) 457-475.
- [60] Y. Chan, C.H. Lai, Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy, *Lasers Med. Sci.* 18 (2003) 51–55.
- [61] Y.L. Qin, X.L. Luan, L.J. Bi, Y.Q. Sheng, C.N. Zhou, Z.G. Zhang, Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats, *J. Periodont. Res.* 43 (2008) 162–167.

- [62] T. Karu, Photobiology of low power laser effects, *Health Phys.* 56 (1989) 691–704.
- [63] P.S. Bossini, A.C. Rennó, D.A. Ribeiro, R. Fangel, A.C. Ribeiro, M.D. Lahoz, N.A. Parizotto, Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages, *Exp. Gerontol.* 47 (2012) 136-142.
- [64] E. Fávaro-Pípi, D.A.Ribeiro, J.U. Ribeiro, P. Bossini, P. Oliveira, N.A. Parizotto, C. Tim, H.S. de Araújo, A.C. Renno, Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats, *Photomed. Laser Surg.* 29 (2011) 311-7.
- [65] M. Xu, T. Deng , F. Mo, B. Deng, W. Lam, P. Deng, X. Zhang, S. Liu, Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells, *Photomed. Laser Surg.* 27 (2009) 309-315.

Lista de Tabela

Tabela 1: Médias e desvio padrão (M±DP) dos dados histométricos da perda óssea alveolar (mm²) na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo com doença periodontal induzida, de acordo com cada grupo, tratamento e período.

Grupo	A		
Períodos/Dias	7	15	30
Tratamentos			
G1	2,17±0,54	1,66±0,28	1,38±0,30
G2	1,03±0,52	0,93±0,39	0,97±0,21
G3	1,50±0,27	1,43±0,20	1,34±0,48
G4	1,73±0,62	1,32±0,94	0,54±0,26
G5	1,79±0,80	1,60±0,13	1,12±0,60
G6	0,55±0,14 [†]	0,54±0,21	0,55±0,26
G7	0,77±0,17 [†]	1,59±0,02	1,08±0,22
G8	0,73±0,17 [†]	0,66±0,11	0,62±0,10
G9	0,98±0,30	1,19±0,10	0,77±0,21
N	54	54	54

[†]Diferença com o grupo G1 no mesmo período (Kruskal – Wallis e Dunn, com p<0.05).

