



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

UNESP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

LEANDRO ARAÚJO FERNANDES

**“AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO
TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL
EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA EM RATOS
TRATADOS OU NÃO COM NICOTINA: ESTUDO
HISTOLÓGICO, HISTOMÉTRICO E
IMUNOISTOQUÍMICO”**

Araçatuba/SP

2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

UNESP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

LEANDRO ARAÚJO FERNANDES

**“AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO
TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL
EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA EM RATOS
TRATADOS OU NÃO COM NICOTINA: ESTUDO
HISTOLÓGICO, HISTOMÉTRICO E
IMUNOISTOQUÍMICO”**

Orientador: Prof. Titular Dr. Valdir Gouveia Garcia

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araçatuba, para obtenção do título de “Doutor em Periodontia”

Araçatuba/SP

2010

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Fernandes, Leandro Araújo

F363a Ação da Terapia Fotodinâmica no tratamento da doença periodontal experimentalmente induzida em ratos tratados ou não com nicotina: estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico.: Leandro Araújo Fernandes – Araçatuba: [s.n.], 2010, 118f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

1. Doença periodontal 2. Fotoquimioterapia 3. Nicotina 4. Laser 5. Perda óssea alveolar 6. Terapia a laser de baixa intensidade.

Black D6
CDD 617.632

Dados Curriculares

Nascimento: 26.02.1980 – Guaxupé/MG.

Filiação: João Batista Fernandes
Maria Aparecida Fernandes

1999/2002: Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

2004/2005: Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de Especialização, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

2006/2007 Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

2008/2010 Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Dedicatória

Dedico este trabalho:

A **Deus** que foi o meu **bom pastor** e não me deixou faltar nada. **Guiou-me** por veredas tranquilas e **refrigerou-me** a alma. Mesmo quando andei por vales de morte, caminhos tortuosos ou lhe virei as costas, o **Senhor sempre esteve comigo me mostrando o caminho correto a ser seguido.**

Aos meus pais, **João Batista Fernandes e Maria Aparecida Fernandes.** **Pai** saiba que o senhor não é só meu pai mas o meu **melhor amigo, confidente, incentivador** e em quem eu **sempre** busco orientações. **Mãe** me orgulho da senhora pois é **muito sábia e forte** para lhe dar com os problemas familiares, **não olhe o tamanho dos desafios mas os enfrenta com a maior naturalidade e tranquilidade.** Mas o maior presente que vocês poderiam me dar foi um dia me mostrar que existe um **Deus** que nos amou de tal maneira que deu o seu único filho para morrer na cruz em meu lugar e que nunca iria me abandonar não importando o lugar em que eu estivesse. Me desculpe pois sei que muitas vezes quando precisaram de mim estava ausente devido aos estudos.

Me orgulho muito de vocês e agradeço a Deus por serem meu pais.

Às minhas irmãs **Daniela Araújo Fernandes e Aline Araújo Fernandes**. Agradeço a vocês por estarem **sempre perto e cuidando de nossos pais**. Aproveito para **pedir desculpas** pois sei que muitas vezes fui um irmão ausente em virtude dos estudos e por isso muitos problemas **vocês enfrentaram sozinhas**. Agradeço pois sei que muitas **vezes oraram** por mim para que vencesse as minhas batalhas, **obrigado pela preocupação, amor e carinho**.

À minha Dani. Chama-lá de namorada é muito pouco; **você é o meu sol ao amanhecer, a minha motivação em meio aos desânimos, a força nos momentos de fraqueza e a coragem que surge para enfrentar os maiores obstáculos**.

Você é a minha companheira, ajudadora e auxiliadora.

Dani se não estivesse do meu lado este objetivo e tantos outros na minha vida nunca teriam sido alcançados. Você é um exemplo de força e de luta para alcançar as vitórias.

Saiba MEU AMOR que só vou descansar quando estivermos juntos.

Às minhas queridas avós, **Marta e Luzia que sempre e sempre intercederam por mim, para que eu pudesse ser guardado do mal e pudesse ser bem sucedido em todos os meus afazeres.**

Aos meus colegas e amigos que torceram sempre por mim.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador e se me permite dizer **meu amigo Dr Valdir Gouveia Garcia**.

Professor Valdir obrigado por ter me dado a oportunidade de fazer a pós graduação, por me ajudar a realizar este sonho. Obrigado por me dar a liberdade de aprender, e graças a esta forma de orientar pude alcançar patamares que nunca imaginava que alcançaria. Devo ainda lhe agradecer por me ajudar a ver por mim mesmo os momentos em que estava tomando a decisão errada e que pude corrigir a tempo (lembra do concurso em Manaus no início do doutorado). Obrigado também por me incentivar a tomar decisões corretas mesmo quando os meus pais não queriam que eu as tomasse por estarem envolvidos emocionalmente (lembra quando assumi na Bahia).

Te agradeço por sempre me tratar com respeito, por confiar em mim plenamente, por me mostrar que devemos ser humildes e que para produzirmos precisamos agregar e passar nosso conhecimento adiante.

Ao Prof. **Adj. Alvaro Francisco Bosco**.

Professor depois que ingressei na pós graduação pude ter a real noção de que profissional o senhor é, sem demagogia nenhuma acho que o melhor que já vi na periodontia. Obrigado por me passar um pouco do seu conhecimento científico e experiência clínica. Uma característica sua que ficou marcado em mim foi a sua forma prática de resolver os casos clínicos, sempre tentando resolver as coisas de forma rápida para os pacientes. Quando o senhor relatava alguma experiência clínica que tinha vivido eu sempre escutava com muita atenção para aprender mais e mais (lembra quando o senhor relatou em uma aula que conteve um hemorragia colocando várias gazes e pedindo para o paciente mordê-las e que fez isso por ter escutado uma conversa em um hospital?). Sabe professor, apesar de não ter tanta intimidade com o senhor, me impressionou a forma carinhosa e zelosa com que falava de sua família, espero que eu lembre disso quando constituir a minha.

À Professora Adj. **Maria José Hitomi Nagata.**

Professora gostaria de te agradecer por ter me passado um pouco do seu conhecimento científico, mas falar e reconhecer este seu grande conhecimento em pesquisas é até redundante de minha parte.

Professora o que mais gostaria de te agradecer é a forma como sempre me tratou. A senhora sempre e sempre reconheceu o meu trabalho dentro da periodontia. A senhora não só reconhecia, mas me falava e isso me motivava cada vez mais a lutar pela periodontia dentro desta faculdade. Devo muito à senhora e o que fez por mim é impagável e saiba que sempre serei leal à senhora. Marcou-me muito aquela conversa que tivemos antes de ir para a Bahia, obrigado por tanta consideração à minha pessoa.

Professores devo lealdade a vocês e gostaria de me desculpar se fui falho em algum momento.

Aos meus sogros **Hélio e Elza, minha cunhada Juliana e meu cunhado Júnior.**

Obrigado por sempre me tratarem com respeito e educação. Além disso agradeço por ensinar a Dani que na vida para alcançar nossos objetivos devemos correr atrás e este ensinamento aprendi ao conviver com ela.

À minha também orientadora **Letícia Helena Theodoro.**

Le quando fui à casa para trabalharmos o artigo da dissertação de mestrado fiquei impressionado com a sua capacidade científica. Você escrevia em inglês e o texto ia fluindo com uma naturalidade impressionante e como diria o professor Valdir “a discussão deixa com a Le”. Mas devo confessar que o que mais gostava em ir à sua casa escrever os artigos era a forma maravilhosa que me tratavam (e a comida da Jô que delícia). Le quando me lembro desses momentos vejo o quanto você é dinâmica e inteligente e espero que um dia eu possa atingir a metade de sua capacidade. Muito obrigado pelos ensinamentos e pelo convívio, nunca me esquecerei das boas risadas e momentos de descanso em frente a TV.

Ao amigo e meu professor **Juliano Milanezi de Almeida.**

Juliano te agradeço pela paciência em me ensinar quando comecei o mestrado. Não sabia nada de pesquisa nem de como escrever um artigo e você me ensinou grande parte destas coisas. Ao te conhecer melhor passei a te admirar, pois é uma pessoa muito inteligente e calma (não me lembro de te ver nervoso) e sabe o que mais me impressionou em você a sua capacidade de fazer todas as atividades da pós graduação sem deixar de dar atenção à sua família. Você foi e é para mim um dos exemplos a serem seguidos, e na pós graduação tentei seguir os seus passos. Muito obrigado meu amigo.

Ao amigo **Thiago Marchi Martins.**

Thiagão sinto falta daquelas noites em que saíamos para tomar lanche. Lembra sempre conversávamos do futuro, trabalho, constituir uma família e futebol. Te agradeço pela ajuda na realização das pesquisas, das brincadeiras, risadas e pela convivência. Sabe o que fico mais feliz hoje é ver que estamos inseridos no mercado de trabalho e que tudo o que vivemos serão boas histórias para contar.

**A todos os meus amigos, pois, parte da minha história eu devo a todos
você.**

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas do ex Diretor **Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin** e Vice-Diretor **Prof. Dr. Célio Percinoto**, e atuais Diretor **Pedro Felício Estrada Bernabé** e Vice-Diretora **Ana Maria Pires Soubhia** por proporcionar a realização desta pesquisa e pelos anos de graduação, pós-graduação e crescimento profissional.

À antiga coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do Professor **Wilson Roberto Poi**, e 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.

Ao Professor Doutor **Tetuo Okamoto** e sua filha **Roberta Okamoto**, pela ajuda inestimável na análise histológica de vários trabalhos realizados na Periodontia.

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

Aos funcionários do Departamento de Periodontia, **Claudio Miromiro (aposentado)**, **Odair** e **Joilson** sempre dispostos a nos ensinar e ajudar nas fases do processamento laboratorial. **“Dada”** muito obrigado não só pela ajuda nos trabalhos mais pela convivência, brincadeiras e conversas sobre a Igreja.

Estou sentindo a sua falta.

Aos funcionários do Biotério, **Camilo e João**, que contribuíram, de forma ímpar, para realização da parte experimental. Mais uma vez, obrigado.

Aos alunos de graduação e aos ex e atuais alunos do Curso de Pós-Graduação em Odontologia - área Periodontia - **Luís Gustavo, Valmir, Juliano, Samara, Flávia, Sérgio, Alex, Danielle, Tatiana, Luciana, Michel, Thiago, Fernando, Luis Augusto, Michyele, Ana Cristina, Erivan, Nati Póla, Nati Campos, Rick, Carol, Paulinha, Murillo e Mariéllen** pela amizade e convívio. Podem ter certeza que aprendi muito mas muito mesmo com cada um de vocês. Aproveito para pedir desculpas se por acaso mesmo sem saber magoei ou fui falho com algum de vocês.

Erivan, Nati Póla, Nati Campos, Carol, Paulinha, Murillo e Mariéllen estou muito contente em saber o quanto vocês estão trabalhando e aprendendo coisas novas, como é legal ver o crescimento científico de todos. Obrigado por me ajudarem no momento em que me afastei de Araçatuba e me desculpe pelo trabalho a mais que dei a vocês. Saibam que todos vocês sairão muito mais bem formados do que eu e fico contente por saber isso, podem ter certeza que ligarei para todos para tirar duvidas.

Ao Professor da UNESP - Araraquara **Doutor Joni Augusto Cirelli**, pela ajuda no processamento imunoistoquímico deste trabalho.

Ao **Bruno Theodoro Luciano** pela ajuda nas traduções de inglês dos nossos artigos. Obrigado Bruno pelas vezes que abriu mão das suas férias para nos ajudar.

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 demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela ajuda e atenção que me dispensaram desde a graduação.

A **Capex** pela concessão de Bolsa de Estudo e a **Fapesp** por financiar este 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.

Meu muito obrigado, hoje e sempre!

Epígrafe

SABER VIVER

Saber viver é perdoar e esquecer
Prosseguir sem pensar em desanimar ao se ver diante da adversidade;
Não deixar morrer jamais a esperança;
É doar-se sem esperar recompensa
Saber a hora exata de se calar, para ouvir aquilo que o outro pensa;
Saber viver é não querer sentir-se o dono da verdade
Não insistir em estar sempre com a razão;
Saber viver é aprender com os outros e com os próprios erros
E os obstáculos da vida superar
Aceitar críticas, ainda que injustas
Ser atingido e não querer revidar;
Saber viver é da vida não ter medo
É cultivar dentro de si a harmonia
Agradecer a Deus por mais um novo dia;
Saber viver é saber preparar a terra
Lançar ao solo apenas as boas sementes
Dedicar-se a cultivá-las dia a dia
E colher bons frutos posteriormente.

Lourdes Neves Cúrcio

Prefácio

COMIGO SEMPRE

Homens de pouca fé!...
Vim e habitei entre vós.
Padei no deserto. Fui tentado,
Com amor e abnegação
Superei a tentação.
Alertei; esclareci; ensinei.
Curei; ressuscitei; dei amor e bondade.
Traído, fui julgado e condenado.
Sofri as maiores humilhações.
Pereci e fui crucificado.
Tudo para que se cumprisse a profecia
E assim, os Homens fossem purificados.
Pois com minha morte,
Também vossos pecados morreriam.
E agora você duvida de mim.
Se revolta e xinga.
Pede e não diz uma única prece...
Mas saiba meu filho
Que mesmo me abandonando,
Eu nunca sairei do vosso lado.

José R. P. Monteiro

Fernandes LA. **Ação da Terapia Fotodinâmica no tratamento da doença periodontal experimentalmente induzida em ratos tratados ou não com nicotina: estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico.** [Tese]. Araçatuba: UNESP – Universidade Estadual Paulista; 2010.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da terapia fotodinâmica (PDT) como coadjuvante ao tratamento não cirúrgico da doença periodontal (DP) experimentalmente induzida em ratos tratados ou não com nicotina. Cento e oitenta ratos foram divididos em 2 grupos de 90 animais cada. Os do Grupo Controle (C) receberam aplicações subcutâneas de soro fisiológico; os do Grupo Nicotina (N) receberam aplicações subcutâneas de nicotina. As injeções foram realizadas duas vezes ao dia e iniciadas 30 dias antes da indução da DP, continuando pós tratamento periodontal até os respectivos períodos de sacrifício. A DP foi induzida através da colocação de ligadura com fio de algodão na região dento-gengival dos primeiros molares inferiores esquerdos. Após 7 dias da indução, a ligadura foi removida e, os animais foram divididos em subgrupos de acordo com os seguintes tratamentos locais: Tratamento I - raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação com soro fisiológico; Tratamento II - RAR e irrigação com azul de toluidina O (TBO) e Tratamento III – RAR, irrigação com TBO e, após 1 minuto, aplicação do laser em baixa intensidade (LLLT) (GaAsAl, 660 nm, 4J), realizando a PDT. Dez animais de cada subgrupo foram sacrificados aos 7, 15 e 30 dias. Os espécimes foram processados laboratorialmente e analisados histológica, histométrica e imunoistoquimicamente. Aos 7, 15 e 30 dias, em ambos os grupos, o tratamento RAR apresentou um tecido conjuntivo desorganizado, com elevado número de neutrófilos e discreto número de fibroblastos. O tecido ósseo apresentou áreas de necrose e trabéculas ósseas finas. Nos períodos de 7 e 15 dias os animais dos grupos C e N, tratados pela

PDT, apresentaram um tecido conjuntivo bem desenvolvido com moderado número de fibroblastos, discreto infiltrado inflamatório crônico e tecido ósseo moderadamente desenvolvido. Aos 30 dias, apresentaram um ligamento periodontal íntegro, organizado e com fibras colágenas paralelas entre si. O tecido conjuntivo apresentou-se bem desenvolvido, íntegro e com ausência de infiltrado inflamatório. A análise intragrupo demonstrou que os animais do grupo C tratados com a PDT apresentaram uma menor perda óssea (PO) e um menor número de células fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) positivas quando comparados com a RAR e TBO em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). Estes mesmos resultados foram observados nos animais do grupo N onde o tratamento com a PDT apresentou uma menor PO e um menor número de células TRAP positivas comparado à RAR e ao TBO aos 7, 15 e 30 dias respectivamente ($p < 0,05$). Na análise intergrupo, o tratamento RAR apresentou uma PO significativamente maior e um maior número de células TRAP positivas nos animais do grupo N comparados aos animais do grupo C em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). No grupo N, o tratamento da PDT apresentou uma menor PO e um menor número de células TRAP positivas comparados aos animais do grupo C tratados por RAR em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a PDT foi efetiva como tratamento coadjuvante à RAR na redução da perda óssea em periodontite experimentalmente induzida em ratos tratados ou não com nicotina.

Palavras chaves: Fotoquimioterapia, Lasers, Nicotina, Osteoclastos, Perda Óssea Alveolar, Periodontite.

Fernandes LA. **Action of Photodynamic Therapy in the treatment of experimentally induced periodontal disease in rats treated or not with nicotine: histological, immunohistochemical and histometric.** [Thesis]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2010.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the influence of photodynamic therapy (PDT) as an adjunct to non-surgical treatment of periodontal disease (PD) experimental induced in rats treated with or without nicotine. One hundred and eighty rats were divided into 2 groups of 90 animals each. Control group (C) received subcutaneous infusions of saline, group of Nicotine (N) received subcutaneous infusions of nicotine. The injections were performed twice a day and started 30 days before induction of PD, continuing after periodontal treatment until their period of sacrifice. PD was induced by placing cotton ligature in the dento-gingival region of the left lower first molars. After 7 days of induction, the ligature was removed and the animals were divided into subgroups according to the following local treatments: treatment I - scaling and root planing (SRP) and irrigation with saline; Treatment II - SRP and irrigation with O toluidine blue (TBO) and Treatment III - SRP, irrigation with TBO and 1 minute after application of low intensity laser therapy (LLLT) (GaAlAs, 660 nm, 4J), performing the PDT. Ten animals of each subgroup were sacrificed at 7, 15 and 30 days. The laboratory specimens were processed and analyzed histologically, histometrically and immunohistochemically. At 7, 15 and 30 days in both groups, treatment SRP showed a disorganized tissue with high numbers of neutrophils and a small number of fibroblasts. The bone tissue showed areas of necrosis and trabecular bone thin. At 7 and 15 days the animals in groups C and N, treated by PDT, showed a well developed connective tissue with a moderate number of fibroblasts, mild chronic inflammatory infiltrate and bone moderately developed. At 30 days, they presented an intact periodontal ligament, and organized collagen

fibers in parallel. The connective tissue was well-developed, healthy and with no inflammatory infiltrate. The intragroup analysis showed that the animals in group C treated with PDT had less bone loss (PO) and a lower number of positive cells tartar resistant acid phosphatase (TRAP) compared with the SRP and TBO in all periods ($p < 0.05$). These same results were observed in group N where treatment with PDT showed lower PO and a smaller number of TRAP positive cells compared to SRP and TBO at 7, 15 and 30 days, respectively ($p < 0.05$). In the intergroup analysis, treatment SRP showed a significantly higher PO and a greater number of TRAP positive cells in group N compared to C animals in all experimental periods ($p < 0.05$). In Group N, treatment of PDT presented a lower PO and a smaller number of TRAP positive cells compared to C animals treated by SRP in all periods ($p < 0.05$). Within the limits of this study, it can be concluded that PDT was effective as adjunctive treatment to SRP in reducing bone loss in experimental periodontitis induced in rats treated with or without nicotine.

Key words: Photochemotherapy, Lasers, Nicotine, Osteoblasts, Osteoprotegerin, Alveolar bone loss, Periodontiti, RANKL.