Lista de Figuras

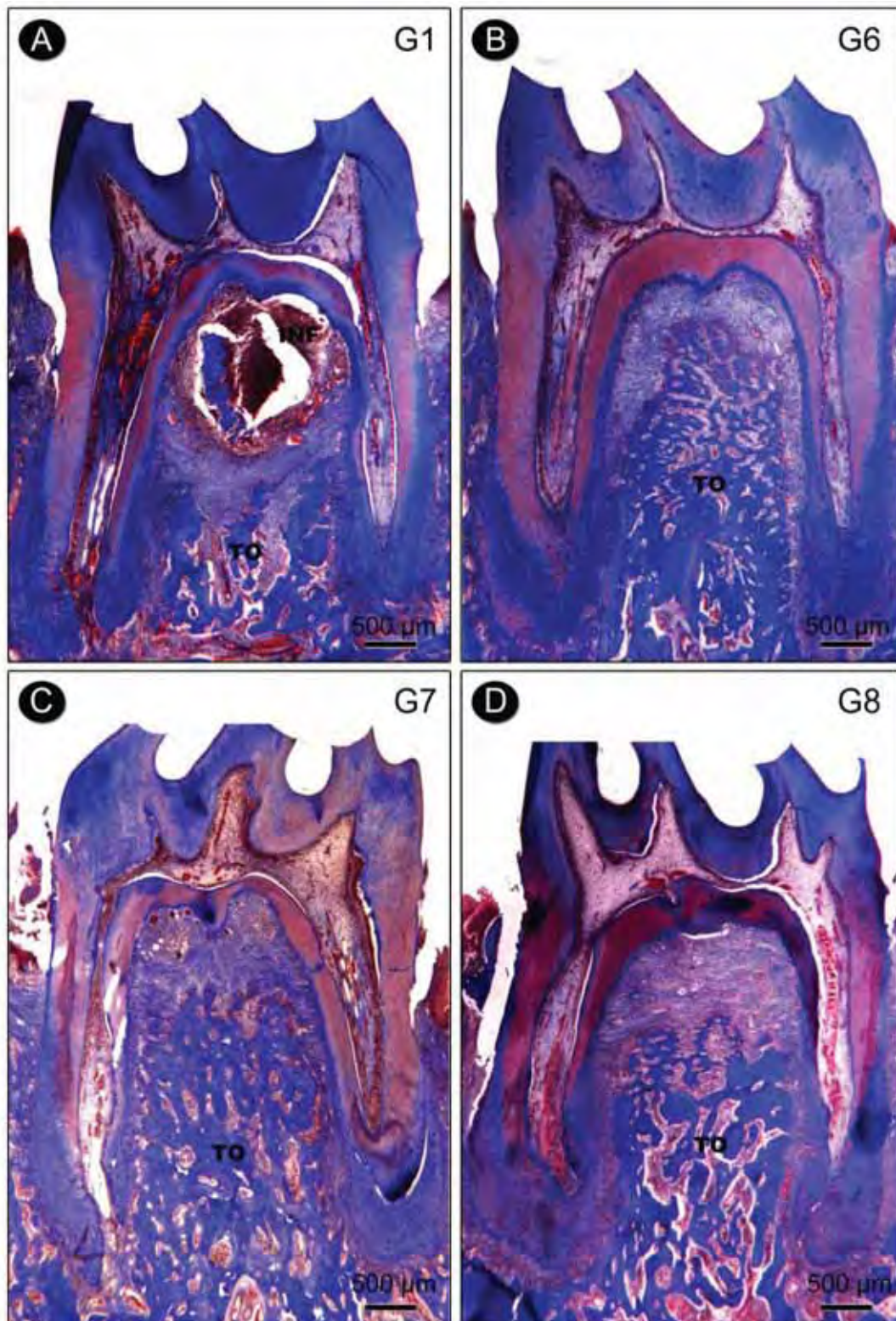


Fig. 1. Aspecto histológico da região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal induzida. **A-D:** fotomicrografias de cortes longitudinais da região de furca, corados pelo tricrômico de Masson, evidenciando a magnitude da perda óssea alveolar apresentada aos 7 dias pelos grupos G1 (A), G6 (B), G7 (C) e G8 (D). Abreviações: INF, infiltrado inflamatório; TO, tecido ósseo. Barras de escala: A-D = 500 μ m.