Lista de Tabelas

Manuscrito para publicação

- Tabela 1** Médias e desvios padrões ($M \pm DP$) dos pesos corporais (g) de acordo com cada grupo, tratamento e período. 56
- Tabela 2** Médias e desvios padrões ($M \pm DP$) dos dados histométricos da PO (mm^2) na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo, tratamento e período. 57
- Tabela 3** Médias e desvios padrões ($M \pm DP$) do número de células TRAP positivas na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo, tratamento e período. 58

Lista de Figuras

Manuscrito para publicação

- Figura 1** Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. Grupo C - 7 dias. Tratamento I (RAR). A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 40X. Grupo C - 15 dias. Tratamento I (RAR). C) HE. Aumento original 5X. D) HE. Aumento original 40X. Grupo C - 30 dias. Tratamento I (RAR). E) HE. Aumento original 5X. F) HE. Aumento original 40X. 59
- Figura 2** Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. Grupo N - 7 dias. Tratamento I (RAR). A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 40X. Grupo N - 15 dias. Tratamento I (RAR). C) HE. Aumento original 5X. D) HE. Aumento original 40X. Grupo N - 30 dias. Tratamento I (RAR). E) HE. Aumento original 5X. F) HE. Aumento original 40X. 60
- Figura 3** Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. Grupo C - 7 dias. Tratamento III (PDT). A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 40X. Grupo C - 15 dias. Tratamento III (PDT). C) HE. Aumento original 5X. D) HE. Aumento original 40X. Grupo C - 30 dias. Tratamento III (PDT). E) HE. Aumento original 5X. F) HE. Aumento original 40X. 61

Figura 4 Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. Grupo N - 7 dias. Tratamento III (PDT). A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 40X. Grupo N - 15 dias. Tratamento III (PDT). C) HE. Aumento original 5X. D) HE. Aumento original 40X. Grupo N - 30 dias. Tratamento III (PDT). E) HE. Aumento original 5X. F) HE. Aumento original 40X. 62

Figura 5 Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. A) TM. Grupo C - 7 dias. Tratamento I (RAR). Aumento original 12.5X. B) TM. Grupo N - 7 dias. Tratamento III (PDT). Aumento original 12.5X. C) TM. Grupo C - 15 dias. Tratamento I (RAR). Aumento original 12.5X. D) TM. Grupo N - 15 dias. Tratamento III (PDT). Aumento original 12.5X. E) TM. Grupo C - 30 dias. Tratamento I (RAR). Aumento original 12.5X. F) TM. Grupo N - 30 dias. Tratamento III (PDT). Aumento original 12.5X. 63

Figura 6 Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. Grupo C - 7 dias. Tratamento I (RAR). A) HE. Aumento original 5X. B) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 100X. Grupo C - 15 dias. Tratamento I (RAR). C) HE. Aumento original 5X. D) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 100X. Grupo C - 30 dias. Tratamento I (RAR). E) HE. Aumento original 5X. F) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 100X. 64

Figura 7 Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. Grupo N - 7 dias. Tratamento I (RAR). A) HE. Aumento original 5X. B) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 100X. Grupo N - 15 dias. Tratamento I (RAR). C) HE. Aumento original 5X. D) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 100X. Grupo N - 30 dias. Tratamento I (RAR). E) HE. Aumento original 5X. F) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 100X.

Lista de Abreviaturas

GaAs : Gálio-Arsênio (Arseneto de Gálio).

GaAlAs : Gálio-Alumínio-Arsênio (Arseneto de Gálio e Alumínio).

ATP : Adenosina trifosfato.

5-ALA : Ácido 5- aminolevulínico.

DNA - Ácido desoxiribonucleico

DP - Doença Periodontal.

g - Gramas.

Grupo C - Grupo Controle

Grupo N - Grupo Nicotina

HE - Expressa a técnica de coloração com Hematoxilina e eosina.

Hertz – Expressa o número de oscilações completas (pulsos) de uma onda por segundo..
Também denominado de Frequência.

HeNe - Hélio-Neônio.

IL-1 - Interleucina 1.

IL-1 α - Interleucina 1 alfa.

IL-2 - Interleucina 2.

IL-3 - Interleucina 3.

IL-6 - Interleucina 6.

IL-8 - Interleucina 8.

InGaAlP - Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo.

Joule – Expressa a unidade de energia; é abreviada como J.

J/cm² – Expressa a quantidade de energia (Joule) aplicada na área (centímetro quadrado).

Kg - Unidade fundamental de medida de massa.

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

Laser de GaAs - Laser de Arseneto de Gálio.

Laser GaAsAl - Laser de Arseneto de Gálio e Alumínio.

Laser contínuo - Laser que emite energia continuamente.

Laser de He-Ne - Laser de Hélio-Neônio.

Laser de Nd:YAG - Laser de Neodímio, Ítrio, Alumínio, Granada.

Laser pulsado - Laser que emite energia em intervalos fixos.

LLLT - Expressa Low Level Laser Therapy - Tratamento com laser em baixa intensidade.

LPS - Lipopolissacarídeo

mg - Miligramas, equivalente à milésima parte do grama.

mg/Kg - Miligramas por quilo.

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

mL - Mililitros, equivalente à milésima parte do litro.

Monocromático - Uma única frequência de comprimento de onda; uma única cor.

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

mm - Milímetro, equivalente a milésima parte do metro

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

Sua abreviatura é 10⁻⁹ metros.

O₂ - Oxigênio.

OPG - Osteoprotegerina

OVX - Ovariectomia, ratas ovariectomizadas

OVX C/RH - Ratas ovariectomizadas com reposição

OVX S/RH - Ratas ovariectomizadas sem reposição

PBS - Tampão Fosfato de Sódio.

RANK - Receptor ativador de NF-Kappa B

RANKL - Receptor ativador de NF-Kappa B ligante

PDT - Terapia Fotodinâmica.

PO - Perda óssea.

RAR – Raspagem e alisamento radicular.

TBO - Azul de Toluidina-Orto.

Tempo de exposição - Período total que o tecido é exposto à energia Laser.

TM - Expressa a técnica de coloração com Tricrômico de Masson.

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α .

TRAP - Fosfatase Ácida Tartarato Resistente

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

W - Abreviação de Watt; unidade de potência.

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

$\mu\text{g/ml}$ - Microgramas por mililitros

Lista de Anexos

Anexo A	Revisão de literatura	66
Anexo B	Comitê de Ética em Experimentação Animal	100
Anexo C	Normas de publicação da Revista Journal of Clinical Periodontology	101

Sumário

Manuscrito para publicação	28
Conflito de Interesses	29
Resumo	29
Introdução	31
Materiais e Métodos	34
Resultados	41
Discussão	44
Agradecimentos	48
Referências	49
Relevância Clínica	55
Lista de Tabelas	56
Lista de Figuras	59
Anexos	68



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



Título

Ação da Terapia Fotodinâmica no tratamento da doença periodontal experimentalmente induzida em ratos tratados ou não com nicotina: estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico.

Autores:

* Leandro Araújo Fernandes, DDS, MS.

* Valdir Gouveia Garcia, DDS, MS, PHD.

* Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Brasil.

Autor responsável pela correspondência:

Valdir Gouveia Garcia

Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Rua José Bonifácio, 1193.

CEP: 16015-050, Araçatuba, SP, Brasil

Telefone: (55) 18 - 36363239

E-mail: vgouveia@foa.unesp.br

Número de figuras: 7

Número de tabelas: 3

Conflito de interesses e declaração de fonte de financiamento

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Este estudo foi realizado na Disciplina de Periodontia (Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP) com Auxílio à pesquisa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – São Paulo, SP, Brasil (FAPESP – Processo 2008/04927-3).

Resumo

Objetivos: O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação da terapia fotodinâmica (PDT) como coadjuvante ao tratamento não cirúrgico da doença periodontal (DP) experimentalmente induzida em ratos tratados ou não com nicotina.

Métodos: Cento e oitenta ratos foram divididos em 2 grupos de 90 animais cada. Os do Grupo Controle (C) receberam aplicações subcutâneas de soro fisiológico; os do Grupo Nicotina (N) receberam aplicações subcutâneas de nicotina. As injeções foram realizadas duas vezes ao dia e iniciadas 30 dias antes da indução da DP, continuando pós tratamento periodontal até os respectivos períodos de sacrifício. A DP foi induzida através da colocação de ligadura com fio de algodão na região dento-gengival dos primeiros molares inferiores esquerdos. Após 7 dias da indução, a ligadura foi removida e, os animais divididos em subgrupos, que receberam os seguintes tratamentos locais: Tratamento I - raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação com soro fisiológico; Tratamento II - RAR e irrigação com azul de toluidina O (TBO) e Tratamento III - RAR, irrigação com azul de toluidina O (TBO) e após 1 minuto aplicação do laser de baixa intensidade (LLLT) (GaAlAs, 660 nm, 4J), realizando a PDT. Dez animais de cada subgrupo foram sacrificados aos 7, 15 e 30 dias. Os espécimes foram processados laboratorialmente e analisados histológica, histométrica e imunoistoquimicamente.

Resultados: A análise intragrupo demonstrou que nos animais de ambos os grupos o tratamento com a PDT apresentou uma menor perda óssea (PO) e um menor número de células fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) positivas quando comparado aos tratamentos de RAR e TBO em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). Na análise intergrupos, o tratamento com RAR apresentou uma PO significativamente maior e um número maior de células TRAP positivas nos animais do grupo N comparados aos animais do grupo C em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). O resultado mais significativo mostrou que no grupo N, o tratamento da PDT apresentou uma menor PO e um menor número de células TRAP positivas comparados aos animais do grupo C tratados por RAR em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$).

Conclusão: Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a PDT foi efetiva como tratamento coadjuvante à RAR na redução da perda óssea em periodontite experimentalmente induzida em ratos tratados ou não com nicotina.

Palavras chaves: Fotoquimioterapia, Lasers, Nicotina, Osteoclastos, Perda Óssea Alveolar, Periodontite.

Introdução*

A doença periodontal (DP) é uma condição patológica multifatorial que envolve alterações sistêmicas do hospedeiro assim como a presença de microbiota patogênica local (Cullinan et al. 2009). Estes microorganismos se aderem à superfície dura da cavidade bucal e destroem os tecidos periodontais de forma direta, através de algumas enzimas e toxinas secretadas como também de forma indireta pela ação de seus componentes, particularmente o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular das bactérias gram negativas que estimula as células do hospedeiro a secretarem mediadores inflamatórios que guiam e regulam tal atividade destrutiva (Kamma & Slots 2003).

Os principais sinais que caracterizam a DP são a perda de inserção causada pela migração apical do epitélio juncional e perda do osso alveolar (Ebisu & Noiri 2007). A reabsorção do tecido ósseo ocorre pela atividade dos osteoclastos (Takayanagi, 2005), que são derivados de células hemopoiéticas, e que ao se diferenciarem passam a produzir uma proteína chamada de fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) (Anusaksathien et al. 2001). Por este motivo trabalhos na literatura passaram a utilizar a TRAP como imunomarcador dessas células, e seus resultados mostraram um número significativamente maior de clastos durante a DP ativa (Jin et al. 2007, Hassumi et al. 2009).

Como descrito anteriormente fatores sistêmicos podem interferir nos mecanismos de defesa do hospedeiro tornando-o mais susceptível à instalação e progressão da DP (Cullinan et al. 2009). Dentre esses fatores incluem-se algumas doenças como o Diabetes Mellitus (Almeida et al. 2008a), imunossupressão causada pelo uso prolongado de drogas (Fernandes et al. 2009) como também o hábito de fumar cigarro (Breivik et al. 2009).

O fumo é um dos fatores de risco mais significativos para o desenvolvimento e progressão da DP (Genco 1996) e as razões para esta associação podem ser atribuídas à vasoconstrição local que

* Normalização Segundo a Revista Journal of Clinical Periodontology.

dificulta a irrigação dos tecidos periodontais e às alterações na composição e aumento na concentração da microbiota subgengival de patógenos periodontais (Ramseier et al. 2009). Além disso, a nicotina presente no cigarro pode aumentar a degradação das fibras colágenas pelos fibroblastos (Zhang et al. 2009), inibir a resposta do sistema imune (Breivik et al. 2009) promovendo a diminuição da fagocitose e quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares e reduzir a produção de anticorpos e viabilidade de linfócitos T (Holt & Keast 1977). Estudos *in vivo* mostraram que a nicotina pode aumentar de forma significativa a perda óssea periodontal (Bosco et al. 2007, Breivik et al. 2009), e que fumantes são mais suscetíveis às formas mais agressivas de doença periodontal (Haber et al. 1993, Calsina et al. 2002) por não responderem tão favoravelmente ao tratamento (Bostrom et al. 1998, Renvert et al. 1998).

O tratamento da DP se baseia na eliminação da microbiota subgengival patogênica pelo procedimento de raspagem e alisamento radicular (RAR) (Kaldahl et al. 1993). Entretanto, a terapia mecânica utilizada isoladamente, pode ser falha na eliminação de bactérias patogênicas por estas localizarem-se no interior dos tecidos moles e duros ou em áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais como áreas de furca e depressões radiculares (Adriaens et al. 1988).

Devido a estas limitações, métodos coadjuvantes que promovam a eliminação de patógenos periodontais têm despertado o interesse de pesquisadores que consideram o uso de antibióticos ou anti-sépticos efetivos no tratamento periodontal (Goodson 1989, Rams & Slots 1996). Por outro lado, a literatura evidencia também, pesquisas que demonstraram a seleção e resistência bacteriana promovida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos na terapêutica periodontal (Wainwright 1998, Komerik et al. 2003, Gad et al. 2004).

Mais recentemente o uso da terapia fotodinâmica (PDT) tem despertado o interesse para pesquisas (Yilmaz et al. 2002, Kömerik et al. 2003, Shibli et al. 2003, Gad 2004, Azarpazhooh et al. 2010) as quais evidenciam as vantagens da utilização desta terapia no controle microbiano. O

tratamento consiste na associação de um fotosensibilizador à uma fonte de luz intensa com o objetivo de provocar morte celular (Bauer et al. 2001). O mecanismo de ação da PDT se dá quando o fotosensibilizador absorve energia de uma fonte de luz com o mesmo comprimento de onda, ficando seus elétrons em um estado excitado (Dortbudak et al. 2001). Na presença de um substrato, o fotosensibilizador ao retornar ao seu estado fundamental transfere a energia ao substrato, formando espécies de vida curta e altamente reativas como o oxigênio singleto, que pode provocar danos aos microorganismos por oxidação irreversível de componentes celulares (Tomaselli et al. 2001).

Devido aos efeitos antibacterianos da PDT, inclusive contra bactérias periodontopatogênicas, essa passou a ser estudada no tratamento da doença periodontal (Komerik et al. 2003, Sigusch et al. 2005, Oliveira et al. 2007). Trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram a efetividade da PDT como coadjuvante ao tratamento periodontal convencional em animais portadores de Diabetes Mellitus (Almeida et al. 2008a) e tratados com drogas imunossupressoras (Fernandes et al. 2009). Estudos realizados em humanos mostraram que a PDT associada ao tratamento periodontal convencional melhora de forma significativa os resultados clínicos durante a manutenção de bolsas residuais em pacientes inseridos em programas de manutenção (Lulic et al. 2009), e diminui o sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e perda de inserção clínica quando comparado ao grupo controle, além de reduzir o número de bactérias (Sigusch et al. 2010).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar, através de análise histológica, histométrica e imunoistoquímica, os efeitos da PDT, como coadjuvante ao procedimento de RAR, no tratamento da DP experimentalmente induzida em ratos tratados ou não com nicotina.

Materiais e Métodos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP (Protocolo de n. 2008-01372) por estar dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Animais

No presente estudo foram utilizados 180 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 200 a 250g, com 2 a 3 meses de vida, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais apresentaram-se saudáveis e em condições de sofrerem os procedimentos operatórios. Estes animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo cinco animais cada uma, separados de acordo com os grupos, tratamentos e períodos experimentais, e foram alimentados com ração e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos randomicamente em dois grupos: Controle (C) e Nicotina (N), com noventa animais cada um.

Delineamento do estudo

Os animais do Grupo C (n=90) receberam injeções subcutâneas de soro fisiológico e os do grupo N (n=90) receberam injeções subcutâneas de 3 mg/Kg de peso corpóreo de nicotina (Pinto et al. 2002). Todas as injeções foram fragmentadas em duas aplicações, sendo uma no período da manhã e outra, no final da tarde, sempre com intervalo de 12 horas. As injeções foram iniciadas 30 dias antes da indução da DP, sendo mantidas diariamente até o final dos respectivos períodos de sacrifício.

O local da administração das injeções foi o dorso dos animais, próximo à região cefálica. Os animais foram pesados semanalmente, para manutenção da dose, durante todo período experimental. O preparo do hemi-sulfato de nicotina (Sigma corporation, São Paulo-Brasil) foi realizado através de diluição em solução fisiológica na concentração de 5 mg/ml (Okamoto et al. 1994).

Indução da Doença Periodontal experimental

Após trinta dias do início das aplicações subcutâneas, a doença periodontal foi experimentalmente induzida. Foi realizada a anestesia dos animais através de injeção intramuscular associando 0,4 ml/Kg de Cloridrato de quetamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa – USA) a 0,2 ml/Kg de cloridrato de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil). Com o auxílio de uma sonda e pinça modificadas para esse fim foi adaptado um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão nº 24; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos, que foram mantidos em posição por meio de nós cirúrgicos, para a indução experimental da periodontite (Johnson 1975).

Tratamentos

Decorridos 7 dias da indução e evolução da doença periodontal a ligadura foi removida. A seguir os animais foram divididos em subgrupos de acordo com os seguintes tratamentos locais: I - animais foram tratados com RAR e irrigação com 1 ml de soro fisiológico; II - animais foram tratados com RAR e irrigação com 1ml de azul de toluidina O (TBO) e III – animais foram tratados com RAR, irrigação com 1ml de TBO e, após 1 minuto, irradiação com laser em baixa intensidade (LLLT), realizando dessa forma a PDT.

Os procedimentos de RAR foram realizados com Cureta de Gracey Mini - five 13 e 14 (Hufriedy MFG. Corporation. Inc. Chicago, USA). As soluções de soro fisiológico e TBO foram depositadas no interior da bolsa periodontal lentamente, utilizando seringa (1 ml) e agulha para insulina (13mm x 0,04mm) (Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda, Curitiba, PR, Brasil) sem bisel.

PDT

O tratamento da PDT foi realizada com irrigação de 1 ml de TBO na concentração de 100µg/ml, com o auxílio de seringa para insulina, tomando-se o cuidado de dirigir a ponta da agulha no interior da bolsa periodontal. Decorrido 1 minuto após a permanência da droga no tecido, foi realizada a aplicação do LLLT. O laser utilizado no tratamento III foi o de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) (Laser Bio Wave LLLT; Kondortech Equipamentos Odontológicos, São Carlos, SP, Brasil) com o seguinte protocolo de aplicação:

- Comprimento de onda: 660 nm, laser visível;
- Potência de saída: 30 mW (0,03W);
- Modo de emissão: laser contínuo;
- Modo de aplicação: laser contato pontual;
- Área de aplicação do Laser: A irradiação do laser foi realizada com a ponteira direcionada para o interior da bolsa periodontal em 3 pontos equidistantes na superfície vestibular (mesial, média e distal) e 3 pontos equidistantes na superfície lingual (mesial, média e distal);
- Energia: 4 J / ponto;

- Área do Spot : 0,07 cm²
- Tempo de exposição pontual: 133 segundos;
- Tempo de exposição total: 13 minutos e 18 segundos;
- Densidade de Energia pontual: 57,14 J/cm²;
- Energia Total: 24 J;
- Intensidade de potência: 0,4285 W/ cm².

Períodos Experimentais

Dez animais para cada subgrupo experimental foram sacrificados por meio de superdosagem anestésica (tiopental 150 mg/Kg) (Cristalia, Produtos químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil) aos 7, 15 e 30 dias pós tratamentos locais. A mandíbula de cada animal foi removida, separada ao meio e fixada em formol tamponado a 10% por um período mínimo de 48 horas.

Processamento Laboratorial e Análise Histológica

Os espécimes foram demineralizados em solução de ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20% e após esta etapa incluídos em parafina. Os cortes foram realizados de forma semi-seriados no sentido méso-distal, com 4 µm de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômico de Masson (TM) e imunomarcados. Em um aumento de 40X, nos cortes corados pela técnica de HE foram analisados as características do tecido ósseo e do ligamento periodontal na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos (Almeida et al. 2008a, Fernandes et al. 2009).

Análise Histométrica

Para análise do nível ósseo interradicular foi utilizada a coloração de TM em um aumento de 12.5X. A área expressa em mm² de perda óssea (PO) na região de furca foi histometricamente determinada utilizando um sistema de análise de imagem (Imagelab 2000 - Software Diracon Bio Informática LTDA - Vargem Grande do Sul, SP, Brasil). Após exclusão, da primeira e da última secção na qual a região de furca foi evidente, cinco secções equidistantes de cada dente foram selecionadas para análise histométrica (César-Neto et al. 2006). A PO foi avaliada medindo a extensão da área entre a crista óssea e a superfície do cimento do teto da furca.

A seleção das secções histológicas foi realizada por um examinador treinado e cego ao tratamento realizado. Outro examinador cego ao tratamento e calibrado, realizou a análise histométrica. A PO de cada espécime foi avaliada três vezes pelo mesmo examinador e em dias diferentes (Almeida et al. 2008a). As três medidas obtidas foram analisadas estatisticamente para análise de concordância com nível de 5% de significância (Teste Kappa). Os valores médios foram averiguados e comparados estatisticamente.

Análise imunoistoquímica

Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando-se anticorpos primários contra a proteína TRAP na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos.

Para as reações imunoistoquímicas, as lâminas foram submetidas a imunoperoxidase indireta empregando os anticorpos primários policlonais para TRAP (Goat anti-trap – Santa Cruz Biotechnology, USA) (concentração de 1:100, SC 30833, Lot#B1805). Os anticorpos primários foram diluídos em tampão fosfato de sódio (PBS), pH 7.4, 0.1M, acrescido de albumina de soro bovino (3%, Sigma, CA, USA).

Inicialmente, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, reidratados em soluções decrescentes de alcoóis 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 prosseguimento incubados com o anticorpo primário mencionado anteriormente 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, USA) 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, USA.) 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, USA.) e diaminobenzidina (DAB- Cromógeno K 3468, Lot 1002290 – DAKO - Carpinteria, CA, USA.) entre 10 a 60 segundos, em temperatura ambiente. Finalmente, os cortes histológicos foram lavados várias vezes em PBS e submetidos à coloração pela hematoxilina. Todas as reações de imunoperoxidase foram acompanhadas por um controle negativo, através da omissão dos anticorpos primários. As imunomarcações localizadas na margem do tecido ósseo mais coronal na região de furca dos primeiros molares inferiores com doença periodontal foram contadas em um aumento de 100X, através de microscopia de campo claro (Jin et al. 2007, Khojasteh et al. 2008, Liu et al. 2010). Foram consideradas células TRAP positivas, osteoclastos maduros contendo três ou mais núcleos (Hassumi et al. 2009).

Análise estatística

A análise estatística dos dados histométricos e imunoistoquímicos obtidos foram realizadas 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 PO e das imunomarcações na região de furca entre os diferentes grupos, tratamentos e períodos nos dentes com periodontite induzida foi testada. A normalidade dos dados foi testada pelo teste Shapiro-Wilk e as análises intragrupos e intergrupos foram realizadas pela teste ANOVA a dois critérios. Quando o ANOVA detectou diferença estatística, as comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey.

Resultados

Análise clínica

Os animais do grupo C não apresentaram alterações clínicas em relação à saúde geral, apresentando um ganho de peso significativo no decorrer do estudo. Já nos animais do grupo N isto não foi observado, visto que, estes ratos apresentaram pesos semelhantes durante todos os períodos estudados provavelmente pelas alterações sistêmicas causadas pela aplicação da nicotina (Tabela 1).

Análise histológica

Aos 7, 15 e 30 dias, em ambos os grupos, o tratamento RAR apresentou um tecido conjuntivo desorganizado, com elevado número de neutrófilos e discreto número de fibroblastos. O tecido ósseo apresentou áreas de necrose e trabéculas ósseas finas (Figuras 1 e 2).

Nos grupos C e N, em todos os períodos experimentais, os animais que receberam o tratamento TBO apresentaram um tecido conjuntivo pouco organizado, com um processo inflamatório predominantemente crônico e moderado número de fibroblastos. O tecido ósseo não apresentou áreas de necrose, porém com trabéculas ósseas finas.

Nos períodos de 7 e 15 dias os animais dos grupos C e N, tratados pela PDT, apresentaram um tecido conjuntivo bem desenvolvido com moderado número de fibroblastos, discreto infiltrado inflamatório crônico e tecido ósseo moderadamente desenvolvido. Aos 30 dias, apresentaram um ligamento periodontal íntegro, organizado e com fibras colágenas paralelas entre si. O tecido conjuntivo apresentou-se bem desenvolvido, íntegro e com ausência de infiltrado inflamatório (Figuras 3 e 4).

Análise histométrica

A análise intragrupo demonstrou que os animais do grupo C tratados pela PDT ($0.38\pm 0.05\text{mm}^2$; $0.41\pm 0.03\text{mm}^2$; $0.40\pm 0.02\text{mm}^2$) apresentaram uma menor PO quando comparados à RAR ($1.09\pm 0.13\text{mm}^2$; $1.02\pm 0.19\text{mm}^2$; $0.99\pm 0.28\text{mm}^2$) e TBO ($0.66\pm 0.14\text{mm}^2$; $0.73\pm 0.26\text{mm}^2$; $0.79\pm 0.99\text{mm}^2$) em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). No grupo N a PDT ($0.40\pm 0.03\text{mm}^2$; $0.42\pm 0.06\text{mm}^2$; $0.44\pm 0.08\text{mm}^2$) também apresentou uma menor PO comparado à RAR ($1.91\pm 0.21\text{mm}^2$; $1.89\pm 0.22\text{mm}^2$; $1.92\pm 0.34\text{mm}^2$) e ao TBO ($0.76\pm 0.09\text{mm}^2$; $0.89\pm 0.22\text{mm}^2$; $0.82\pm 0.26\text{mm}^2$) aos 7, 15 e 30 dias respectivamente ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Na análise intergrupos, o tratamento RAR apresentou uma PO significativamente maior nos animais do grupo N ($1.91\pm 0.21\text{mm}^2$; $1.89\pm 0.22\text{mm}^2$; $1.92\pm 0.34\text{mm}^2$) comparados aos animais do grupo C ($1.09\pm 0.13\text{mm}^2$; $1.02\pm 0.19\text{mm}^2$; $0.99\pm 0.28\text{mm}^2$) em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). O resultado mais significativo do estudo mostrou que no grupo N, o tratamento da PDT ($0.40\pm 0.03\text{mm}^2$; $0.42\pm 0.06\text{mm}^2$; $0.44\pm 0.08\text{mm}^2$) apresentou uma menor PO comparados aos animais do grupo C tratados pela RAR ($1.09\pm 0.13\text{mm}^2$; $1.02\pm 0.19\text{mm}^2$; $0.99\pm 0.28\text{mm}^2$) em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$) (Tabela 2 e Figura 5).

Análise imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica para a identificação do número de células TRAP positivas fortaleceu os resultados histométricos.

Na análise intragrupo os animais do grupo C tratados pela PDT apresentaram um número significativamente menor de células TRAP positivas (1.80 ± 0.83 ; 2.00 ± 0.70 ; 2.01 ± 0.34) quando comparado aos tratamentos RAR (4.80 ± 0.83 ; 5.20 ± 2.16 ; 5.80 ± 1.48) e TBO (4.40 ± 1.14 ; 4.60 ± 1.14 ; 4.54 ± 1.34) em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). No grupo N a PDT também apresentou um menor número de células TRAP positivas (1.60 ± 0.54 ; 2.24 ± 1.74 ; 2.47 ± 1.34)

comparado à RAR (7.80 ± 0.83 ; 8.20 ± 0.86 ; 8.80 ± 0.90) e ao TBO (5.60 ± 1.14 ; 5.93 ± 1.23 ; 5.00 ± 1.12) aos 7, 15 e 30 dias respectivamente ($p<0,05$).

Na análise intergrupos, o tratamento RAR apresentou um maior número de células TRAP positivas nos animais do grupo N (7.80 ± 0.83 ; 8.20 ± 0.86 ; 8.80 ± 0.90) comparado aos animais do grupo C (4.80 ± 0.83 ; 5.20 ± 2.16 ; 5.80 ± 1.48) em todos os períodos experimentais ($p<0,05$) (Figuras 6 e 7). O resultado mais significativo do estudo mostrou que no grupo N, o tratamento da PDT (1.60 ± 0.54 ; 2.24 ± 1.74 ; 2.47 ± 1.34) apresentou um menor número de células TRAP positivas comparados aos animais do grupo C tratados por RAR (4.80 ± 0.83 ; 5.20 ± 2.16 ; 5.80 ± 1.48) em todos os períodos experimentais ($p<0,05$) (Tabela 3).

Discussão

A escolha do rato, como modelo animal experimental baseou - se nos estudos de Klausen (1991). Segundo este autor, o rato é favorável como modelo experimental para o desenvolvimento e estudo da doença periodontal pela semelhança do seu periodonto com o do homem, tendo como divergência apenas a presença da queratinização do epitélio sulcular.

O modelo de indução da doença periodontal utilizado no presente estudo foi o proposto por Johnson (1975), que utilizou a colocação de um fio de algodão ao redor dos molares de ratos. O autor salientou que a ligadura favorece o acúmulo bacteriano desenvolvendo dessa forma, a doença periodontal. No presente estudo este modelo também mostrou-se eficiente na indução da doença periodontal experimental, pois a ligadura induziu a formação de placa bacteriana e uma resposta inflamatória local. A doença periodontal foi caracterizada pelos sinais clínicos de inflamação gengival, como edema, vermelhidão e perda da aderência do tecido gengival ao dente.

Os animais do grupo N não apresentaram um ganho de peso significativo durante o estudo provavelmente pelas alterações sistêmicas causadas pela aplicação da nicotina que dificulta a absorção de alguns nutrientes e acelera o metabolismo lipídico causando uma maior queima de calorias (Filozof et al. 2004). Ainda em relação à nicotina, as injeções intermitentes simulam a variação diurna da exposição de nicotina observada em fumantes (Saldanha et al. 2004) e a dose aplicada está correlacionada aos níveis sistêmicos de indivíduos que consomem de 10 a 20 cigarros por dia, considerados pacientes de alto risco para o desenvolvimento da doença periodontal (Gonzalez et al. 1996).

Na análise intergrupo, o tratamento RAR apresentou uma PO e um número de células TRAP positivas significativamente maiores nos animais do grupo N comparado aos animais do grupo C em todos os períodos experimentais. Isto demonstra que os resultados do tratamento periodontal

foram menos efetivos nos animais tratados sistemicamente com nicotina. Reforçando estes resultados, recentes trabalhos da literatura mostraram que a aplicação subcutânea (Bosco et al. 2007) ou intraperitoneal (Breivik et al. 2009) de nicotina em ratos aumentou a perda óssea periodontal de forma significativa comparado aos animais dos grupos controle. As razões para estes resultados podem ser atribuídas provavelmente aos efeitos locais da nicotina (Ramseier et al. 2009) que causa vasoconstrição gengival dificultando a sua nutrição e defesa, e também altera a composição da microbiota subgengival permitindo um maior acúmulo de patógenos periodontais. Além disto, esta substância pode aumentar a degradação das fibras colágenas pelos fibroblastos (Zhang et al. 2009) e inibir a resposta do sistema imune (Breivik et al. 2009) por promover a diminuição da fagocitose e quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, e por reduzir a produção de anticorpos e a viabilidade de linfócitos T (Holt & Keast 1977).

Os animais do grupo C apresentaram uma PO significativamente maior no tratamento RAR comparado ao TBO aos 7 e 15 dias e à PDT em todos os períodos experimentais. Já nos animais do grupo N, ocorreu uma PO significativamente maior no tratamento RAR comparado ao TBO e à PDT em todos os períodos experimentais, sendo que estes resultados estão em concordância com os dados imunoistoquímicos. Estes resultados demonstram que a RAR isoladamente não foi efetiva no controle da perda óssea nas áreas de furca dos animais de ambos os grupos. Clinicamente, é evidenciado que a RAR com instrumentos manuais promove os melhores resultados para o tratamento da doença periodontal (Lindhe et al. 1982). No entanto, diversos fatores podem limitar o sucesso da RAR tais como concavidades radiculares, apinhamento dental, áreas profundas, zonas de bifurcação, que dificultam o acesso dos instrumentos manuais na bolsa periodontal. Devidos a estes fatores anatômicos limitantes, terapias coadjuvantes ao tratamento convencional têm sido propostas (Almeida et al. 2008b).

Uma das terapias periodontais alternativas ao tratamento periodontal não cirúrgico seria o uso de antibióticos sistêmicos, porém com a desvantagem de causar o aparecimento de cepas bacterianas resistentes (Wainwright 1998, Kömerik 2003, Gad et al. 2004). Desta forma o uso de agentes antimicrobianos locais como a PDT constitui uma alternativa coadjuvante para o tratamento da periodontite.

A PDT consiste na associação de um agente fotossensibilizador com uma fonte de luz, sendo inicialmente utilizada para tratamento oncológico (Tomaselli et al. 2001). Estudos têm mostrado resultados favoráveis utilizando os princípios da PDT contra microrganismos envolvidos com a doença periodontal (Yilmaz et al. 2002, Komerick 2003) e peri-implantar (Shibli et al. 2003, Shibli et al. 2006).

No presente estudo os subgrupos tratados localmente com PDT apresentaram uma menor PO e um menor número de células TRAP positivas comparado ao TBO em todos os períodos experimentais. Os efeitos benéficos da PDT coadjuvante ao tratamento mecânico da doença periodontal provavelmente se deve aos efeitos foto-destrutivos sobre as diferentes espécies bacterianas, presentes nas áreas de doença periodontal induzida. A atividade fotodinâmica dos fotossensibilizantes está baseada nas reações foto-oxidativas que promovem alterações bioquímicas e morfológicas nas células alvo (Prates et al. 2007). Quando a molécula da droga fotossensibilizadora absorve os fótons de uma fonte luz ressonante à banda de absorbância do fotossensibilizador, ela passa do estado fundamental para o estado de excitação simples. Dependendo da estrutura de sua molécula e do ambiente, pode perder sua energia por processo eletrônico ou físico e retornar ao estado fundamental, ou pode passar a uma transição para o estado de excitação triplo (estado tripleto). Nesse estágio, as moléculas podem novamente sofrer um decaimento eletrônico e retornarem ao estado fundamental sofrendo reações redox com seu ambiente (Reação tipo I), ou sua energia de excitação pode ser transferida para a molécula de

oxigênio, permitindo a formação de oxigênio singlete (Reação tipo II). Estas espécies de oxigênio reativo são responsáveis por danos irreversíveis à membrana citoplasmática bacteriana, incluindo modificação protéica, na cadeia respiratória e nos ácidos nucleicos (Wainwright et al. 1998).

O resultado mais importante do estudo demonstrou que os animais do grupo N, que receberam o tratamento da PDT, apresentaram menor PO e um número menor de células TRAP positivas comparado aos animais do grupo C que receberam o tratamento de RAR. Os efeitos benéficos da PDT na doença periodontal poderiam ser explicados, não só pela atividade antimicrobiana local, descrita anteriormente, como também pelo fato da fonte de luz utilizada ser o LLLT. Estudos têm relatado que a utilização da LLLT favorece a quimiotaxia celular (Hourel et al. 2007), promove vasodilatação e angiogênese local e desta forma poderia haver um aumento na difusão de oxigênio no tecido, favorecendo o processo de reparo, pois, a secreção do colágeno pelos fibroblastos no espaço extracelular ocorre somente na presença de altas taxas de pressão de oxigênio (Al-Watban et al. 1997).

A homeostase do tecido ósseo está na dependência de uma dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos, células de formação óssea, e osteoclastos, células de reabsorção óssea (Takayanagi 2005). Durante o processo de reabsorção óssea citocinas pró inflamatórias tais como a Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 3 (IL-3) e o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) recrutam e diferenciam precursores de osteoclastos na área do osso perialveolar (Wang et al. 1997). Todo este sistema é influenciado por vários fatores inclusive pelo LLLT que pode inclinar este balanço a favor dos osteoblastos acelerando a sua formação e estimulando a sua atividade (Freitas et al. 2000), além de inibir a produção dos mediadores inflamatórios por células do ligamento periodontal (Saito et al. 1991).

Apesar das ações benéficas no processo de reparo tecidual, a PDT pode ter seus efeitos limitados por alguns fatores tais como, coeficiente de absorção do corante, energia da fonte de

luz, concentração do fotossensibilizador e o tempo de duração do estado tripleto da molécula (Wainwright et al. 1998).

Diante dos nossos resultados e levando em consideração os limites do estudo, pode-se concluir que a PDT foi efetiva como tratamento coadjuvante à RAR na redução da perda óssea em periodontite experimentalmente induzida em ratos tratados ou não com nicotina.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo auxílio para o desenvolvimento desta pesquisa (Processo FAPESP 2008/04927-3).

Referências Bibliográficas *

- Adriaens, P. A., De Boever, J. A. & Loesche, W. J. (1988) Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in human. *J Periodontol* **59**, 222-230.
- Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Bonfante, S. & Garcia, V. G. (2008a) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* **79**, 2156-2165.
- Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Oshiiwa, M. & Garcia, V. G. (2008b) In Vivo Effect of Photodynamic Therapy on Periodontal Bone Loss in Dental Furcations. *J Periodontol* **79**, 1081-1088.
- Al-Watban, F. A. H. & Zhang, X. Y. (1997) Comparison of wound healing process using argon and krypton lasers. *J Clin Laser Med Surg* **15**, 209-215.
- Anusaksathien, O., Laplace, C., Li, X., Ren, Y., Peng, L., Goldring, S. R. & Galson, D.L. (2001) Tissue-specific and ubiquitous promoters direct the expression of alternatively spliced transcripts from the calcitonin receptor gene. *J. Biol. Chem.* **276**, 22663–22674.
- Azarpazhooh, A., Shah, P. S, Tenenbaum, H. C. & Goldberg, M. B. (2010) The Effect of Photodynamic Therapy for Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontol* **81**, 4-14.
- Bauer, T. W., Hahn, S. M., Spitz, F. R, Kachura, A., Glatstein, E. & Fraker, D. L. (2001) Preliminary report of photodynamic therapy for intraperitoneal sarcomatosis. *Ann Surg Onc* **8**, 254-259.

* Normalização Segundo a Revista Journal of Clinical Periodontology.