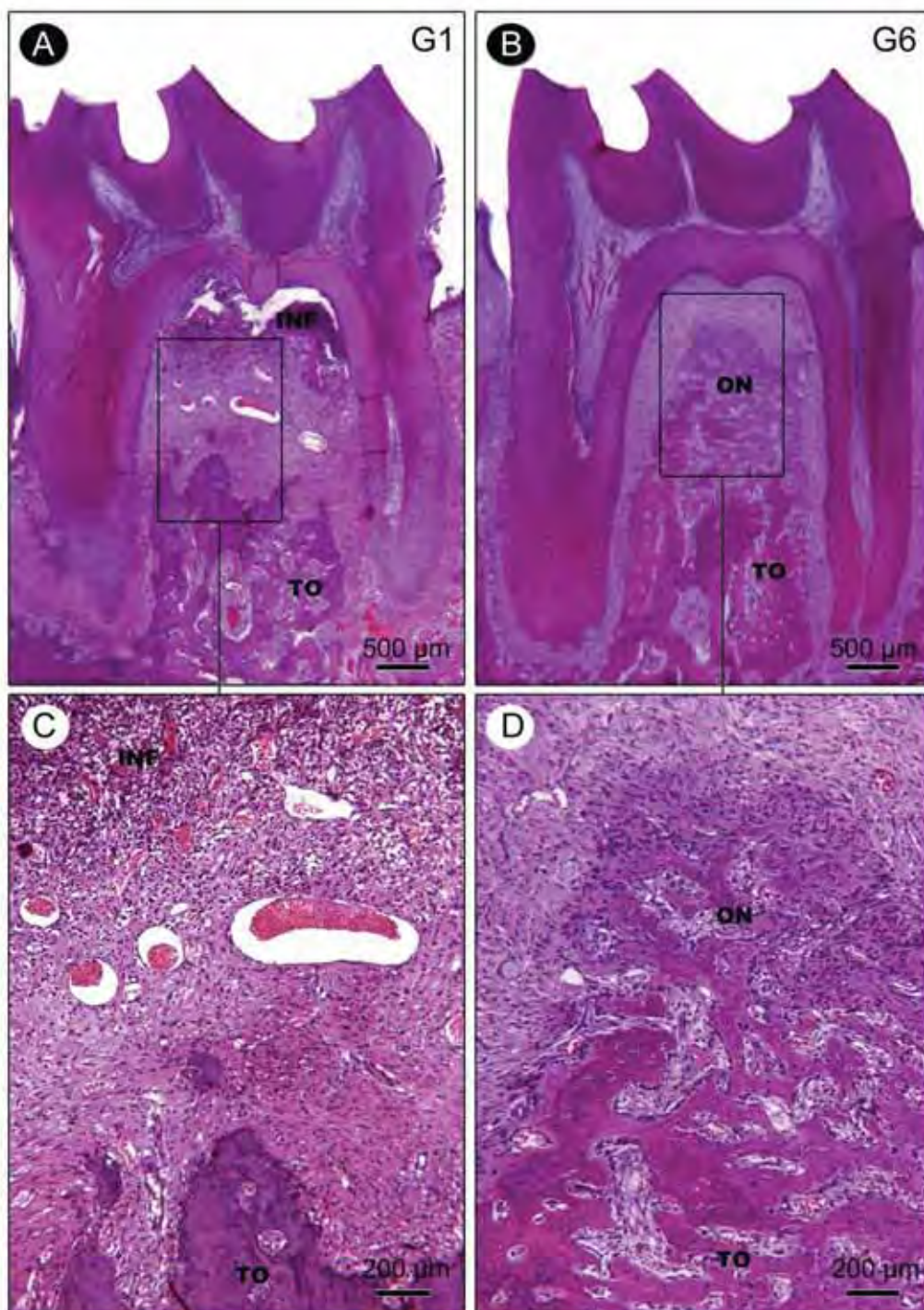


Fig. 2. Aspecto histopatológico detalhado da região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal induzida. **A-B:** fotomicrografias de cortes longitudinais da região de furca, corados pela hematoxilina e eosina, evidenciando o grau de inflamação e as características histológicas apresentadas pelo tecido conjuntivo e ósseo dos grupos G1 (A) e G6 (B) aos 7 dias. **C-D:** fotomicrografias em maior aumento das regiões indicadas em A e B. Abreviações: INF, infiltrado inflamatório; ON, tecido ósseo neoformado; TO, tecido ósseo. Barras de escala: A-B = 500 μ m e C-D = 200 μ m.

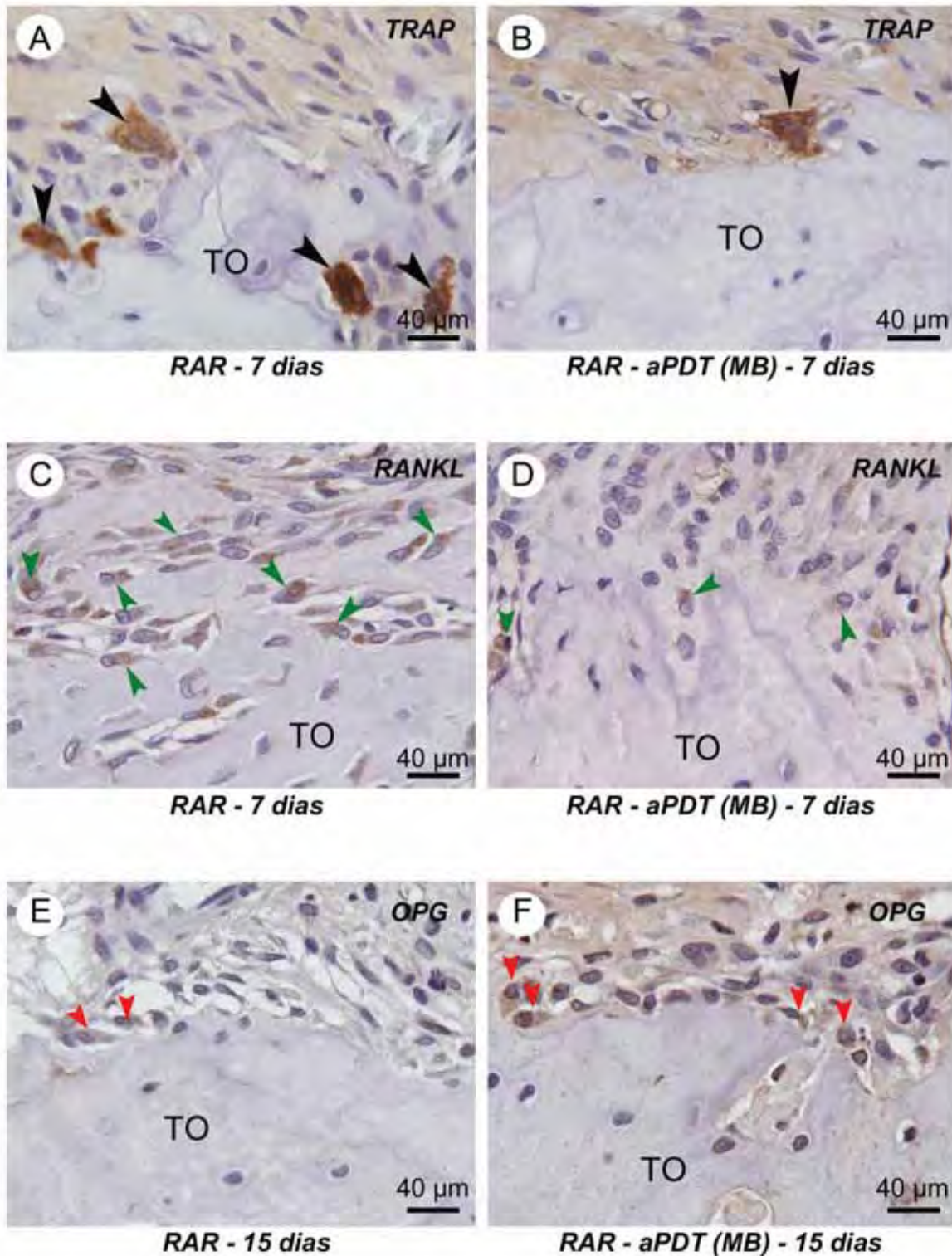


Fig. 3. Imunomarcção de TRAP, RANKL e OPG na região de furca do primeiro molar inferior com doença periodontal induzida. **A:** G1 (RAR) – 7D – fotomicrografia evidenciando osteoclastos –TRAP positivos (setas pretas). **B:** G6 (RAR/aPDT-MB) – 7D - fotomicrografia evidenciando diminuição na quantidade de osteoclastos – TRAP positivas. **C:** G1 (RAR) – 7D – fotomicrografia evidenciando imunomarcção de RANKL (setas verdes). **D:** G6 (RAR/aPDT-MB) – 7D – fotomicrografia evidenciando diminuição na imunomarcção de RANKL (setas verdes). **E:** G1 (RAR) – 15D – fotomicrografia evidenciando imunomarcção para OPG (setas vermelhas). **F:** G6 (RAR/aPDT-MB) – 15D – fotomicrografia evidenciando aumento na imunomarcção para OPG (setas vermelhas). Abreviações: aPDT, terapia fotodinâmica antimicrobiana; MB, azul de metileno; RAR, raspagem e alisamento radicular; TO, tecido ósseo. Barras de escala = 40 μm.