- Bosco, A. F., Bonfante, S., Almeida, J. M., Luize, D. S., Nagata, M. J. H. & Garcia, V. G. (2007) A Histologic and Histometric Assessment of the Influence of Nicotine on Alveolar Bone Loss in Rats. *J Periodontol* **78**, 527-532.
- Bostrom, L., Linder, L. E. & Bergstrom J. (1998) Influence of smoking on the outcome of periodontal surgery. A 5-year follow-up. *J Clin Periodontol* **25**, 194-201.
- Breivik, T., Gundersen, Y., Gjermo, P., Von Hörsten, S. & OPSTAD, P. K. (2009) Nicotinic acetylcholine receptor activation mediates nicotine-induced enhancement of experimental periodontitis. *J Periodontal Res* **44**, 297-304.
- Calsina, G., Ramon, J. M. & Echeverria, J. J. (2002) Effects of smoking on periodontal tissues. *J Clin Periodontol* **29**, 771-776.
- César-Neto, J. B., Benatti, B. B., Sallum, E. A., Casati, M. Z. & Nociti JR, F. H. (2006) The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res* **41**, 118-123.
- Cullinan, M. P., Ford, P. J. & Seymour, G. J. (2009) Periodontal disease and systemic health: current status. *Aust Dent J.* **54**, 62-69.
- Dörtbudak, O., Haas, R., Bernhart, T & Mailath-pokorny, G. (2001) Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* **12**, 104-108.
- Ebisu, S., Noiri, Y. (2007) Oral Biofilms and bone resorption. *Clin Calcium* **17**, 179-184.
- Fernandes, L. A., Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J., Martins, T. M., Okamoto, T. & Garcia, V. G. (2009) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* **36**, 219-228.

- Filozof, C., Fernandez Pinilla, M. C. & Fernandez-Cruz, A. (2004) Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev* **5**: 95-103.
- Freitas, L. G. F., Baranauskas, V. & Cruz-Höfling, M. A. (2000) Laser effects on osteogenesis. *Appl Surface Sci* **154-158**, 548-554.
- Gad, F., Zahra, T., Hasan, T. & Hamblin, M. R. (2004) Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrobial Agents Chemother* **48**, 2173-2178.
- Genco, R. J. (1996) Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* **67**, 1041-1049.
- González, Y. M., De Nardin, A., Grossi, S. G., Machtei, E. E., Genco, R. J. & De Nardin E. (1996) Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. *J Dent Res* **75**, 796-802.
- Goodson, J. M. (1989) Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. *J Dent Res* **68**, 625-632.
- Haber, J., Wattles, J., Crowley, M., Mandell, R., Joshipura, K. & Kent, R. L. (1993) Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol* **64**, 16-23.
- Hassumi, M. Y., Silva-Filho, V. J., Campos-Júnior, J. C., Vieira, S. M., Cunha, F. Q., Alves, P. M., Alves, J. B., Kawai, T., Gonçalves, R. B. & Napimoga, M. H. (2009) PPAR-gamma agonist rosiglitazone prevents inflammatory periodontal bone loss by inhibiting osteoclastogenesis. *Int Immunopharmacol.* **9**, 1150-1158.

- Holt, P.G. & Keast, D. (1977) Environmentally induced changes in immunological function: acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in man and experimental animals. *Bacteriol Rev* **41**, 205-216.
- Hourelid, N. & Abrahamse, H. (2007) In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². *Photomed Laser Surg* **25**, 78-84.
- Jin, Q., Cirelli, J. A., Park, C. H., Sugai, J. V., Taba, M. Jr., Kostenuik, P. J & Giannobile, W. V. (2007) RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol.* **78**, 1300-1308.
- Johnson, J. H. (1975) Effects of local irritation and dextran and sufhat administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res* **10**, 332-345.
- Kaldahl, W. B., Kalkwarf, K. L. & Patil, K. D. (1993) A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol* **64**, 243-253.
- Kamma, J. J. & Slots, J. (2003) Herpes virus bacterial interaction in aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* **30**, 420-426.
- Khojasteh, A., Eslaminejad, M. B. & Nazarian, H. (2008) Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelete-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **106**, 356-362.
- Klausen B. (1991) Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* **62**, 59-73.
- Kömerik, N. (2003) In vitro killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **47**, 932- 940.

- Lindhe, J., Westfelt, E., Nyman, S., Socransky, S.S . & Heijl, L. (1982) Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. A clinical study. *J Clin Periodontol* **9**, 115-128.
- Liu, S., Cheng, Y., Xu, W., Bian, Z. (2010) Protective effects of follicle-stimulating hormone inhibitor on alveolar bone loss resulting from experimental periapical lesions in ovariectomized rats. *J Endod.* **36**, 658-63.
- Lulic, M., Görög, I. L., Salvi, G. E., Ramseier, C. A., Mattheos, N. & Lang, N. P. (2009) One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **36**, 661-666.
- Okamoto, M., Kita, T., Okuda, H., Tanaka, T. & Nakashima, T. (1994) Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. *Pharmacol Toxicol* **75**, 1-6.
- Oliveira, R. R., Schwartz-Filho, H. O., Novaes, A. B. & Taba, M. (2007) Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* **78**, 965-973.
- Pinto, J. R., Bosco, A. F., Okamoto, T., Guerra, J. B. & Piza, I. G. (2002) Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. *Braz Dent J* **13**, 3-9.
- Prates, R. A., Yamada J. R. A. M., Suzuki, L. C., Eiko Hashimoto, M. C., Cai, S., Gouw-Soares, S., Gomes, L. & Ribeiro, M. S. (2007) Bactericidal effect of malachite green and red laser on actinobacillus actinomycetemcomitans *J Photochem Photobiol B* **86**, 70-76.
- Ramseier, C. A. & Fundak, A. (2009) Tobacco use cessation provided by dental hygienists. *Int J Dent Hyg* **7**, 39-48.
- Rams, T. E. & Slots, J. (1996) Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol 2000* **10**, 139-159.

- Renvert, S., Dahlen, G. & Wikstrom, M. (1998) The clinical and microbiological effects of non-surgical periodontal therapy in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol* **25**, 153-157.
- Saito, S., Ngan, P., Rosol, T., Saito, M., Shimizu, H., Shinjo, N., Shanfeld, J. & Davidovitch, Z. (1991) Involvement of PGE synthesis in the effect of intermittent pressure and interleukin-1 beta on bone resorption. *J Dent Res* **70**, 27-33.
- Saldanha, J. B., Pimentel, S. P., Casati, M. Z., Sallum, E. A., Barbieri, D., Moreno, H. J. & Nociti, F. H. (2004) Guided bone regeneration may be negatively influenced by nicotine administration: a histologic study in dogs. *J Periodontol.* **75**, 565-671.
- Shibli, J. A., Martins, M. C., Nociti, F. H. JR., Garcia, V. G. & Marcantonio, E. JR. (2003) Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: A preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol* **74**, 338-345.
- Shibli, J. A., Martins, M. C., Ribeiro, F. S., Garcia, V. G., Nociti, F. H. & Marcantonio, E. (2006) Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* **17**, 273-281.
- Sigusch, B. W., Engelbrecht, M., Völpel, A., Holletschke, A., Pfister, W. & Schutze, J. (2010) Full-Mouth Antimicrobial Photodynamic Therapy in *Fusobacterium nucleatum*- Infected Periodontitis Patients. *J Periodontol* **81**, 975-981.
- Sigusch, B. W., Pfitzner, A., Albrecht, V. & Glockmann, E. (2005) Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* **76**, 1100-1105.
- Takayanagi, H (2005). Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res* **40**, 287-293.

- Tomaselli, F., Maier, A., Sankin, O., Anegg, U., Stranzl, U., Pinter, H., Kapp, K. & Smolle-Jüttner, F. M. (2001) Acute effects of combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in lung câncer – a clinical pilot study. *Lasers Surg Méd* **28**, 399-403.
- Yilmaz, S., Kuru, B., Kuru, L., Noyan, U., Argun, D. & Kadir, T. (2002) Effect of Galium Arsenide Diode Laser on human periodontal disease: a microbial and clinical study. *Lasers Surg Med* **30**, 60-66.
- Wainwright, M. (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* **42**, 13-28.
- Wang, C. Y., Tani-Ishii, N. & Stashenko, P. (1997) Bone-resortive cytokine gene expression in periapical lesion in the rat. *Oral Microbiol Immunol.* **12**, 65-71.
- Zhang, W., Song, F. & Windsor, L. J. (2009) Cigarette smoke condensate affects the collagen-degrading ability of human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* **44**, 704-713.

Relevância Clínica

Fundamentação Científica para o Estudo: O hábito de fumar é um fator de risco para doença periodontal. Nesses casos, apenas a RAR não é suficiente para a resolução do caso. A PDT tem mostrado resultados satisfatórios como um tratamento periodontal coadjuvante, mas a sua aplicação em pacientes fumantes é escasso na literatura.

Principais Resultados: A PDT foi eficaz como tratamento coadjuvante à RAR na redução da perda óssea em periodontite experimentalmente induzida em ratos tratados ou não com nicotina.

Implicações Práticas: A PDT pode ser usada como tratamento coadjuvante ao tratamento não-cirúrgico convencional em pacientes fumantes.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Médias e desvios padrões (M±DP) dos pesos corporais (g) de acordo com cada grupo, tratamento e período.

Grupo C - M±DP				
Períodos	Período inicial	7 dias	15 dias	30 dias
Tratamentos				
RAR	245.85±4.18 *	262.28±2.05 *&†	282.85±1.46 *&†	306.00±0.81 *&†
TBO	247.42±5.88 *	262.01±1.41 *&†	284.28±1.11 *&†	309.00±1.15 *&†
PDT	247.28±5.31 *	261.42±1.61 *&†	284.14±2.03 *&†	307.85±1.95 *&†
Grupo N - M±DP				
Períodos	Período inicial	7 dias	15 dias	30 dias
Tratamentos				
RAR	246.85±5.60	241.80±5.63&†	246.20±4.02&†	250.20±2.58&†
TBO	248.85±6.64	246.80±4.91&†	243.60±4.66&†	249.20±1.30&†
PDT	246.57±4.92	243.40±4.77*&†	246.00±5.09&†	252.20±5.80&†

* Diferença significativa entre os períodos (Inicial, 7, 15, e 30 dias), mesmos grupos e tratamentos (ANOVA e Tukey, com $p < 0,05$).

& Diferença significativa entre os grupos, mesmos tratamentos e períodos (ANOVA e Tukey, com $p < 0,05$).

† Diferença significativa entre os grupos e tratamentos, mesmos períodos (ANOVA e Tukey, com $p < 0,05$).

Tabela 2: Médias e desvios padrões (M±DP) dos dados histométricos da PO (mm²) na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo, tratamento e período.

Grupo C - M±DP			
Períodos	7 dias	15 dias	30 dias
Tratamentos			
RAR	1.09±0.13 ^{×≈}	1.02±0.19 ^{×≈}	0.99±0.28 ^{×≈}
TBO	0.66±0.14 ^{*+}	0.73±0.26 ^{*+}	0.79±0.99 ⁺
PDT	0.38±0.05 [*]	0.41±0.03 [*]	0.40±0.02 [*]
Grupo N - M±DP			
Períodos	7 dias	15 dias	30 dias
Tratamentos			
RAR	1.91±0.21 [×]	1.89±0.22 [×]	1.92±0.34 [×]
TBO	0.76±0.09 ^{*+}	0.89±0.22 ^{*+}	0.82±0.26 ^{*+}
PDT	0.40±0.03 ^{*≈}	0.42±0.06 ^{*≈}	0.44±0.08 ^{*≈}
N	60	60	60

^{*} Diferença em relação ao tratamento de RAR, mesmos grupos e períodos (ANOVA e Tukey, com p<0,05).

⁺ Diferença em relação ao tratamento da PDT, mesmos grupos e períodos (ANOVA e Tukey, com p<0,05).

[×] Diferença entre diferentes grupos, mesmos períodos e tratamentos (ANOVA e Tukey, com p<0,05).

[≈] Diferença entre diferentes grupos e tratamentos, mesmos períodos (ANOVA e Tukey, com p<0,05).

Tabela 3: Médias e desvios padrões (M±DP) do número de células TRAP positivas na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo, tratamento e período.

Grupo C - M±DP			
Períodos	7 dias	15 dias	30 dias
Tratamentos			
RAR	4.80±0.83 ^{x≈}	5.20±2.16 ^{x≈}	5.80±1.48 ^{x≈}
TBO	4.40±1.14 ⁺	4.60±1.14 ^{*+}	4.54±1.34 ⁺
PDT	1.80±0.83 [*]	2.00±0.70 [*]	2.01±0.34 [*]
Grupo N - M±DP			
Períodos	7 dias	15 dias	30 dias
Tratamentos			
RAR	7.80±0.83 ^x	8.20±0.86 ^x	8.80±0.90 ^x
TBO	5.60±1.14 ⁺	5.93±1.23 ^{*+}	5.00±1.12 ^{*+}
PDT	1.60±0.54 ^{*≈}	2.24±1.74 ^{*≈}	2.47±1.34 ^{*≈}
N	60	60	60

* Diferença em relação ao tratamento de RAR, mesmos grupos e períodos (ANOVA e Tukey, com $p < 0,05$).

+ Diferença em relação ao tratamento da PDT, mesmos grupos e períodos (ANOVA e Tukey, com $p < 0,05$).

x Diferença entre diferentes grupos, mesmos períodos e tratamentos (ANOVA e Tukey, com $p < 0,05$).

≈ Diferença entre diferentes grupos e tratamentos, mesmos períodos (ANOVA e Tukey, com $p < 0,05$).

Lista de Figuras

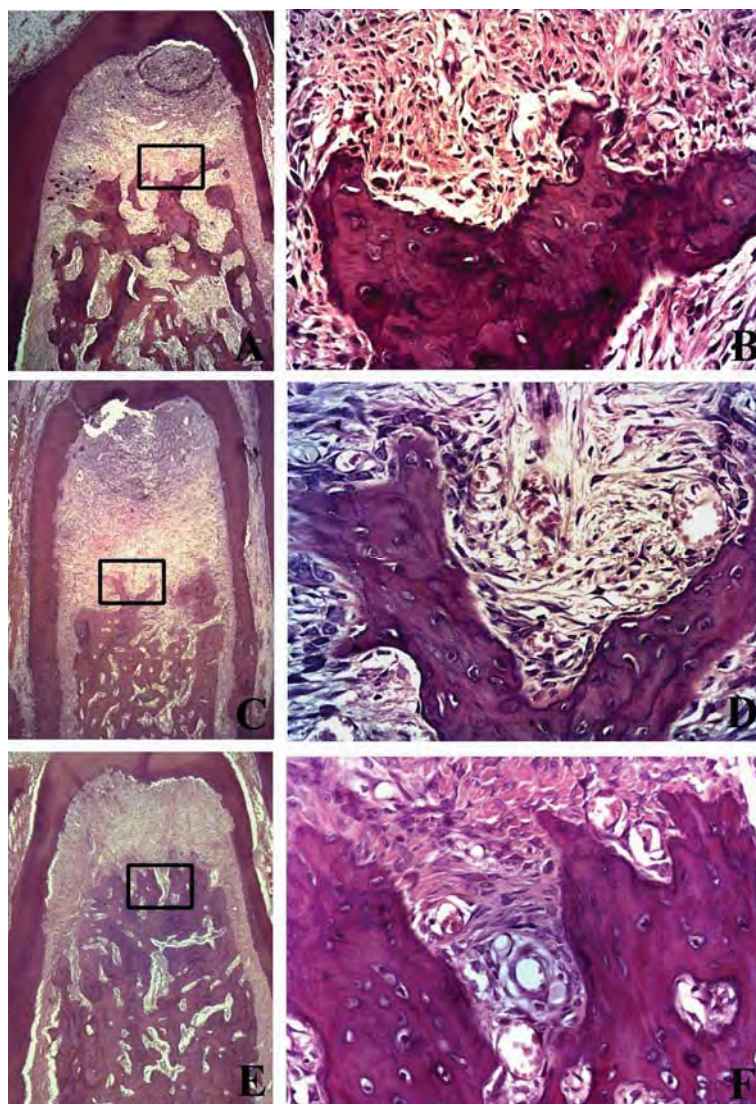


Figura 1: Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. Grupo C - 7 dias. Tratamento I (RAR). A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 40X. Grupo C - 15 dias. Tratamento I (RAR). C) HE. Aumento original 5X. D) HE. Aumento original 40X. Grupo C - 30 dias. Tratamento I (RAR). E) HE. Aumento original 5X. F) HE. Aumento original 40X.

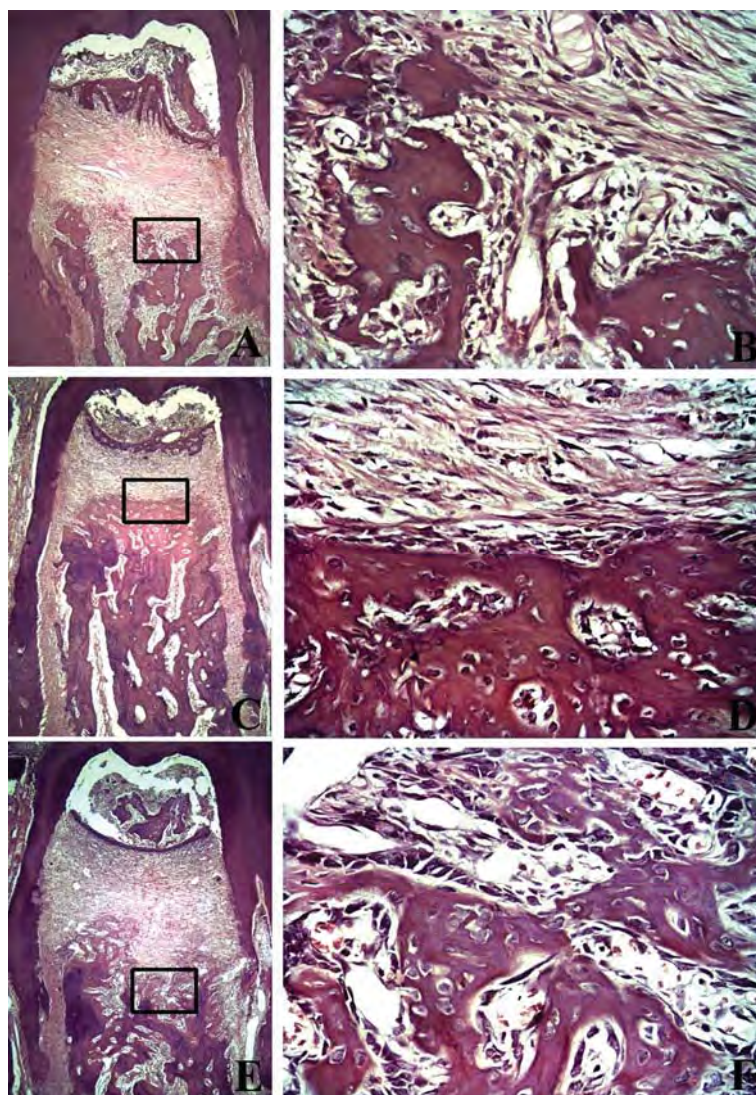


Figura 2: Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. Grupo N - 7 dias. Tratamento I (RAR). A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 40X. Grupo N - 15 dias. Tratamento I (RAR). C) HE. Aumento original 5X. D) HE. Aumento original 40X. Grupo N - 30 dias. Tratamento I (RAR). E) HE. Aumento original 5X. F) HE. Aumento original 40X.