Anexo A – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"DÁLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS"** sob responsabilidade da **Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia** e colaboração de **Profª. Dra. Maria José Hitomi Nagata, Mariellen Longo** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA número de protocolo número 002326-2010

Araçatuba, 24 de Março de 2010

Prof.ª Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA-FOA/UNESP

Anexo B - Normas para Publicação segundo o Periódico - Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (JPPB) welcomes Invited review articles

and original papers not previously published

The journal provides a forum for the publication of papers relating to the various aspects of

photobiology, as well as a means for communication in this multidisciplinary field.

The scope includes:

- bioluminescence
- chronobiology
- DNA repair
- environmental photobiology
- nanotechnology in photobiology
- photocarcinogenesis
- photochemistry of biomolecules
- photomedicine
- photomorphogenesis
- photomovement
- photoreception
- photosensitization
- photosynthesis
- phototechnology
- spectroscopy of biological systems
- UV and visible radiation effects
- vision

This journal is cited by the following Abstracting Services: BIOSIS, Cambridge Scientific Abstracts, Chemical Abstracts, Current Contents, Elsevier BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences, EMBASE/Excerpta Medica, Embiology, Engineering Index, Medlar's System, Metals Abstracts, PASCAL/ CNRS, Physics Abstracts, Physikalische Berichte, Polymer Contents, Research Alert™, Science Citation Index, Scopus.

Contact Details for Submission

Authors are requested to submit their article to the Editor responsible for the topic involved: Dr. Laszlo Matyus: Biophysics, Biomolecular spectroscopy, Photodynamic Therapy, Dermatology, Photomedicine. Dr. Robert Carpentier: Photosynthesis, Environmental photobiology, Photosensitisers, Oxygen radicals, DNA repair, UV/VIS effects.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue*: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from

the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further

processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. For submitting your manuscript to JPPB please go to our Elsevier Editorial System (EES) Website at: <http://ees.elsevier.com/jphotochem/> For technical questions related to your submission contact: authorsupport@elsevier.com. For general questions, contact Dr. Robert Carpentier (Robert.Carpentier@uqtr.ca), Dr. Laszlo Matyus (lmatyus@med.unideb.hu), or Dr. Dominic Robinson (d.robinson@erasmusmc.nl).

Referees

Please submit, with the manuscript, the names and addresses of 5 potential referees. The referees should not be editorial board members or from the same institute or geographical region as the authors.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation)

can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

- 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). The only exception is the use of min, h, d and a as units for elapsed time, though never when combined algebraically with other units. If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. Consult the IUPAC "Glossary of Terms Used in Photochemistry" for the correct terminology (source: The Spectrum, Bowling Green, Vol.16, 1, 2003, p 16), (online: www.bgsu.edu/departments/photochem), (cited link: http://www.aspjournals.com/auth_instruct.html) UV ranges. The official UV ranges as defined by the CIE must be used:

UV-A: 400-315nm UV-B: 315-280nm

UV-C: 280-100nm

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then

Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. Further, high-resolution graphics files must be provided separately whether or not the graphics are embedded. See further under Electronic artwork.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual Authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result...."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] B.K. Armstrong, A. Kricker, The epidemiology of UV induced skin cancer, J. Photochem. Photobiol. B 63 (2001) 8-18.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing, Inc., New York, 1994, pp. 281-304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to

publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

• Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge)

and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):
doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.