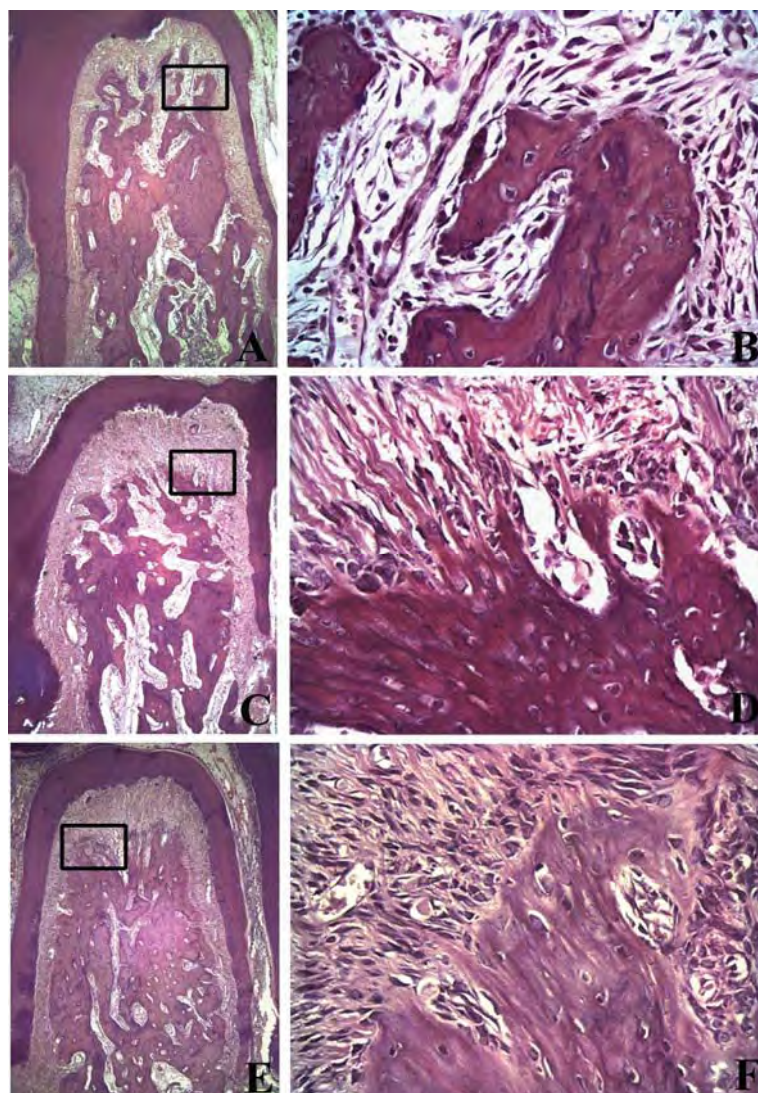


Figura 3: Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. Grupo C - 7 dias. Tratamento III (PDT). A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 40X. Grupo C - 15 dias. Tratamento III (PDT). C) HE. Aumento original 5X. D) HE. Aumento original 40X. Grupo C - 30 dias. Tratamento III (PDT). E) HE. Aumento original 5X. F) HE. Aumento original 40X.

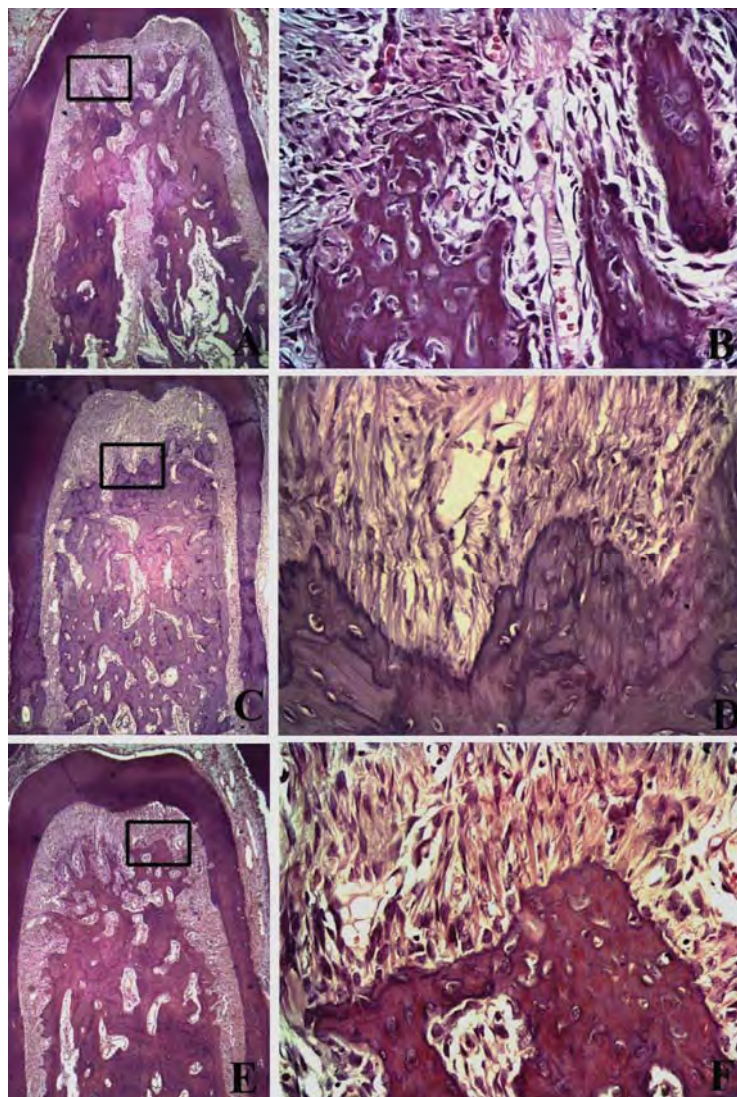


Figura 4: Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. Grupo N - 7 dias. Tratamento III (PDT). A) HE. Aumento original 5X. B) HE. Aumento original 40X. Grupo N - 15 dias. Tratamento III (PDT). C) HE. Aumento original 5X. D) HE. Aumento original 40X. Grupo N - 30 dias. Tratamento III (PDT). E) HE. Aumento original 5X. F) HE. Aumento original 40X.

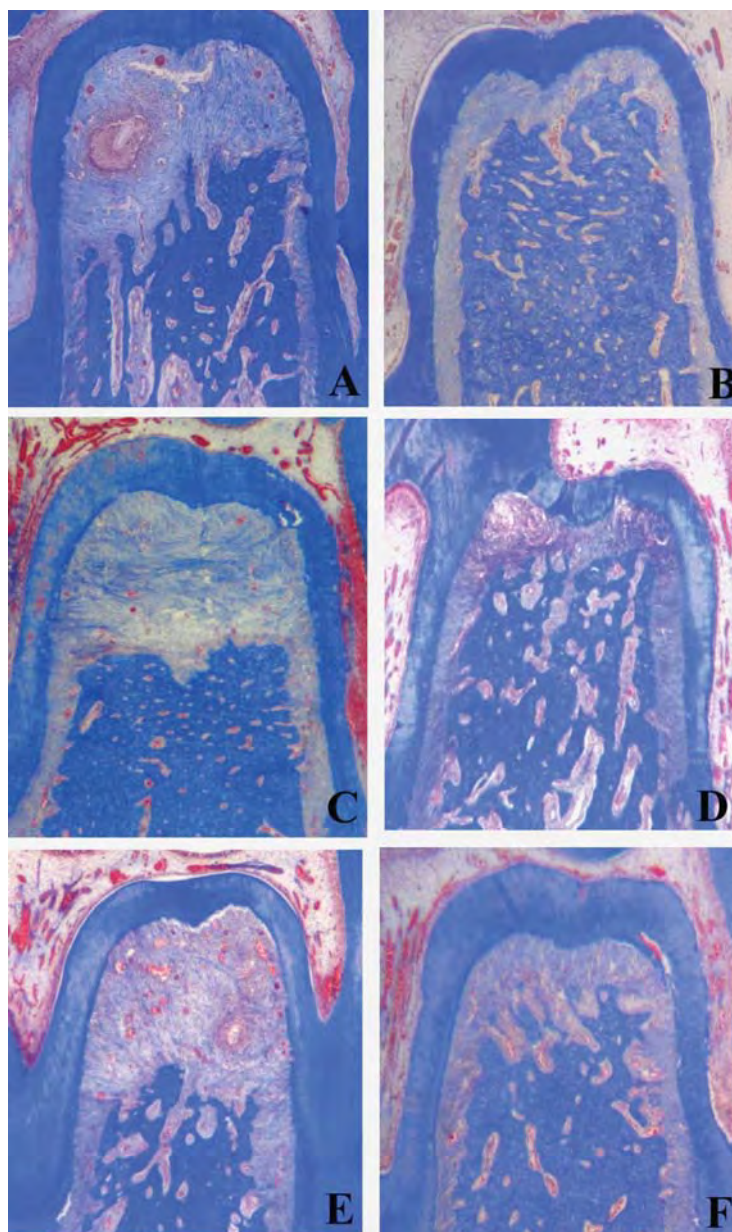


Figura 5: Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. A) TM. Grupo C - 7 dias. Tratamento I (RAR). Aumento original 12.5X. B) TM. Grupo N - 7 dias. Tratamento III (PDT). Aumento original 12.5X. C) TM. Grupo C - 15 dias. Tratamento I (RAR). Aumento original 12.5X. D) TM. Grupo N - 15 dias. Tratamento III (PDT). Aumento original 12.5X. E) TM. Grupo C - 30 dias. Tratamento I (RAR). Aumento original 12.5X. F) TM. Grupo N - 30 dias. Tratamento III (PDT). Aumento original 12.5X.

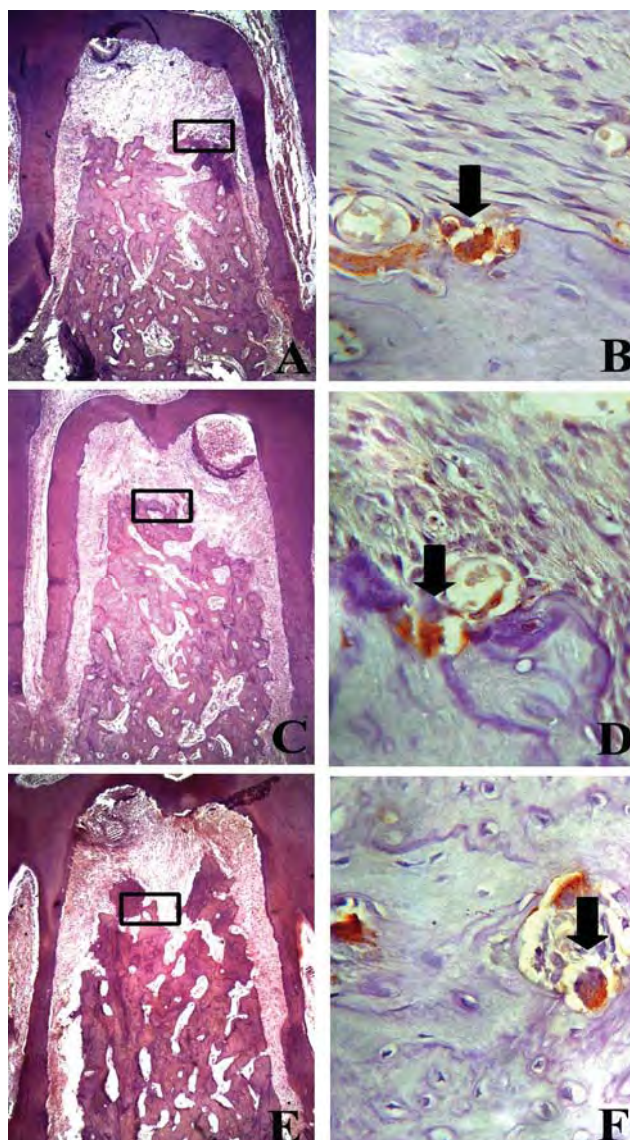


Figura 6: Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. Grupo C - 7 dias. Tratamento I (RAR). A) HE. Aumento original 5X. B) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 100X. Grupo C - 15 dias. Tratamento I (RAR). C) HE. Aumento original 5X. D) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 100X. Grupo C - 30 dias. Tratamento I (RAR). E) HE. Aumento original 5X. F) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 100X.

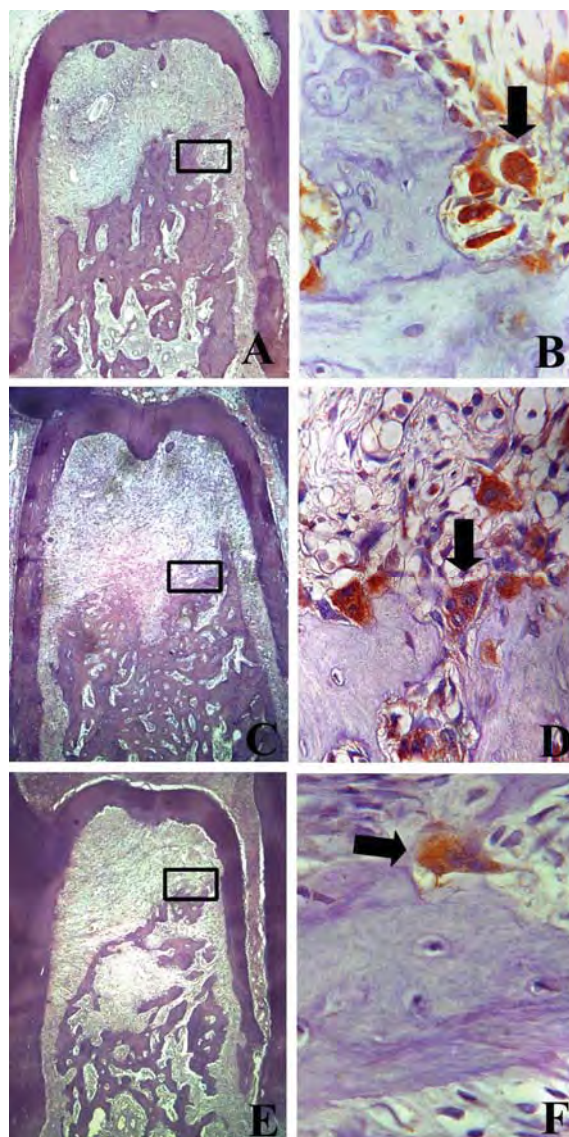


Figura 7: Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida. Grupo N - 7 dias. Tratamento I (RAR). A) HE. Aumento original 5X. B) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 100X. Grupo N - 15 dias. Tratamento I (RAR). C) HE. Aumento original 5X. D) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 100X. Grupo N - 30 dias. Tratamento I (RAR). E) HE. Aumento original 5X. F) Imunoperoxidase para TRAP (Seta). Aumento original 100X.

Anexo A

Revisão de Literatura

DOENÇA PERIODONTAL E A NICOTINA *

A relação entre fumo, prevalência e severidade da doença periodontal tem sido discutida há muito tempo, e tem se sugerido que o hábito de fumar é um dos fatores de risco mais significativos para seu desenvolvimento e progressão (SALUM et al., 2007; MORENO et al., 2010).

Os malefícios causados pela inalação da fumaça do cigarro podem atingir desde crianças causando alterações tais como a Síndrome da Morte Infantil, problemas respiratórios e problemas no ouvido; até adultos que podem sofrer efeitos imediatos cardiovasculares e estarem mais propensos a doenças coronárias e câncer de pulmão. Além disso, pode causar o desenvolvimento de doenças periodontais mais agressivas (BARTECCHI et al., 1994; LOESCH, 1994).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo do tabaco desempenha um importante papel na patogênese da doença periodontal inflamatória, apresentando maior prevalência e gravidade da doença em indivíduos fumantes quando comparado aos não fumantes (GOULTSCHIN et al., 1990; HABER et al., 1993).

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

Existe uma forte relação do fumo de cigarro com a quantidade de depósito de cálculo subgingival expressos em 71%, 53% e 28% em fumantes, ex-fumantes e não-fumantes, respectivamente (RAMSEIER; FUNDAK, 2009). Dados de uma das investigações mais relevantes quanto ao risco periodontal avaliando 12.329 americanos mostrou que o tabagismo pode ser responsável por mais da metade dos casos entre periodontites em adultos nos Estados Unidos. Após a análise estatística dos dados foi constatado que fumantes possuem risco relativo cerca de 4 vezes maior de ter a periodontite em comparação com não-fumantes. Também tem sido sugerido que o número de cigarros fumados por dia, a história de tabagismo e o número de anos que o paciente tiver fumado são positivamente relacionados com a severidade da doença periodontal (LIMA et al., 2008).

A nicotina e seus subprodutos podem estar presentes tanto no plasma sanguíneo quanto no fluido gengival em concentrações seis vezes maior se comparado à concentração salivar. Desta forma, a nicotina tem sido associada a várias alterações celulares que podem contribuir para o início e posterior progressão da doença periodontal (NAKAYAMA et al., 2009). Dentre os efeitos mais frequentemente citados, estão alterações imunológicas (BREIVIK et al., 2009), efeitos vasoconstritores e citotóxicos sobre os tecidos e células do periodonto (NAKAYAMA et al., 2009), bem como alterações na microbiota patogênica (LAXMAN; ANNAJI, 2008).

Embora a literatura demonstre os efeitos citotóxicos e imunológicos do cigarro nos tecidos periodontais, ainda não estão completamente estabelecidos os mecanismos patogênicos do Tabaco sobre a progressão da doença periodontal inflamatória.

EFEITOS DO TABACO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A doença periodontal em pacientes fumantes pode apresentar sinais clínicos pouco evidentes uma vez que características como eritema e sangramento tecidual muitas vezes não estão presentes devido aos efeitos da nicotina não somente na vascularização tecidual como também pela indução no aumento da espessura do epitélio gengival (RIVERA, 1986).

A secreção de epinefrina, induzida pela nicotina, ativa o sistema nervoso simpático, causando inicialmente uma vasodilatação, seguido por uma vasoconstrição (BREIVIK et al., 2009). Essa constrição da microcirculação dificulta a chegada das células inflamatórias no tecido e sulco gengival, comprometendo o sistema de defesa local (HEDEN et al., 1999). Trabalhos têm demonstrado que o cigarro pode alterar a atividade dos polimorfonucleares neutrófilos, reduzindo a quimiotaxia, atividade fagocitária e aderência dessas células (MACFARLANE, 1992; PERSSON et al., 1999). Também foi observado o efeito da nicotina sobre os neutrófilos, induzindo-os à apoptose e aumentando, assim, a susceptibilidade à invasão bacteriana (MARIGGIÒ et al., 2001). A redução da adesão de fibroblastos gengivais também foi observada (ZHANG et al., 2009). A nicotina também induz alterações na resposta inflamatória pelo comprometimento local dos macrófagos e leucócitos, suprimindo seu crescimento e suas funções de quimiotaxia e fagocitose (RIVERA, 1986).

Além dos efeitos celulares, o tabaco também é capaz de reduzir a produção de anticorpos como IgG2 (QUINN et al., 1998), bem como aumentar a secreção de PGE2 quando a nicotina estava associada ao LPS, sugerindo que esta associação apresenta um efeito sinérgico na síntese de mediadores do processo inflamatório (WENDELL et al., 2001). Salvi et al. (1997) relataram que a nicotina altera o padrão de liberação de enzimas neutrofílicas como elastase e catepsinas, reduz a produção de IgA salivar, bem como promove uma resposta reduzida aos anticorpos IgG do soro para *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*. Segundo outros autores, a nicotina também aumenta a produção de outros

mediadores imunológicos como a IL1 (JOHNSON; ORGAN, 1997), TNF- α (RYDER et al., 2002) e IL6 (WENDELL et al., 2001). Uma vez que o cigarro acarreta uma maior produção de citocinas inflamatórias destrutivas, isso explicaria em parte o potencial do tabaco na patogenia da doença periodontal.

EFEITOS NA MICROBIOTA PATOGÊNICA

Em relação ao acúmulo do biofilme bacteriano, a literatura mostra que não existem diferenças significantes em indivíduos fumantes e não fumantes (BERGSTRÖM et al., 2000). As alterações no potencial de oxi-redução causadas pelo cigarro podem criar um microambiente mais favorável para o crescimento de bactérias anaeróbicas Gram negativas (ZAMBON et al., 1996). Em relação à composição da microbiota subgingival de fumantes e não fumantes, trabalhos demonstram não existir diferença nesta composição (PREBER et al., 1992; STOLTENBERG et al., 1993). Entretanto, Zambom et al. (1996) demonstraram um maior número de bactérias periodontopatógenas em fumantes, se comparado aos não fumantes, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteróides forsythus*. Outras espécies bacterianas como *Prevotella intermédia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Campylobacter rectus* também estavam em número aumentado em pacientes fumantes (VAN WINKELHOFF et al., 2002). Outro trabalho sugere que o fumo, através de alterações da resistência local, sistêmica e do nicho ecológico, favorece o crescimento de bactérias anaeróbicas aumentando assim a susceptibilidade das estruturas à doença periodontal (SATO et al., 1999).

Estudos mostram que fumantes não respondem à terapia mecânica tão bem quanto não fumantes devido ao número aumentado de bactérias como *Porphyromonas gingivallis*, *Bacteróides forsytus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que permanecem no fundo das

bolsas periodontais após raspagem e alisamento radicular (HAFFAJEE et al., 1997; RENVERT et al., 1998).

EFEITO DO TABACO NA CONDIÇÃO PERIODONTAL

A influência do tabaco na gravidade das condições periodontais foi avaliada por Haber e Kent (1992), que constataram uma maior porcentagem de sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm em pacientes fumantes. Outros autores também demonstram uma maior profundidade de sondagem, perda de inserção e mais dentes com envolvimento de furca nos fumantes do que nos não fumantes (HABER et al., 1993; STOLTENBERG et al., 1993; MULLALLY; LINDEN, 1996). Estudos *in vivo* demonstram maior perda óssea (BOSCO et al., 2007) e dentária (BERGSTROM et al., 2000; JANSSON; LAVSTEDT, 2002) devido aos efeitos deletérios do cigarro que inibe a função dos osteoblastos e fibroblastos estimulando a dos osteoclastos (NAKAYAMA et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

O consumo de tabaco pode apresentar um efeito mascarador dos sinais de inflamação tecidual. A ocorrência de sangramento gengival é reduzida em fumantes, devido à ação vasoconstritora da nicotina na microcirculação do tecido gengival (BERGSTROM, 1990). Após serem submetidos ao modelo de gengivite experimental, os indivíduos fumantes apresentaram menor sangramento e menor quantidade de sítios sangrantes quando comparado aos não fumantes (BERGSTROM; PREBER, 1986).

Em relação aos níveis de fluido proveniente do sulco gengival, McLaughlin et al. (1993) demonstraram um aumento significativo no fluido gengival, especialmente durante o ato de fumar. Em relação ao acúmulo de cálculo, alguns estudos têm demonstrado que indivíduos fumantes apresentam maior acúmulo que os não fumantes (SHEIMAN, 1971;

BERGSTROM, 1999), não existindo nenhuma diferença com relação ao índice de placa (STOLTENBERG et al., 1993; NATO et al., 2005).

Existe uma relação entre o número de cigarros fumados por dia e o tempo do hábito com a gravidade da doença periodontal, ou seja, fumantes pesados (consumo maior do que 20 cigarros ao dia) apresentam maior gravidade e maior progressão da doença, quando comparados aos não fumantes ou fumantes leves (consumo menor do que 20 cigarros por dia) (KALDAHL et al., 1996).

EFEITOS DO TABACO NA TERAPIA PERIODONTAL

Em relação ao efeito do fumo sobre a resposta tecidual após a terapia periodontal, indivíduos fumantes demonstraram ter uma resposta clínica menos favorável, se comparado a indivíduos não fumantes. Indivíduos fumantes após a raspagem e alisamento radicular, apresentaram menor redução na profundidade de sondagem e menor ganho de inserção clínica em relação aos não fumantes (PREBER; BERGSTROM, 1986). Em relação à terapia cirúrgica, Preber e Bergström (1990), demonstraram que a redução da profundidade de sondagem em pacientes fumantes foi significativamente menor do que em pacientes não fumantes. Outros trabalhos *in vivo* mostraram resultados semelhantes, sugerindo que o consumo de tabaco promove uma resposta menos favorável após a terapia cirúrgica e não cirúrgica em indivíduos fumantes (AH et al., 1994; BUNDUNELI et al., 2009). Assim, a doença periodontal associada ao tabaco é mais resistente à intervenção terapêutica (BERGSTROM; PREBER, 1994). Miller (1987) considerou que o consumo do tabaco interfere no sucesso do recobrimento radicular, resultados estes confirmados por Trombelli e Scabbia (1997). Menor redução na profundidade de sondagem, menor ganho de inserção

clínica e menor percentual de preenchimento ósseo também foram observados em pacientes fumantes após terapia periodontal regenerativa (STAVROPOULOS et al., 2004).

A nicotina pode afetar os processos de reparo e regeneração tecidual através dos seus efeitos diretos nas células e estruturas que compõem os tecidos periodontais. Estudos *in vitro* têm demonstrado que os componentes nocivos do tabaco podem modificar a morfologia e a arquitetura em culturas de fibroblastos (CATTANO et al., 2000; ZHANG et al., 2009). Além disso, a nicotina demonstrou reduzir a produção de colágeno e aumentar a produção de colagenase, importante no processo de destruição tecidual (TIOPTON; DABBOUS, 1995). A diferenciação e proliferação das células osteoprogenitoras são inibidas pelo consumo de cigarro, reduzindo, assim, o processo de reparo ou regeneração tecidual (LUI et al, 2001). Além dos efeitos sobre as células do periodonto, a nicotina também pode reduzir o potencial de reparação tecidual através da redução do suprimento sanguíneo, devido à vasoconstrição induzida pela liberação de catecolaminas, resultando em uma menor nutrição sanguínea (REUS et al., 1984).

O consumo do tabaco também apresenta efeitos negativos durante a fase de manutenção periodontal. Kaldahl et al.(1996) avaliaram pacientes submetidos a diversos tipos de terapias periodontais por 7 anos e observaram que mesmo com uma frequência de manutenção periodontal de 3 meses, indivíduos fumantes apresentavam bolsas periodontais mais profundas e menores ganhos de inserção, se comparado a não fumantes.

LASER EM BAIXA INTENSIDADE E TERAPIA FOTODINÂMICA

O uso da radiação laser em baixa intensidade tem aumentado nos últimos anos na medicina e na odontologia. A palavra LASER é o acrônimo “Light Amplification by Stimulated Emission

Radiation”. É uma forma de energia que se transforma em energia luminosa visível ou não, dependendo da matéria que produz esse tipo de radiação (CONLAN et al., 1996).

Os lasers em baixa intensidade (LLLT) mais utilizados em odontologia são os diodos de arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs), semicondutor de emissão contínua ou pulsada. O bombeamento dos lasers semicondutores pode ser realizado de várias maneiras como excitação produzida por uma corrente elétrica. Eles apresentam potências médias de algumas centenas de miliwatts, em sua maioria apresentam emissão contínua ou em alguns casos emitem pulsos curtos e com comprimentos de onda na faixa do vermelho até infravermelho. Além disso, é sabido que estes comprimentos de onda atingem grande profundidade de penetração nos tecidos, pois a água e a hemoglobina oferecem um baixo coeficiente de absorção para este tipo de radiação (RIBEIRO, 2000).

A radiação laser é apenas uma desencadeadora para a regulação do metabolismo celular, por esse motivo é que são necessárias apenas baixas doses de energia. O efeito sobre a célula vai depender do estado fisiológico que esta se encontra. Os efeitos da fototerapia com LLLT poderiam ser explicados por um aumento da proliferação de células, ou por mudanças na atividade fisiológica de células excitáveis (RIBEIRO, 2000).

Os lasers estimulam fibroblastos, colaborando na produção de fibras colágenas mais ordenadas, determinando um melhor padrão de cicatrização nas lesões (BASFORD, 1986). Esta modalidade terapêutica pode proporcionar efeitos antiinflamatórios, analgésicos e bioestimulantes, aumentando a microcirculação da área irradiada, promovendo melhores condições de reparação (MESTER et al., 1973).

Outros trabalhos demonstraram que o laser tem efeitos estimuladores sobre a síntese de fibras colágenas, fibras elásticas e na proliferação de miofibroblastos (PUGLIESE et al., 2003; HOURELD; ABRAHAMSE, 2007); além de reduzir a resposta inflamatória (MENDEZ et al., 2004)

fazendo com que feridas tratadas por essa luz apresentassem uma contração e epitelização mais rápida (AL-WATBAN; ZHANG, 1997). Outros estudos têm indicado que a terapia com LLLT pode reduzir a severidade e aumentar a velocidade de reparação de lesões da mucosa bucal associadas à quimioterapia e à radioterapia (MIGLIORATI et al., 2001; RUBENSTEIN et al., 2004).

A terapia com o LLLT tem efeitos mais pronunciados sobre órgãos ou tecidos enfraquecidos, tais como em pacientes que sofrem algum tipo de desordem funcional ou de injúrias ao tecido (RIBEIRO, 2000). Acredita-se que a energia da luz laser é mais bem aproveitada onde é mais necessária. Isso também tem sido observado em células cultivadas onde o efeito do LLLT é mais pronunciado quando aplicados sobre culturas crescidas em déficit nutricional (AZEVEDO et al., 2006).

Neste sentido estudos dos efeitos da radiação laser no processo de reparo em animais sistemicamente alterados por diabetes foram testados (REDDY, 2003; BYRNES et al., 2004). Os resultados destes estudos indicaram que a aplicação do laser aumentou a produção e maturação de colágeno, além da força de tensão das feridas (REDDY, 2003). A expressão do fator de crescimento de fibroblastos triplicou após a aplicação da terapia com LLLT (BYRNES et al., 2004).

Estudo do processo de cicatrização em feridas cutâneas em animais imunossuprimidos foi realizada por Pessoa et al. (2004), que avaliaram o efeito do LLLT (GaAlAs, 904 nm, 2,75 mW, 2.900 Hz, 120 segundos, totalizando 33 J/cm²) no processo de cicatrização de feridas em ratos tratados com corticosteróide. Para isto, foram utilizados 48 ratos, divididos nos seguintes grupos: Grupo 1: os animais não receberam nenhum tratamento, nem local nem sistêmico; Grupo 2: as feridas foram tratadas com LLLT; Grupo 3: os animais receberam injeção intraperitonal de esteróide (2 mg/kg de peso corporal); Grupo 4: os animais receberam o mesmo tratamento sistêmico do grupo 3, sendo as feridas tratadas com LLLT. Os resultados mostraram que as feridas tratadas com o esteróide tiveram um atraso na cicatrização, enquanto o LLLT acelerou este processo com uma

maior deposição de colágeno e diminuição do infiltrado inflamatório. Os autores concluíram que o LLLT acelerou a cicatrização nos ratos tratados com corticóide, balanceando os efeitos indesejáveis dessa droga no processo de cicatrização tecidual.

Os efeitos do LLLT no processo de cicatrização em feridas cutâneas em animais tratados como nicotina foi realizado por Macarini (2004). Foram utilizados cinquenta e nove ratos que receberam injeções subcutâneas de soro fisiológico, enquanto cinquenta e seis animais receberam injeções subcutâneas de nicotina durante todo o período experimental. Decorridos 30 dias das aplicações, foi criada uma ferida cirúrgica no dorso de cada animal por meio de um punch de 8 mm de diâmetro. Os animais que receberam soro fisiológico foram divididos em dois grupos: grupo I (controle), onde as feridas não receberam nenhum tipo de tratamento; e grupo II, onde as feridas foram tratadas com LLLT (AsGaAl, 660 nm, 40 mW, 3,0 J, 0,56 W/cm²). Os animais que receberam injeção de nicotina também foram divididos em dois grupos: grupo III, onde as feridas não receberam tratamento; e grupo IV, onde as feridas foram tratadas com LLLT nos mesmos parâmetros do grupo II. Decorridos 3, 7 e 14 dias do procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados. Na análise histológica, o grupo III mostrou um processo de reparação menos diferenciado que o grupo I (controle). As feridas do grupo II apresentaram um processo de reparo acelerado quando comparadas às do grupo I, assim como as feridas do grupo IV apresentaram um reparo mais avançado em relação ao grupo III. O autor verificou que a nicotina retarda, enquanto o LLLT acelera o processo de reparo de feridas cutâneas.

Nos últimos anos a comunidade científica mundial tem dado atenção especial à terapia fotodinâmica (PDT) que pode agir contra bactérias sem causar resistência, ao contrário de muitos antimicrobianos (DÖRTBUDAK et al., 2001). Esta terapia fundamenta-se na possibilidade dos lasers interagirem com drogas fotossensibilizadoras (cromóforos), o que promoverá um maior efeito fotobiológico, podendo inclusive, promover a ação letal sobre células e microorganismos. Neste

sentido, a PDT surge como um tratamento alternativo ao uso de agentes antimicrobianos tradicionais (BAUER, et al., 2001). Durante esse processo, componentes celulares fotossensíveis passam para um estado excitado quando expostos a uma luz de comprimento de onda complementar que é caracterizado pela passagem dos elétrons para níveis de energia superiores. Neste estado excitado, o fotossensibilizador pode interagir com o oxigênio molecular iniciando a formação de oxigênio singleto altamente reativo (fotoproceto Tipo II) ou interagir com outras moléculas como aceptores de elétrons resultando na produção de hidroxilas e outros radicais orgânicos (fotoproceto do Tipo I) (MACROBERT et al., 1989). Os produtos dessas reações fotoquímicas podem então danificar componentes essenciais das células ou alterar as atividades metabólicas de maneira irreversível resultando na morte bacteriana (OCHSNER, 1997). Essas reações podem também aumentar a angiogênese nos tecidos, o que proporciona mais oxigênio na área (BENSTEAD; MOORE, 1989).

Como a maioria das espécies bacterianas não apresentam componentes fotossensíveis, a utilização de um fotossensibilizador que atrai para si a luz e inicia a formação de radicais livres é importante (WILSON et al., 1992). Assim, células desprovidas de componentes fotossensíveis endógenos podem se tornar sensíveis à luz se forem coradas com fotossensibilizadores ou agentes cromóforos exógenos como o azul de metileno, azul de toluidina, eosina e hematoporfirinas (WILSON, 1993). No entanto, a habilidade de um componente em absorver uma luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Para produzir efeito antimicrobiano, os fotossensibilizadores devem apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada e não devem apresentar danos tóxicos ao hospedeiro (WILSON et al., 1992).

Inicialmente a PDT foi utilizada para promover ação letal sobre células cancerosas (TOMASELLI et al., 2001). Wilson et al. (1992) trataram 37 pacientes com porfirina sódica associado ao LLLT, obtendo resposta completa em 88%; Kennedy et al. (1990) trataram 80 lesões

cancerosas com ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) tópico com posterior irradiação do laser observando resposta completa em 90% e bons resultados estéticos. Fijan et al. (1995) utilizaram PDT com 5-ALA tópico em 49 pacientes com carcinomas basocelulares superficiais, obtendo resposta em 88%. Desta forma, a PDT tem despertado interesse da comunidade científica e o seu uso tem sido aprovada por agências de saúde ao redor de todo mundo (DOUGHERTY, 2002).

Dentre os agentes fotossensibilizadores destacam-se o azul de toluidina O, cristal violeta, fitalocianina dissulfonada de alumínio, hematoporfirinas, tionina, protoporfirina e azul de metileno. Relatos encontrados na literatura demonstram que o azul de metileno foi utilizado como coadjuvante no tratamento de diferentes patologias, face suas propriedades ansiolíticas e antidepressivas, capacidade de inativação do vírus sobre suspensão de células vermelhas (SKRIPCHENKO et al. 1997) e capacidade de ativar o efeito fotobactericida sobre diferentes microorganismos (CHAN; LAI, 2003).

Rocha et al. (1996) relataram que o Azul de Toluidina-O (TBO) vem sendo utilizado há mais de três décadas para evidenciação clínica de neoplasias malignas epiteliais. Trata-se de um corante monocromático da família das tiasinas que apresenta grande afinidade pelo DNA dos núcleos celulares e pelo RNA citoplasmático. A penetração e retenção do TBO nas células displásicas e anaplásicas são explicadas principalmente em virtude de sua afinidade pelo DNA nuclear, que é significativamente maior nessas células do que nas normais.

TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO PERIODONTAL

Devido aos efeitos antibacterianos a PDT tem sido estudada contra bactérias periodontopatógenas e como coadjuvante ao tratamento periodontal convencional. Neste sentido Sigusch et al. (2005) testaram esta terapia em um experimento com cães. Os animais foram infectados com *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* nas áreas subgingivais. Após

a inoculação das bactérias foram observados sinais clínicos de inflamação com sangramento à sondagem. Foi realizado monitoramento microbiológico antes e após os tratamentos. O laser utilizado foi o laser de diodo com comprimento de onda de 662 nm e potência de 0,5 W. Os resultados mostraram que a PDT foi efetiva na eliminação dos sinais clínicos da inflamação, comparado aos grupos controle. Este estudo demonstrou que a PDT foi eficaz na redução dos sinais clínicos da doença periodontal (DP) e na eliminação de *Porphyromonas gingivalis*.

Com o objetivo de estudar do ponto de vista radiográfico, o efeito da PDT na evolução da doença periodontal induzida em ratos, Almeida et al. (2006), induziram a DP em 120 ratos, através da instalação de ligaduras no primeiro molar inferior. Os animais foram divididos em quatro grupos que receberam os seguintes tratamentos: Grupo 1 - os ratos não receberam nenhum tratamento, apenas a presença da ligadura; Grupo 2 - receberam tratamento com droga fotossensibilizadora (azul de metileno); Grupo 3 - obtiveram tratamento com LLLT e o Grupo 4 - foram tratados com droga fotossensibilizadora e LLLT. Nos grupos 3 e 4, após dois dias da indução da DP, utilizou-se na porção mesial do primeiro molar o laser de AsGaAl (685nm) em modo contato, pontual por 120 segundos com fluência de energia de 4,5 J/cm². Após 5, 15 e 30 dias de indução, os animais foram sacrificados e as mandíbulas coletadas para análise radiográfica da perda óssea alveolar, na região mesial dos primeiros molares. As mandíbulas foram radiografadas, digitalizadas e analisadas por um software de análise de imagens. A análise radiográfica mostrou diferença estatisticamente significativa no grupo 4 quando comparado com o grupo 1, com menor perda óssea alveolar no grupo 4, nos períodos de cinco e 15 dias pós-operatórios. No período de 30 dias não ocorreu diferença significativa entre os grupos analisados. Os autores concluíram que a PDT promoveu uma menor perda óssea em ratos, principalmente nos períodos iniciais, podendo esta ser uma nova opção terapêutica complementar para tratamento da DP.

Em 2006, Shibli et al. com o objetivo de avaliar clínica e histomorfometricamente os resultados da PDT coadjuvante a regeneração óssea guiada no tratamento de periimplantites em cinco cães, utilizaram 40 implantes dentais com quatro diferentes superfícies: 10 de titânio puro, 10 de titânio tratadas com plasma, 10 tratadas com ácido e o restante jateadas com óxido. Foi realizada a indução de periimplantites através de ligaduras e após três meses os animais foram submetidos ao tratamento cirúrgico onde metade da boca foi tratada por debridamento mecânico e regeneração óssea guiada (lado controle), enquanto que a outra parte (lado teste) recebeu o mesmo tratamento dos controles tendo a associação da PDT. O laser utilizado foi de diodo GaAlAs, com comprimento de onda de 830nm, potência de 50mW e tempo de 80s ($4\text{J}/\text{cm}^2$), tendo o azul de toluidina como agente fotossensibilizador ($100\mu\text{g}/\text{ml}$). Os animais foram sacrificados 5 meses após os tratamentos. Os lados controle apresentaram uma exposição mais precoce das membranas em todas as superfícies, enquanto que os lados teste apresentaram uma maior altura óssea. A re-osseointegração variou entre 41,9% para a superfície de titânio pura e 31,19% para a superfície espriada com plasma nos sítios teste, não havendo diferenças entre as superfícies. Os autores concluíram que a PDT associada à regeneração óssea guiada permitiu uma melhor re-osseointegração nas áreas adjacentes aos defeitos periimplantares.

Com o objetivo de testar a capacidade do verde de malaquita combinado ao laser vermelho de baixa potência para inativar o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Prates et al. (2007) realizaram um trabalho expondo a cultura das referidas bactérias aos seguintes tratamentos: grupo1 recebeu aplicação do corante em uma concentração de 0,01% por 5 min; grupo 2, aplicação do corante por 5 min associado a aplicação do laser por 3 min, com uma energia de $5,4\text{ J}/\text{cm}^2$; e grupo 3, aplicação do corante seguido do laser por 5 min, totalizando uma energia de $9\text{ J}/\text{cm}^2$. O verde de malaquita tinha uma concentração de 0,01% e o laser 30 mW de potência. O espectro de absorção para os três grupos foi obtido juntamente com a contagem do número de bactérias. Os resultados mostraram que o

Actinobacillus actinomycetemcomitans foi inativado somente nos grupos 2 e 3, onde a PDT foi realizada.

Em 2007, Almeida et al. avaliaram radiográfica e histologicamente o efeito da PDT na progressão da DP induzida em ratos. Foi adaptada uma ligadura de algodão na margem gengival do primeiro molar inferior esquerdo de cento e vinte ratos. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=30): Grupo I: nenhum tipo de tratamento realizado, somente a presença da ligadura; Grupo II (MB): tratamento com aplicação tópica de azul de metileno (100 µg/mL) dois dias após adaptação da ligadura; Grupo III (LLT): tratamento com LLLT dois dias após adaptação da ligadura e Grupo IV (PDT): tratamento com aplicação tópica de azul de metileno (100 µg/mL) seguido da aplicação do LLLT dois dias após adaptação da ligadura. A superfície mesial dos dentes nos Grupos III e IV foram irradiados com o Laser de diodo de GaAlAs, com 685 nm (50 mW, 120 s, 4.5 J/cm²). Todos os grupos foram subdivididos em subgrupos (n=10) e sacrificados nos períodos de 5, 15 e 30 dias pós-operatórios. O estudo radiográfico foi realizado medindo a distância da crista óssea à união cimento-esmalte na face mesial dos molares. Através de um sistema de escores, vários parâmetros foram utilizados para avaliar o tecido conjuntivo, ligamento periodontal, superfície radicular e tecido ósseo histologicamente. Os resultados radiográficos indicaram uma preservação significativa de tecido ósseo nos animais tratados pela PDT nos períodos de 7 e 15 dias. Em 15 dias os resultados histológicos demonstraram uma diferença significativa na extensão da reação inflamatória no tecido gengival, com uma reação maior de infiltrado inflamatório crônico nos grupos tratados com o LLLT. Os autores concluíram que a PDT reduziu a destruição periodontal.

Oliveira et al. (2007) estudaram o efeito da PDT em pacientes com periodontites agressivas. Em cada paciente metade da cavidade bucal foi tratada pela raspagem com instrumentos manuais e a outra com a PDT, utilizando um laser com comprimento de onda de 690 nm associado ao fotossensibilizador fenotiazina. Os padrões analisados foram: o índice de placa, índice gengival,

sangramento a sondagem, profundidade de sondagem, recessão gengival e o nível de inserção clínica relativa. Essas medidas foram feitas no início e três meses após o início dos tratamentos. Os resultados mostraram que os padrões analisados diminuíram com a realização dos tratamentos, com uma significativa redução no índice gengival e no sangramento à sondagem. Os autores concluíram que a PDT e a raspagem convencional mostraram resultados clínicos similares no tratamento não cirúrgico da periodontite agressiva.

Com o objetivo de comparar os efeitos da PDT com a raspagem e aplainamento corono-radicular no tratamento da doença periodontal, Andersen et al. (2007), trataram trinta e três pacientes diagnosticados com doença periodontal moderada e avançada de acordo com os seguintes tratamentos: Grupo I, tratados através da PDT; Grupo II, tratados pela raspagem corono-radicular e Grupo III, associação da raspagem com a PDT. Os parâmetros avaliados foram: sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e perda de inserção clínica no período inicial, após três e seis semanas, e durante 12 meses pós tratamentos. Nenhuma diferença foi observada nos parâmetros analisados no período inicial, antes da realização de qualquer tratamento. O sangramento à sondagem diminuiu ao longo do tempo em todos os grupos. Com relação ao ganho de inserção clínica e a diminuição da profundidade de sondagem, pode-se observar que o grupo III apresentou maiores ganhos de inserção clínica e menores profundidades de sondagem de forma significativa comparado a raspagem de forma isolada (Grupo I). O estudo concluiu que a raspagem combinada com a PDT resultou em melhoras significantes nos parâmetros investigados comparados a raspagem isolada.

Almeida et al. (2008a), avaliaram histológica e histometricamente a influencia da PDT como tratamento coadjuvante da periodontite induzida em ratos diabéticos. Duzentos e quarenta ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: ND-Não diabéticos e D- Diabéticos. A doença periodontal foi induzida em ambos os grupos no primeiro molar mandibular. Depois de 7 dias a ligadura foi removida e todos os animais foram tratados com RAR e foram divididos de acordo com

os seguintes tratamentos: irrigação com solução salina, irrigação com TBO, irradiação com LLLT (660nm, 24J) e PDT (TBO mais LLLT). Dez animais de cada grupo experimental e subgrupo de tratamento foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias. Os resultados mostraram que a PDT foi benéfica como coadjuvante no tratamento da doença periodontal induzida por placa em animais sistemicamente modificados pelo diabetes.

Almeida et al. (2008b), estudaram a influencia da PDT na perda óssea em áreas de furca de ratos com DP induzida com ligadura no primeiro molar inferior. Os animais foram divididos em quatro grupos: Controle - nenhum tratamento; Azul de metileno - tratados topicamente com azul de metileno (MB); Laser de baixa intensidade (LLLT) – aplicação de laser; Grupo PDT (tratados com MB seguido por LLLT- 4,5J/cm²). Os animais foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias pós-operatórios. A área de perda óssea na região de furca foi histologicamente avaliada. Os resultados mostraram que a PDT pode ser uma alternativa efetiva no controle da perda óssea em áreas de furca com periodontite.

Qin et al. (2008), investigaram *in vivo* a fotossensibilização de bactérias periodontopatogênicas em ratos e comparou sua eficácia com a RAR. A periodontite foi induzida pela introdução de ligaduras subgingivalmente em molares maxilares de 16 ratos. Seis semanas mais tarde os sítios infectados foram tratados com 1mg/ml de azul de toluidina mais 12J/cm² de irradiação a laser vermelho ou RAR rotineiro. A eficácia terapêutica foi determinada pela avaliação da redução da flora bacteriana total e mudanças histológicas nos tecidos periodontais. Uma significativa redução da flora bacteriana total foi encontrada em ambos PDT e RAR. Os sinais de inflamação foram reduzidos sem injúrias aos tecidos do hospedeiro. Ambos, PDT e RAR, mostraram resultados similares. Os autores concluíram que a PDT mediada pelo azul de toluidina poderia tratar efetivamente a periodontite *in vivo* e tem alto potencial de aplicação clínica.

O efeito clínico e microbiológico da PDT como coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico foi avaliado por Christodoulides et al. (2008). Vinte e quatro pacientes com periodontite crônica foram tratados com RAR e aplicação de PDT (teste) ou RAR apenas (controle). Índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem, recessão gengival e nível de inserção clínica foram medidos no início e aos 3 e 6 meses pós terapias. A avaliação microbiológica para a identificação das bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodens* e *Capnocytophaga spp* foi realizada no início e aos 3 e 6 meses pós terapias. Os resultados mostraram que uma aplicação da PDT como coadjuvante a RAR falhou em melhorar a profundidade de sondagem e o nível de inserção clínica, mas resultou numa maior redução dos índices de sangramento gengival quando comparados apenas a RAR.

Com o objetivo de avaliar o potencial bactericida da PDT e seus efeitos clínicos no tratamento da periodontite, Polansky et al. (2009) realizaram um estudo clínico randomizado-controlado, no qual participaram 58 pacientes com periodontite crônica. Cada sujeito apresentava bolsas periodontais de 5mm ou mais de profundidade, sangramento à sondagem e presença de *Porphyromonas gingivalis*. Os participantes foram aleatoriamente classificados em grupo controle (tratados apenas por ultrassom subgengival) e grupo teste (tratados com ultrassom e PDT). Clinicamente se avaliou o índice gengival, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e nível de inserção clínica no início e aos 90 dias pós tratamentos. As avaliações de *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, foram feitas no início bem como aos 10, 42 e 90 dias pós o tratamentos. Os resultados mostraram que a diferença intergrupo não foi significativa em nenhum dos parâmetros analisados. Os autores concluíram que uma única aplicação de PDT não foi eficaz como tratamento coadjuvante ao tratamento periodontal com ultrassom.

Raghavendra et al. (2009), em uma revisão de literatura sobre os efeitos da PDT no tratamento periodontal observaram que estudos *in vitro* tem mostrado uma redução de 95% de microorganismos com a PDT e que esta é uma estratégia menos traumática e rápida, porém em estágio de desenvolvimento e teste. O desenvolvimento de novos fotossensibilizadores, sistemas de luz mais eficientes e mais estudos clínicos são necessários para estabelecer os parâmetros ótimos do tratamento com a PDT.

Com o propósito de avaliar o potencial da PDT em inativar bactérias e fatores do hospedeiro que contribuem para a DP, Braham et al. (2009) demonstraram que a PDT pode simultaneamente matar *Porphyromonas gingivalis* e inativar sua virulência associada às proteases. Ela também inativaria as citocinas destrutivas do hospedeiro como TNF- α e IL-1 β . Os resultados mostraram que um único tratamento com PDT *in vitro*, potencialmente inativou as proteases, e isso resultou na redução da viabilidade de *Porphyromonas gingivalis*. A dose e o tempo de exposição experimentados revelaram que a inibição das proteases ocorreu com baixas concentrações do fotossensibilizador e com menores tempos de exposição à luz. Os autores concluíram que a PDT pode inativar funcionalmente tanto o TNF- α como a IL-1 β .

Em 2009 e 2010 Fernandes et al. com o objetivo de avaliar radiográfica e histomorfometricamente a influência da PDT no tratamento da doença periodontal induzida em ratos tratados ou não com corticóide utilizaram cento e oitenta animais que foram divididos em 2 grupos. Os do Grupo controle sofreram aplicações subcutâneas de soro fisiológico e os do Grupo experimental, aplicações subcutâneas de corticóide. A doença periodontal foi induzida por ligadura e após 7 dias foi removida e os animais divididos em subgrupos que receberam os seguintes tratamentos: I - RAR e irrigação com soro fisiológico; II - RAR e irrigação com TBO; III - tratamento similar ao do grupo II e, após 1 minuto, aplicação do laser de AsGaAl (660 nm, 4J), realizando a PDT. O principal resultado deste estudo demonstrou que os animais do grupo

experimental, tratados com a PDT, tiveram uma menor perda óssea comparados aos animais do Grupo controle, tratados pela RAR, aos 7 e 15 dias. Neste estudo a PDT foi efetiva como tratamento coadjuvante à RAR na redução da perda óssea em periodontite experimental induzida, em ratos normais e nos tratados com corticóide.

Sigusch et al. (2010) estudaram clínica e microbiologicamente os efeitos da PDT contra o *Fusobacterium nucleatum* em pacientes com periodontite crônica. A PDT foi realizada após a RAR em vinte e quatro pacientes que apresentaram o *Fusobacterium nucleatum* através da reação de polimerase reversa. Após a RAR os pacientes foram distribuídos aleatoriamente em um dos grupos: PDT ou controle. Os parâmetros clínicos analisados foram o índice de placa, cor da gengiva, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem, recessão gengival e nível de inserção clínica determinados no exame inicial, 1, 4, e 12 semanas pós tratamentos. Os resultados demonstraram que os pacientes que receberam o tratamento com PDT apresentaram reduções significativas dos parâmetros clínicos. Nas 4 e 12 semanas pós PDT, a média de profundidade de sondagem e inserção clínica apresentaram diferenças significativas em relação aos valores iniciais e aos do grupo controle. No grupo da PDT, 12 semanas após o tratamento, a concentração de *Fusobacterium nucleatum* foi significativamente reduzida em relação ao seu nível inicial. Os autores concluíram que a PDT associada à RAR foi efetiva na redução da inflamação periodontal, bem como no tratamento da infecção com *Fusobacterium nucleatum*.

Em uma revisão de literatura Azarpazhooh et al. (2010) avaliaram a eficácia da PDT no tratamento da periodontite em adultos comparando três tipos de tratamentos: RAR somente, PDT somente e PDT associada à RAR. Dados sobre alterações no nível de inserção clínica, profundidade de sondagem, recessão gengival e acúmulo de placa bacteriana foram obtidos e analisados através de uma meta-análise. Os resultados demonstraram que a PDT associada ou não à RAR comparada ao tratamento isolado de RAR não demonstrou vantagens significantes tanto estatística quanto

clínicamente. A terapia combinada de PDT à RAR indicou uma provável eficácia no ganho de inserção clínica e na redução da profundidade de sondagem. A conclusão deste trabalho foi que a PDT associada ou não à RAR não foi superior à RAR somente e portanto seu uso rotineiro para o tratamento clínico da periodontite não seria indicada.

Gualberto Júnior (2010) avaliou histológica, histométrica e imunoistoquimicamente os efeitos do LLLT e da PDT no tratamento periodontal de ratas ovariectomizadas com ou sem reposição hormonal em duzentas e setenta ratas. Estas foram divididas em 3 grupos de 90 animais: (A) SHAM; (B) Ovariectomizadas; (C) Ovariectomizadas tratadas com reposição hormonal. Nos primeiros molares inferiores esquerdos de todos os animais, a doença periodontal foi induzida por ligadura. Após 7 dias, esta foi removida e procedeu-se a RAR. A seguir foram devidos em subgrupos de acordo com os seguintes tratamentos locais: I (n = 90) - Irrigação com 1 ml de soro fisiológico (RAR); II (n = 90) - Irrigação com 1 ml de soro fisiológico associado a aplicação de LLLT e III (n = 90) - Irrigação com 1 ml de azul de toluidina-O e, após 1 minuto, aplicação de LLLT realizando desta forma a PDT. Nos animais do grupo A a PO foi significativamente maior no tratamento com RAR comparado à PDT nos períodos de 7 e 15 dias respectivamente. Os espécimes tratados com LLLT aos 30 dias demonstraram PO significativamente menor no grupo A comparado ao grupo B. No tratamento com PDT, observou-se PO significativamente menor no grupo A comparado ao grupo B aos 15 dias. No entanto, no grupo C aos 30 dias a PDT demonstrou PO em nível próximo ao observado nos espécimes do grupo A, no mesmo período. Na análise entre períodos, no mesmo grupo e tratamento, observou-se no grupo A, que o tratamento I apresentou PO significativamente maior aos 7 dias; que o tratamento II demonstrou maior PO nos períodos de 7 e 15 dias. Já no grupo C o tratamento III também apresentou PO maior aos 7 dias. Pode-se observar que a PO no grupo B foi significativamente menor no período de 30 dias comparado aos 7 e 15 dias. A imunoreatividade para RANKL e TRAP foi maior aos 7 dias e menor aos 30 dias. Para a OPG a imunoreatividade alcançou seu pico aos 15 dias decrescendo aos 30 dias. A análise imunoistoquímica qualitativa entre

os grupos revelou uma tendência nos animais tratados com a PDT em apresentar uma menor imunorreatividade a RANKL e TRAP no 7º dia e considerável imunorreatividade a OPG no 15º dia pós-tratamentos. Os autores concluíram que o LLLT e a PDT foram efetivos como coadjuvantes à RAR no tratamento periodontal em periodontite experimental induzida em ratas ovariectomizadas, tratadas ou não com reposição hormonal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

AH, M.K. et al. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. **J Clin Periodontol.**, v. 21, n. 2, p. 91-97, 1994.

ALMEIDA, J.M. et al. Estudo radiográfico da perda óssea alveolar em ratos tratados pela terapia fotodinâmica. **Revista de Periodontia.**, v. 16, n. 4, p. 96-102, 2006.

ALMEIDA, J.M. et al. Treatment of Experimental Periodontal Disease by Photodynamic Therapy in Rats With Diabetes. **J Periodontol.**, v. 79, p.2156-2165, 2008a.

ALMEIDA, J.M. et al. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontol.**, v. 78, n. 3, p. 566-75, 2007.

ALMEIDA, J.M et al. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. **J Periodontol**, v. 79, p.1081-1088, 2008b.

AL-WATBAN, F.A.; ZHANG, X.Y. Comparison of wound healing process using Argon and Krypton lasers. **J Clin Laser Med Surg.**, v. 15, n. 5, p. 209-151, 1997.

ANDERSEN, R. et al. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. **Clin Dent.**; v. 18, n. 2, p .34-8, 2007.

AZARPAZHOOH, A. et al. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **J Periodontol**, v. 81, n. 1, p. 4-14, 2010.

AZEVEDO, L.H. et al. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. **Lasers Med Sci.**, v. 21, n. 2, p. 86-89, 2006.

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

BARTECCHI, C. E.; MACKENZIE, T. D.; SCHRIER, R. W. The human costs of tobacco use. **N Engl J Med.**, v. 330, n. 13, p. 907-912, 1994.

BASFORD, J.R. Low energy laser treatment of pain and wounds: hype, hope, or hokum? **Mayo Clin Proc.**, v. 61, n. 8, p. 671-5, 1986.

BAUER, T.W. et al. Preliminary report of photodynamic therapy for intraperitoneal sarcomatosis. **Ann. Surg. Onc.**, v. 8, p. 254-259, 2001.

BENSTEAD, K.; MOORE, J.V. Quantitative histological changes in murine tail skin following photodynamic therapy. **Br J Cancer.**, v. 59, n. 4, p. 503-9, 1989.

BERGSTRÖM, J.; ELIASSON, S.; DOCK, J. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. **J Periodontol.**, v. 71, n. 8, p. 1338-1347, 2000.

BERGSTRÖM, J. Oral hygiene compliance and gingivitis expression in cigarette smokers. **Scand J Dent Res.**, v. 98, n. 6, p. 497-503, 1990.

BERGSTRÖM, J.; PREBER, H. The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. **J Periodontal Res.**, v. 21, n. 6, p. 668-676, 1986.

BERGSTRÖM, J., PREBER, H. Tobacco use as a risk factor. **J Periodontol.**, v. 65, n. 5, p. 545-550, 1994.

BERGSTRÖM, J. Tobacco smoking and supragingival dental calculus. **J Clin Periodontol.**, v. 26, n. 8, p. 541-547, 1999.

BOSCO, A. F. et al. A histologic and histometric assessment of the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. **J Periodontol.**, v. 78, n. 3, p. 527-532, 2007.

BRAHAM, P. et al. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. **J Periodontol.**, v.80, n.11, p.1790 – 1798, 2009.

BREIVIK, T. et al. Nicotinic acetylcholine receptor activation mediates nicotine-induced enhancement of experimental periodontitis. **J Periodontal Res.**, v. 44, n. 3, p. 297-304, 2009.

BUDUNELI, N.; BUDUNELI, E.; KÜTÜKÇÜLER, N. Interleukin-17, RANKL, and osteoprotegerin levels in gingival crevicular fluid from smoking and non-smoking patients with chronic periodontitis during initial periodontal treatment. **J Periodontol.**, v. 80, n. 8, p. 1274-1280, 2009.

BYRNES, K.R. et al. Photobiostimulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 22, n. 4, p. 281-290, 2004.

CATTANEO, V.; et al. Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. **J Periodontol.**, v. 71, n. 3, p. 425-532, 2000.

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

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

CONLAN, M.J.; RAPLEY, J.W.; COBB, C.M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation: a review. **J. Clin. Periodontol.**, Munksgaard, v. 23, n. 5, p. 492-496, 1996.

DÖRTBUDAK, O. et al. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. **Clin Oral Implants Res.**, v. 12, p. 104-8, 2001.

DOUGHERTY, T.J. An update on photodynamic therapy applications. **J. Clin Laser Med and Surg.**, v. 20, n. 1, p .3-7, 2002.

FERNANDES, L. A. et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. **J Clin Periodontol.**, v. 36, n. 3, p. 219-228, 2009.

FERNANDES, L. A. et al. Radiographic assessment of photodynamic therapy as an adjunctive treatment on induced periodontitis in immunosuppressed rats. **J. Appl. Oral Sci.**,v. 18, n. 3, p. , 237-243, 2010.

FIJAN, S.; HONINGSMANN, H.; ORTEL, B. Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolevulinic acid and desferrioxamine. **Br J Dermatol.**, v. 133, p. 282-8, 1995.

GOULTSCHIN, J. et al. Association of smoking with periodontal treatment needs. **J Periodontol.**, v. 61, n. 6, p. 364-367, 1990.

GUALBERTO JÚNIOR, E.C. **Efeitos do laser e da terapia fotodinâmica no tratamento periodontal de ratas ovariectomizadas, com ou sem reposição hormonal: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico.** 2010. 161f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

HABER, J.; KENT, R. L. Cigarette smoking in a periodontal practice. **J Periodontol.**, v. 63, n. 2, p. 100-106, 1992.

HABER, J. et al. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. **J Periodontol.**, v. 64, n.1, p. 16-23, 1993.

HAFFAJEE, A.D. et al. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. **J Clin Periodontol.** , v. 24, n. 10, p. 767-776, 1997.

HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². **Photomed Laser Surg.**, v. 25, n. 2, p.78-84, 2007.

HEDEN, G.; WENNSTRÖM, J.; LINDHE, J. Periodontal tissue alterations following Emdogain treatment of periodontal sites with angular bone defects. A series of case reports. **J Clin Periodontol.**, v. 26, n. 12, p. 855-860, 1999.

JANSSON, L.; LAVSTEDT, S. Influence of smoking on marginal bone loss and tooth loss--a prospective study over 20 years. **J Clin Periodontol.**, v. 29, n. 8, p. 750-756, 2002.

JOHNSON, G. K.; ORGAN, C. C. Prostaglandin E2 and interleukin-1 concentrations in nicotine-exposed oral keratinocyte cultures. **J Periodontal Res.**, v. 32, n. 5, p. 447-454, 1997.

KALDAHL, W.B. et al. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. **J Periodontol.**, v. 67, n. 7, p. 675-681, 1996.

KENNEDY, J.C.; POTTIER, R.H.; PROSS, D.C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. **J Photochem Photobiol B.**, v. 6, n. 1-2, p. 143-148, 1990.

LAXMAN, V. K; ANNAJI, S. Tobacco use and its effects on the periodontium and periodontal therapy. **J Contemp Dent Pract.**, v. 9, n. 7, p. 97-107, 2008.

LIMA, F.R. et al. Smoking enhances bone loss in anterior teeth in a Brazilian population: a retrospective cross-sectional study. **Braz Oral Res.**, v. 22, n. 4, p. 328-333, 2008.

LIU, X. D.; et al. Cigarette smoke inhibits osteogenic differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in monolayer and three-dimensional collagen gel culture. **J Lab Clin Med.**, v. 137, n. 3, p. 208-219, 2001.

LOESCH, D. Z. Epidermal ridge patterns in medicine. **Med J Aust.**, v. 161, n. 11, p. 709-711, 1994.

MACARIMI, V.C. **Influência do laser em baixa intensidade (660 nm) no processo de reparo de feridas cutâneas provocadas em ratos tratados com nicotina: estudo histológico.** 2004. 120f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2004.

MACFARLANE, G.D. et al. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking. **J Periodontol.**, v. 63, n. 11, p. 908-913, 1992.

MACROBERT, A.J.; BOWN, S.G.; PHILLIPS, D. What are the ideal photoproperties for a sensitizer? **Ciba Found Symp.**, v. 146, p. 4-12, 1989.

MARIGGIÒ, M. A.; et al. Nicotine effects on polymorphonuclear cell apoptosis and lipopolysaccharide-induced monocyte functions. A possible role in periodontal disease? **J Periodontal Res.**, v. 36, n. 1, p. 32-39, 2001.

MCLAUGHLIN, W.S. et al. The immediate effects of smoking on gingival fluid flow. **J Clin Periodontol.**, v. 20, n. 6, p. 448-451, 1993.

MENDEZ, T.M. et al. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 22, n. 1, p. 19-25, 2004.

MESTER, S.; JASZSAGI-NAGY, E. The effect of laser radiation on wound healing and collagen biosynthesis. **Stud. Biophys.**, v. 35, p. 227-230, 1973.

MIGLIORATI, C. et al. Low-energy laser therapy in oral mucositis. **J Oral Laser Applications.**, v. 1, p. 97-101, 2001.

MILLER, P.D.JR. Root coverage with the free gingival graft. Factors associated with incomplete coverage. **J Periodontol.**, v. 58, n. 10, p. 674-681,1987 .

MORENO, A. Y. et al. A critical evaluation of a nicotine vaccine within a self-administration behavioral model. **Mol Pharm.**, v. 7, n. 2, p. 431-441, 2010.

MULLALLY, B. H.; LINDEN, G. J. Molar furcation involvement associated with cigarette smoking in periodontal referrals. **J Clin Periodontol.**, v. 23, n. 7, p. 658-661, 1996.

NAKAYAMA, Y. et al. Nicotine suppresses bone sialoprotein gene expression. **J Periodontal Res.**, v. 44, n. 5, p. 657-663, 2009.

NATTO, S.; BALJOON, M.; BERGSTRÖM, J. Tobacco smoking and periodontal bone height in a Saudi Arabian population. **J Clin Periodontol.**, v. 32, n. 9, p. 1000-1006, 2005.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **J Photochem Photobiol B.**, v. 39, n. 1, p. 1-18, 1997.

OLIVEIRA, R.R. et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. **J Periodontol.**, v. 78, n. 6, p. 965-973, 2007.

PERSSON, L. et al. Tobacco smoking and gingival neutrophil activity in young adults. **J Clin Periodontol.**, v. 26, n. 1, p. 9-13, 1999.

PESSOA, E.S. et al. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. **Photomed. Laser Surg.**, v. 22, n. 3, p. 199-204, 2004.

POLANSKY, R. et al. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. **J Clin Periodontol.**, v. 36, p. 575-580, 2009.

PRATES, R.A. et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J Photochem Photobiol B.**, v. 86, n. 1, p. 70-76, 2007.

PREBER, H.; BERGSTRÖM, J. Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. **Scand J Dent Res.**, v. 94, n. 2, p. 102-108, 1986 .

PREBER, H.; BERGSTRÖM, J. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy. **J Clin Periodontol.**, v. 17, n. 5, p. 324-328, 1990.

PREBER, H.; BERGSTRÖM, J.; LINDER, L. E. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. **J Clin Periodontol.**, v. 19, n. 9, p. 667-671, 1992.

PUGLIESE, L.S. et al. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 17, n. 4, p. 307-313, 2003.

QUINN, S. M. et al. The influence of smoking and race on adult periodontitis and serum IgG2 levels. **J Periodontol.**, v. 69, n. 2, p. 171-177, 1998.

QIN, Y.L. et al. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. **J Periodont Res.**, v. 43, p.162-167, 2008.

RAGHAVENDRA, M.; KOREGOL, A.; BHOLA, S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. **Aust Dent J.**, v. 54, n. 1, p. 102-109, 2009.

RAMSEIER, C. A.; FUNDAK, A. Tobacco use cessation provided by dental hygienists. **Int J Dent Hyg.**, v. 7, n. 1. p. 39-48, 2009.

REDDY, G.K. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. **Lasers Surg. Med.**, v. 33, n. 5, p. 344-351, 2003.

RENVERT, S.; DAHLÉN, G.; WIKSTRÖM, M. The clinical and microbiological effects of non-surgical periodontal therapy in smokers and non-smokers. **J Clin Periodontol.**, v. 25, n. 2. p. 153-157, 1998.

REUS, W. F. et al. Acute effects of tobacco smoking on blood flow in the cutaneous micro-circulation. **Br J Plast Surg.**, v. 37, n. 2, p. 213-215, 1984.

RIBEIRO, M.S. **Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos: Efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele.** (Tese Doutorado), São Paulo: Instituto de Pesquisa Nuclear, IPEN/USP; 2000.

RIVERA, H. F. Smoking and periodontal disease. A review of the literature. **J Periodontol.**, v. 57, n. 10, p. 617-624, 1986.

ROCHA, W.C.; LORANDI, C.S.; MENDONÇA, E.F. Uso do azul de toluidina como método auxiliar na detecção de displasias epiteliais e carcinomas da mucosa bucal. **Rev. Odonto Ciência**, v. 21, p. 27-48, 1996.

RUBENSTEIN, E.B. et al. Clinical Practice Guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer Supplement.**, v. 100, n. 9, p. 2026-2046, 2004.

RYDER, M. I. et al. Effects of tobacco smoke on the secretion of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta from peripheral blood mononuclear cells. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 17, n. 6, p. 331-336, 2002.

SALUM, A.W; NETO, J.B.C; SALLUM; E.J. Tabagismo e a doença periodontal. **Revista de Periodontia**, v. 17, n. 2, p. 45-53, 2007.

SALVI, G. E. et al. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. **Periodontol** 2000., v. 6, n. 14, p. 173-201, 1997.

SATOH, H. et al. Smoking and smoking-related lung cancer in female patients. **Anticancer Res.**, v. 19, n. 6, p. 5627-5630, 1999.

SHEIHAM, A. Periodontal disease and oral cleanliness in tobacco smokers. **J Periodontol.**, v. 42, n. 5, p. 259-263, 1971.

SHIBLI, J.A. et al. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. **Clin Oral Implants Res.** v. 17, n. 3, p. 273-281, 2006.

SIGUSCH, B.W. et al. Full-Mouth Antimicrobial Photodynamic Therapy in Fusobacterium nucleatum– Infected Periodontitis Patients. **J Periodontol.**, v. 81, n. 7, p. 975-981, 2010.

SIGUSCH, B.W. et al. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. **J Periodontol.**, v. 76, n. 7, p.1100-1105, 2005.

SKRIPCHENKO, A.; ROBINETTE, D.; WAGNER, S.J. Comparison of methylene blue and methylene violet for photoinactivation of intracellular and extracellular virus in red cell suspensions. **Photochem. Photobiol.**, v. 65, n. 3, p. 451-455, 1997.

STAVROPOULOS, A. et al. Smoking affects the outcome of guided tissue regeneration with bioresorbable membranes: a retrospective analysis of intrabony defects. **J Clin Periodontol.**, v. 31, n. 11, p. 945-950, 2004.

STOLTENBERG, J. L., et al. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. **J Periodontol.**, v. 64, n. 12, p. 1225-1230, 1993.

TIPTON, D.A.; DABBOUS, M.K. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. **J Periodontol.**, v. 66, n. 12, p. 1056-1064, 1995.

TOMASELLI, F. et al. Acute effects of combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in lung câncer - a clinical pilot study. **Lasers Surg. Med.**, v. 28, p. 399-403, 2001.

TROMBELLI, L.; SCABBIA, A. Healing response of gingival recession defects following guided tissue regeneration procedures in smokers and non-smokers. **J Clin Periodontol.**, v. 24, n. 8, p. 529-533, 1997.

VAN WINKELHOFF, A.J.; LOOS, B.G.; VAN DER REIJDEN, W.A.; VAN DER VELDEN, U. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. **J Clin Periodontol.**, v. 29, n. 11, p. 1023-1028, 2002.

ZAMBON, J.J. et al. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. **J Periodontol.**, v. 67, n. 10, p. 1050-1054, 1996.

ZHANG, W.; SONG, F.; WINDSOR, L.J. Cigarette smoke condensate affects the collagen-degrading ability of human gingival fibroblasts. **J Periodontal Res.**, v. 44, n. 6, p. 704-713, 2009.

WENDELL, K. J.; STEIN, S. H. Regulation of cytokine production in human gingival fibroblasts following treatment with nicotine and lipopolysaccharide. **J Periodontol.**, v. 72, n. 8, p. 1038-1044, 2001.

WILSON, B.D. et al. Photodynamic therapy for the treatment of basal-cell carcinoma. **Arch Dermatol.**, v. 128, n. 12, p. 1597-1601, 1992.

WILSON, M.; DOBSON, J.; SARKAR, S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 8, n. 3, p. 182-187, 1993.

Anexo B

Comitê de Ética em Experimentação Animal.

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA EM RATOS TRATADOS OU NÃO COM NICOTINA: ESTUDO HISTOLÓGICO, HISTOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO" sob responsabilidade do Prof Dr VALDIR GOUVEIA GARCIA e colaboração de LEANDRO ARAÚJO FERNANDES está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 29 de fevereiro de 2008, de acordo com o protocolo no. 2008- 001372.

Araçatuba, 05 de março de 2008.


Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA
Presidente da CEEA - FOA/UNESP

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-3200

Anexo C

Normas de publicação da Revista *Journal of Clinical Periodontology*

1. GENERAL

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

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

2. ETHICAL GUIDELINES

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

2.1. Authorship and Acknowledgements

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

Journal of Clinical Periodontology adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship

criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

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

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

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

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version VI, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

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

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if

applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Clinical Trials

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

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

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

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

2.5 Conflict of Interest and Sources of Funding

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

2.6 Appeal of Decision

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

2.7 Permissions

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

2.8 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Blackwell Publishing if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the exclusive licence to publish their paper to Blackwell Publishing. Assignment of the exclusive licence is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless licence has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed). A completed Copyright Transfer Agreement (CTA) must be sent to the

Editorial Office before any manuscript can be published. Authors must send the completed CTA upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the CTA at submission.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Journal Admin, Rosie Ledger, at cpeedoffice@wiley.com.

3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>

- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.
- If you are registering as a new user.
 - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.' - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will automatically send you your user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Corresponding Author Center'.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Corresponding Author Center', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
 - Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
 - Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
 - You are required to upload your files.
- Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Upload your manuscript main document complete with title page, statement concerning source(s) of funding and conflict(s) of interest, abstract, clinical relevance section, references, tables and figure legends as "main document". Upload figures as 'figures'. For clinical trials a Consort Checklist will be required, and it should be uploaded as "supplementary file for review". If any unpublished papers are referenced in the reference list, a digital version of the referenced paper should also be uploaded as "supplementary file for review".
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
 - Review your submission (in HTML and PDF format). Notice that all documents uploaded as supplementary files for review will not be viewable in the HTML and PDF format. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, clinical reference, main text, references, acknowledgement, statement of source of funding and any potential conflict of interest, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference any figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines

below. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

3.4. Blinded Review

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

3.5. Suggest a Reviewer

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

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

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

3.7. E-mail Confirmation of Submission

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

3.8. Manuscript Status

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

3.9. Submission of Revised Manuscripts

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

3.10 Resubmissions

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

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

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

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

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

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

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. It is preferred that manuscript is professionally edited.

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

5.2. Structure

All articles submitted to *Journal of Clinical Periodontology* should include Title Page, Abstract, and References. In addition, *Journal of Clinical Periodontology* requires that all articles include a section on Clinical Relevance and disclose Source of Funding and Conflict of Interests. Figures, Figure Legends and Tables should be included where appropriate. All manuscripts should emphasize clarity and brevity. Authors should pay special attention to the presentation of their

findings so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and be clearly explained where its use is unavoidable.

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

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

Abstract: is limited to 200 words in length and should not contain abbreviations or references. The abstract should be organized according to the content of the paper. For Original Research Articles the abstract should be organized with aim, materials and methods, results and conclusions. For clinical trials, it is encouraged that the abstract finish with the clinical trial registration number on a free public database such as clinicaltrials.gov.

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

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

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

5.3. Original Research Articles

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

Main Text of Original Research Articles should be organized with Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Please see Sample Manuscript.

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation. **Material and Methods:** must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves.

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

(b) **Statistical Analysis:** As papers frequently provide insufficient detail as to the performed statistical analyses, please describe with adequate detail. For clinical trials intention to treat

analyses are encouraged (the reasons for choosing other types of analysis should be highlighted in the submission letter and clarified in the manuscript).

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

(d) Experimental Subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version VI, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

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

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

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

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

5.4. Clinical Innovation Reports

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

Main Text of Clinical Innovation Reports should be organized with Introduction, Clinical Innovation Report, Discussion and Conclusion.

5.5. Case Reports

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

Main Text of Case Reports should be organized with Introduction, Case report, Discussion and Conclusion.

5.6. Reviews

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

Main Text of Reviews should be organized with Introduction, Review of Current Literature, Discussion and Conclusion.

5.7. References

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

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

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

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

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

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

5.8. Tables, Figures and Figure Legends

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

Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction

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

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

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by thin spaces (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS

PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

5.9. Supporting Information

Supporting Information, such as data sets or additional figures or tables that will not be published in the print edition of the Journal but which will be viewable in the online edition can be submitted. The Editor-in-Chief should be contacted at the time of submission of your paper. Please see www.blackwellpublishing.com/bauthor/suppmat.asp for further information on the submission of Supporting Information.

6. AFTER ACCEPTANCE

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

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes

made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

6.2 Early View Publication Prior to Print

Journal of Clinical Periodontology is covered by Wiley-Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Online Production Tracking

Online production tracking is available for your article through Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

6.4 Author Material Archive Policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all electronic material submitted one month after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

6.5 Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: [Offprint.Cosprinters](#). If you have queries about offprints please email offprint@cosprinters.com

6.6 Author Services

For more substantial information on the services provided for authors, please see Wiley-Blackwell's Author Services.

6.7 Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate