



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA**

ANA LUZIA ARAÚJO BATISTA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
COM CURCUMINA NA REABSORÇÃO ÓSSEA PERIODONTAL EM RATOS
DIABÉTICOS POR MEIO DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA**

CAMPINA GRANDE – PB

2020

ANA LUZIA ARAÚJO BATISTA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
COM CURCUMINA NA REABSORÇÃO ÓSSEA PERIODONTAL EM RATOS
DIABÉTICOS POR MEIO DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão.

CAMPINA GRANDE – PB

2020

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

B333a Batista, Ana Luzia Araújo.
Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana com curcumina na reabsorção óssea periodontal em ratos diabéticos por meio da microtomografia computadorizada [manuscrito] / Ana Luzia Araújo Batista. - 2020.
117 p. : il. colorido.
Digitado.
Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.
"Orientação : Prof. Dr. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, Departamento de Odontologia - CCBS."
1. Fotoquimioterapia. 2. Doenças periodontais. 3. Periodontia. I. Título

21. ed. CDD 617.632

ANA LUZIA ARAÚJO BATISTA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM
CURCUMINA NA REABSORÇÃO ÓSSEA PERIODONTAL EM RATOS DIABÉTICOS
POR MEIO DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA**

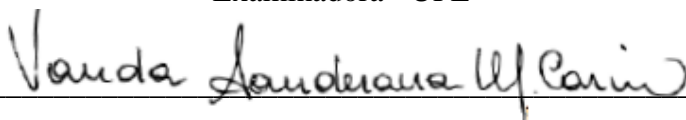
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de concentração em Clínica Odontológica.

Aprovada em 10/12/2020

BANCA EXAMINADORA



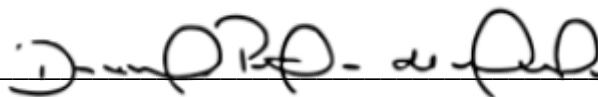
Prof. Dra. Marleny Elizabeth Márquez de Martínez Gerbi
Examinadora - UPE



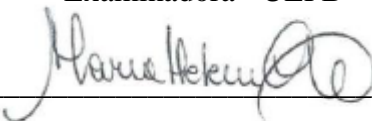
Prof. Dra. Vanda Sanderana Macedo Carneiro
Examinadora - UPE



Prof. Dra. Renata de Souza Coelho
Examinadora - UEPB



Prof. Dra. Daniela Pita de Melo
Examinadora - UEPB



Prof. Dr.ª. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão
Orientadora - UEPB

**Mas, graças a Deus, que nos dá a vitória por meio do nosso Senhor Jesus Cristo
(I Coríntios 15: 57)**

DEDICATÓRIA

A Deus, definição da perfeição e do amor; Aquele que não se ausenta, que não abandona; o Pai que protege, cuida e sonda; o criador e detentor da sabedoria libertadora.

Aos meus pais, Maria Madalena Araújo Batista e Manoel Batista de Moraes (eternamente presente): gratidão pelo esforço em me permitir a busca por conhecimento e proporcionar uma educação doméstica na melhor escola da vida (família).

Aos meus pais de coração, Maria Anália Araújo e José Marlito do Amaral: pelo amor sem limites, pela dedicação com zelo, por revelar minha essência e minhas verdades.

Aos meus avós paternos Maria Inácia Medeiros e José Francisco de Moraes e meus avós maternos Maria do Carmo Araújo e José Dario Dias: que foram e se fazem presente de forma especial e no céu intercedem a Deus por nós.

A meu esposo, George Luís Dias dos Santos: que se uniu a mim para cumprir uma missão e realizar o nosso projeto familiar.

Aos meus filhos, Luís Miguel e Ana Luz: o maior estímulo e propósito de luta.

Aos meus irmãos, Ana Cláudia, Ana Grazielle, Zé Neto, Ana Cristina e Ana Virgínia: por compartilharmos da vida, dos mesmos ensinamentos e das grandes lições, estendendo aos meus sobrinhos Emanuel, Ester, Mariana, Laura, Manuela, Maria Júlia, Maria Luíza, Manoel Neto para que sigam nosso exemplo de união, amor e partilha.

Ao meu sogro Martinho Antônio dos Santos e minha sogra Maria Elisabeth Dias dos Santos: por me assumirem como filha, com todo cuidado e amor.

Aos meus cunhados (as) José Antônio, Leonardo, Simone, Filipe, Pedro, André, Paulo, Jamylle e Ana Caroline por aceitar ser família e aumentar essa rede de amor, estendendo aos sobrinhos (as) Maria Júlia, Pedro e Cecília por mostrar que o amor, quanto mais se divide, mais se multiplica.

Aos meus amigos de todos os tempos: da escola, da igreja, da infância, da universidade, do trabalho e que cada dia eu conquisto e cultivo.

**Acima de tudo, porém, revistam-se de amor que é o elo perfeito
(Colossenses 3:14)**

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, por ter aceitado essa orientação, por impulsionar a busca do desconhecido e pelas oportunidades de aprendizado.

Ao meu grupo de pesquisa composto por Alencar Neto, Alieny Duarte, Maria das Graças (Gal), Thamyres e Thiago Lacerda pela parceria durante esse tempo e por tudo que construímos juntos.

Aos colaboradores desse projeto, pelas inúmeras ajudas recebidas, pela partilha de conhecimento, pelo progresso da ciência, pela continuidade dos ensinamentos, por todo ato pequeno que se tornou grande dentro dessa conquista.

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) que me recebeu como aluna de graduação e me permitiu crescer com ela, seguindo os passos da evolução do curso e do Programa de Pós-graduação. Aos meus companheiros de trabalho, Prof. Cassiano Nonaka, Profa. Pollianna Diniz e Denize Núbia pela torcida e compressão nos momentos de ausência. Aos demais técnicos do Departamento de Odontologia, por cada dia que vivemos uma harmonia e em comunidade, lutando pelo bem comum e pelo crescimento do grupo.

Aos meus companheiros da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), em especial Clauthenes, Thiago, Maria da Guia e Valdilene pelo auxílio nos momentos que mais necessitei, pelo amparo no desespero e por saber que poderia contar com vocês.

À Faculdade de Ciências Sociais Aplicada (FACISA), em especial à Médica Veterinária do Biotério Profa. Tharcia Kiara pelo braço acolhedor, mão de auxílio e sorriso renovador e a técnica Tatiana Marques, o maior e melhor exemplo de técnica que tive que não mede esforços, que derruba as barreiras das dificuldades e tem a capacidade de construir um lindo laço de compromisso com o trabalho e com o próximo.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e todos os professores por todo conhecimento transmitido, que com seus esforços mantêm firme um sonho de gigantes, em meio a tantas dificuldades. Que esse amor pela ciência tenha sempre como foco principal a meta social e não a exaltação pessoal. Em especial, a Gustavo Apolinário, aluno no PNPd, que foi fundamental na transmissão da experiência laboratorial. E aos meus colegas de turma, em especial Bruna, Carol, Emanuene e Ingrid pelo contato mais intenso e pela torcida mútua.

**Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o Senhor, e não para os homens, sabendo que receberão do Senhor a recompensa da herança. É a Cristo, o Senhor, que vocês estão servindo.
(Colossenses 3: 23,24)**

RESUMO

A periodontite é caracterizada por perda óssea e apresenta relação bidirecional com a diabetes. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) com curcumina na redução da reabsorção óssea periodontal em ratos diabéticos por meio da microtomografia computadorizada (micro CT). Foi realizado um estudo experimental *in vivo*, utilizando 80 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com idade entre 60 e 90 dias e massa entre 250-350 gramas. Os animais foram divididos em dois grupos: 40 normoglicêmicos (NG) e 40 diabéticos (DM), sendo subdivididos em 4 grupos a depender do tratamento: GI: terapia periodontal não-cirúrgica (GI-TPNC); GII: TPNC + gel de curcumina 2% (5min sem iluminação direta) (GII-CURC); GIII: TPNC + LED (KaVo poly 600, 450-460nm, 400—600w/cm², 3,3W, 60 segundos) (GIII-LED); GIV: TPNC + TFDa (GIV-TFD). A diabetes foi induzida quimicamente através da injeção intraperitoneal de uma única dose de 50mg/kg de estreptozotocina. Os animais que apresentaram em todas as etapas alteração no índice glicêmico (glicemia \geq 250mg/dL), foram selecionados para o grupo com diabetes. A periodontite foi induzida com ligadura ao redor do primeiro molar inferior por 7 dias. Ao final do tempo de intervenção, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados aos 7 e 14 dias e as hemi-mandíbulas removidas para análise da perda óssea alveolar por micro CT, através da análise quantitativa por meio de medidas lineares e volumétricas com uso do software *DataViewer®* (*SkyScan®*). Para a avaliação intragrupo foi utilizado o ANOVA *two way* e o teste t para amostras independentes. Os resultados das medidas de perda óssea linear nos animais NG e DM evidenciaram que não houve diferença entre os tratamentos. Na análise intragrupo houve diferença significativa com o GII-CURC nos NG com relação a perda óssea na região de furca aos 14 dias (1.357,68 para 795,74) e para os DM na face vestibular com aumento da perda óssea (788,70 para 1.487,22). Com relação à análise volumétrica dos NG, os menores valores relacionados à remodelação óssea foram registrados no GIV-TFD e na análise intragrupo, as diferenças significativas foram para GII-CURC com menor volume tecidual aos 14 dias (1,69 para 0,87), apesar de mostrar aumento no número trabecular (1,68 para 4,16) e diminuição na separação do mesmo (0,59 para 0,25). Nos DM, não houve diferença entre os tratamentos com 7 e 14 dias. Apresentaram diferenças significativas na análise intragrupo, os grupos GIII-LED e GIV-TFD com aumento da área de superfície óssea (2,17 para 10,84 e 3,97 para 8,66, respectivamente) e da espessura trabecular aos 14 dias (0,07 para 0,11 e 0,08 para 0,11, respectivamente). Na comparação entre DM e NG, com relação às medidas lineares, GII-CURC apresentou maior perda óssea na região interproximal aos 7 dias

nos NG e aos 14 dias nos DM. Quanto às medidas volumétricas, houve diferenças em alguns parâmetros em ambos os tempos, sem preferência por NG nem DM. Pode-se sugerir que para os NG, as terapias complementares podem levar a um benefício adicional pelo mecanismo de ação contra as bactérias e a favor da remodelação óssea pela imunomodulação da resposta do hospedeiro. Para os DM, pode-se sugerir um tratamento periodontal que seja iniciado com a TFDa e curcumina e manutenção com repetição de sessões de TFDa, LED ou apenas com a RACR. Na comparação entre NG e DM, embora não tenha ocorrido uma predominância de um melhor tratamento, na análise volumétrica, observou-se uma tendência a melhor resposta com GIII-LED e GIV-TFD. A condição sistêmica não foi determinante para a maior reabsorção óssea, mas pode direcionar uma melhor escolha terapêutica.

Palavras-chaves: Curcumina. Ratos. Doenças periodontais. Microtomografia computadorizada. Fotoquimioterapia.

ABSTRACT

ABSTRACT

Periodontitis is characterized by bone loss and has a bidirectional relationship with diabetes. The aim of this study was to evaluate the effect of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with curcumin on reducing periodontal bone resorption in diabetic rats using microcomputed tomography (micro CT). An *in vivo* experimental study was conducted using 80 male rats from the *Rattus norvegicus* species, class Mammalia, order Rodentia, Wistar lineage, aged 60-90 days and mass of 250-350 grams. Animals were divided into two groups: 40 normoglycemic (NG) and 40 diabetic (DM), being subdivided into 4 groups according to treatment: GI: non-surgical periodontal therapy (GI-NSPT); GII: NSPT + curcumin gel 2% (GII-CURC); GIII: NSPT + LED (GIII-LED); GIV: NSPT + aPDT (GIV-PDT). Diabetes was chemically induced by intraperitoneal injection of a single dose of 50mg/kg of streptozotocin. Animals that presented alterations in the glycemic index in all stages (glycemia \geq 250mg/dL) were selected for the diabetes group. Periodontitis was induced with ligation around the first lower molar for 7 days. At the end of interventions, five animals from each group were euthanized at 7 and 14 days and the hemimandibles were removed for analysis of alveolar bone loss, by microCT through quantitative analysis of linear and volumetric measurements using DataViewer® software (SkyScan®). For intragroup evaluation, two-way ANOVA and the t test for independent samples were used. The results of measurements of linear bone loss in NG and DM animals showed that there was no difference among treatments. In the intragroup analysis, GII-CURC showed in NG rats less bone loss in the furcation region at 14 days (1,357.68 to 795.74) and for DM rats on the vestibular face show increase in bone loss (788.70 to 1,487.22) with significant difference was observed when compared to the group with 7 days of treatment. Regarding the volumetric analysis of NG rats, the lowest values related to bone remodeling were recorded for GIV-PDT, and in the intragroup analysis, significant differences were for G-II with lower tissue volume at 14 days (1.69 to 0.87), despite showing increase in the trabecular number (1.68 to 4.16) and decrease in its separation (0.59 to 0.25). In DM rats, there was no difference between treatments with 7 and 14 days. GIII-LED and GIV-PDT groups showed significant differences in the intragroup analysis, with increased bone surface area (2.17 to 10.84 and 3.97 to 8.66, respectively) and trabecular thickness at 14 days (0.07 to 0.11 and 0.08 to 0.11, respectively). In the comparison between DM and NG animals with respect to linear measurements, GII-CURC showed greater bone loss in the interproximal region at 7 days in NG rats and at 14 days in DM rats. As for volumetric measurements, showed differences in some parameters at both times, with no

preference for NG or DM rats. It could be suggested that for NG rats, complementary therapies could lead to additional benefits by the mechanism of action against bacteria and in favor of bone remodeling by immunomodulating the host response. For DM rats, periodontal treatment could be suggested, starting with aPDT and curcumin and maintenance with repetition of aPDT, LED or NSPT sessions. In the comparison between NG and DM rats, the systemic condition did not have much influence on periodontal bone loss.

Keywords: Curcumin. Rats. Periodontal diseases. Microcomputed tomography. Photochemotherapy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A - Ampere, unidade de medida de corrente elétrica
- AGE - Do inglês *Advanced Glycation End Products*, traduzido como produtos finais da glicação avançada
- CCD - Do inglês *Charge-coupled Device*, traduzido como dispositivo de carga acoplada
- CESED - Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- CMC - Do inglês *chemically modified curcumin*, traduzido como curcumina quimicamente modificada
- CO - Crista óssea
- COL - Crista óssea lingual
- CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- COV - Crista óssea vestibular
- CT - Do inglês *Computed Tomography*, traduzido como tomografia computadorizada
- CTAN - Do inglês *Comprehensive TeX Archive Network*, traduzido como Rede abrangente de arquivos TeX
- CTVox - Do inglês *Computed tomography volume*, traduzido como tomografia computadorizada de volume
- CURC - Curcumina
- DM - Diabetes Mellitus
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Do inglês *deoxyribonucleic acid*, traduzido como ácido desorribonucléico
- DP - Doença periodontal
- ERO - Espécie reativa de oxigênio
- ESP.TRB - Espessura trabecular
- FACISA - Faculdade de Ciências Sociais Aplicadas
- FCM - Faculdade de Ciências Médicas
- FS - Fotossensibilizador

- GCURC - Grupo com raspagem e alisamento corono-radicular + gel de curcumina 2%
- GLED - Grupo com raspagem e alisamento corono-radicular + irradiação com Diodo Emissor de Luz
- GTFD - Grupo com raspagem e alisamento corono-radicular + terapia fotodinâmica antimicrobiana
- GTPNC - Grupo com terapia periodontal não-cirúrgica (raspagem e alisamento corono-radicular)
- IBM - International Business Machines Corporation
- IL-1 β - Interleucina 1 beta
- IL-6 - Interleucina 6
- JCE - Junção cimento-esmalte
- Kv - Quilovolt, unidade de medida de tensão elétrica
- LAMIB - Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica
- LED - Do inglês *Light Emission Diodo*, traduzido como Diodo Emissor de Luz
- LPS - Lipopolissacarídeo
- microCT- Microtomografia computadorizada
- MAPK - Do inglês *mitogen-activated protein kinase*, traduzido como proteína quinase ativada por mitógeno
- MMP - Do inglês Matrix Metallproteinases, traduzido como metaloproteinases da matriz
- NF-kB - Do inglês *nuclear factor kappa B* traduzido como fator nuclear kappa B
- NG - Normoglicêmicos
- nm - Nanômetro, unidade de medida de comprimento de onda
- NUM.TRB - Número de trabéculas
- mm - Milímetro, unidade de medida de espessura
- RACR - Raspagem e alisamento corono-radicular
- RAGE - Do inglês *Receptor Advanced glycation end products*
- RANK - Do inglês, *Receptor activator of nuclear 19ator kappa-B*, traduzido como ativador de receptores do fator nuclear kappa-B
- RANKL - Do inglês, *Receptor activator of nuclear 19ator kappa-B ligand*, traduzido como ativador de receptores do fator nuclear kappa-B ligante

ROI -	Do inglês <i>Region of Interest</i> , traduzido como região de interesse
SEP.TRB -	Separação de trabéculas
SO -	Superfície óssea
SPSS -	Do inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCO -	Tomografia de coerência óptica
TFDa -	Terapia Fotodinâmica antimicrobiana
TNF- α -	Do inglês <i>tumor necrosis factor</i> , traduzido como fator de necrose tumoral alfa
TPNC -	Terapia periodontal não-cirúrgica
TRAP -	Do inglês <i>Tartrate-Resistant Acid Phosphatase</i> , traduzido como fosfatase ácida tartarato-resistente
UFPB -	Universidade Federal da Paraíba
UFPE -	Universidade Federal de Pernambuco
VO -	Volume ósseo
VT -	Volume tecidual
μm -	Micrometro, unidade de medida de comprimento
3D -	Tridimensional

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E QUADROS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Fluxograma do estudo.....	34
Figura 2. Inserção do fio de sutura para indução da periodontite.....	35
Figura 3. Modelo de LED azul utilizado na pesquisa.....	37
Figura 4. Delineamento experimental do estudo.....	39
Figura 5. Ilustração das medidas lineares.....	41
Figura 6. Medição das medidas volumétricas na região de interesse através dos eixos de orientação anatômica.....	42

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Descrição dos grupos de tratamento.....	38

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição das avaliações quantitativas quanto à perda óssea linear em ratos normoglicêmicos.....	73
Tabela 2. Distribuição das avaliações quantitativas quanto à perda óssea linear em ratos diabéticos.....	74
Tabela 3. Avaliação dos parâmetros volumétricos na região de furca dos grupos experimentais com tempo de eutanásia de 7 e 14 dias de animais normoglicêmicos.....	75
Tabela 4. Avaliação dos parâmetros volumétricos na região de furca dos grupos experimentais com tempo de eutanásia de 7 e 14 dias de animais diabéticos.....	77
Tabela 5. Comparação das variáveis quanto à perda óssea linear em ratos diabéticos e normoglicêmicos aos sete dias de tratamento.....	79
Tabela 6. Comparação das variáveis quanto à perda óssea linear em ratos diabéticos e normoglicêmicos aos quatorze dias de tratamento.....	80
Tabela 7. Comparação dos parâmetros volumétricos em animais diabéticos e normoglicêmicos aos sete dias de tratamento.....	81
Tabela 8. Comparação dos parâmetros volumétricos em animais diabéticos e normoglicêmicos aos quatorze dias de tratamento.....	83

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	26
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 METODOLOGIA	33
3.1 DESENHO DO ESTUDO.....	33
3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	33
3.3 LOCAL DA PESQUISA	33
3.4 FASE EXPERIMENTAL.....	33
3.4.1 Animais	33
3.4.2 Indução da Diabetes	34
3.4.3 Indução da Periodontite	35
3.4.4 Tratamentos	36
3.4.5 Eutanásia	38
3.5 FASE LABORATORIAL	39
3.5.1 Método da Microtomografia Computadorizada (micro CT)	39
3.5.2 Análise por Microtomografia Computadorizada (micro CT)	40
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4 ARTIGO	45
4.1 APRESENTAÇÃO	45
4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	46
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
REFERÊNCIAS	88
ANEXOS	96

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A doença periodontal (DP) é uma condição inflamatória que afeta os tecidos de suporte e proteção dos dentes, podendo levar à destruição do osso alveolar e do ligamento periodontal. Sua prevalência e gravidade são altamente variáveis em diferentes populações, mas estima-se que 35 a 60% da população seja afetada pela gengivite e 15 a 20% dos indivíduos adultos sejam afetados pela periodontite (ZAMBRANO *et al.*, 2018), sendo uma das principais causas de perda dentária e afetando a qualidade de vida das pessoas em termos de capacidade funcional reduzida, autoestima e relações sociais (FILIPINI *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de tal condição é iniciado pelo biofilme microbiano oral, particularmente anaeróbios gram-negativos e seus produtos metabólicos, como a liberação de lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina que desempenham papel importante na resposta imune envolvendo a produção de mediadores inflamatórios, dentre eles, interleucina 6 e 1 β (IL-6 e IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Esses mediadores regulam positivamente a produção e ativação de metaloproteinases (MMPs) e prostanoídes, bem como a expressão do ativador de receptores do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL) que promove a osteoclastogênese e aumenta a reabsorção óssea mediada por osteoclastos (ELBURKI *et al.*, 2017).

Além disso, a destruição do colágeno e do tecido conjuntivo é em grande parte mediada pela resposta do hospedeiro (ELBURKI *et al.*, 2017; THEODORO *et al.*, 2017), sendo influenciada por fatores genéticos, epigenéticos, ambientais (IVANAGA *et al.*, 2019). Portanto, sua patogênese é considerada um processo disbiótico resultante de um desequilíbrio entre os microrganismos do biofilme e as respostas do hospedeiro (ELBURKI *et al.*, 2017; ZAMBRANO *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que a DP destrutiva é uma condição específica local que frequentemente afeta um número limitado de dentes (ZAMBRANO *et al.*, 2018). Apesar de ser uma condição sítio-específica, a infecção periodontal também pode ter implicações sobre a saúde sistêmica (PARK *et al.*, 2017), particularmente diabetes mellitus (DM) (ELBURKI *et al.*, 2017; FILIPINI *et al.*, 2019).

DM é um distúrbio metabólico crônico caracterizado por um quadro hiperglicêmico, ou seja, níveis elevados de glicose no sangue por uma deficiência de insulina (IVANAGA *et al.*, 2019) e também está associado à ativação da resposta imune, caracterizada por níveis aumentados de mediadores inflamatórios (ELBURKI *et al.*, 2017). Essa condição tem alta

prevalência na população e uma previsão de atingir 642 milhões de pessoas em 2040 (FILIPINI *et al.*, 2019).

Esse estado de hiperglicemia crônica leva a respostas imunoinflamatórias exacerbadas com a formação e acúmulo de produtos finais da glicosilação avançada (AGEs) que interage com seu receptor RAGE, ativando múltiplas vias de sinalização que estão associadas à expressão de várias citocinas pró-inflamatórias e com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem ser ativadores de pró-MMPs. Destarte, essa interação é o principal mecanismo mediador de complicações diabéticas, considerando ainda a possibilidade de antígenos bacterianos também ativar esse receptor, amplificando a inflamação em condições infecciosas em diabéticos (ELBURKI *et al.*, 2017; IVANAGA *et al.*, 2019).

As evidências disponíveis indicam que as doenças periodontais são causalmente ligadas ao diabetes e que existe uma associação entre inflamação periodontal, estado glicêmico e complicações do diabetes. Os estudos confirmam que a diabetes aumenta os eventos inflamatórios no tecido periodontal, prejudicando a neoformação óssea e aumenta a expressão de RANKL em resposta a um desafio induzido por bactérias. Estudos em animais sugerem que existem vários mecanismos afetados pelo diabetes que afetam um grande número de tipos celulares como as células do ligamento periodontal, osteoblastos e osteócitos (GRAVES, DING, YANG, 2020), com efeito importante sobre o aumento da osteoclastogênese (LLAMBÉS, ARIAS-HERRERA, CAFFESSE, 2015).

Uma vez que o desequilíbrio da resposta imune-inflamatória é o ponto chave para destruição dos tecidos associado à DP, existe um vasto benefício em estratégias terapêuticas moduladoras do hospedeiro. Entretanto, apesar do conhecimento sobre os mecanismos biológicos da patogênese, o tratamento periodontal ainda se baseia principalmente na terapia periodontal não cirúrgica (TPNC) por meio da remoção mecânica de raspagem e alisamento corono-radicular (RACR), embora seja uma conduta limitada, principalmente quando envolve áreas de furca, invaginações, concavidades e bolsas profundas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; BARIN *et al.*, 2017; BELINELLO-SOUZA *et al.*, 2017; THEODORO *et al.*, 2017; ZAMBRANO *et al.*, 2018; IVANAGA *et al.*, 2019; PERON *et al.*, 2019).

Em razão dessas limitações, mecanismos alternativos da terapia antimicrobiana, como antibióticos locais e sistêmicos, têm sido propostos em casos inobstantes ao tratamento convencional. No entanto, especialmente quando se refere ao uso de antibióticos sistêmicos, além do aparecimento de efeitos colaterais indesejáveis, desenvolve a resistência bacteriana às

drogas pelo uso abusivo ou impasse de seguir o protocolo medicamentoso (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; BARIN *et al.*, 2017; BELINELLO-SOUZA *et al.*, 2017; PERON *et al.*, 2019).

O sucesso da terapia periodontal baseia-se no controle quantitativo e qualitativo dos microrganismos responsáveis por estabelecer e perpetuar a doença, bem como por redução de sinais inflamatórios (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016), resultando na diminuição da progressão da doença.

Diante desse contexto, novas abordagens terapêuticas como a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) como monoterapia (THEODORO *et al.*, 2017) ou adjunta ao tratamento mecânico (IVANAGA *et al.*, 2019), surgem como uma proposta promissora.

Essa modalidade é indicada como um método alternativo e/ou complementar para reduzir os periodontopatógenos, por destruição seletiva. São necessários três componentes principais: um fotossensibilizador (FS) não-tóxico, que é uma substância fotoativável que se liga às células; uma luz visível inócua e de baixa intensidade, com comprimento de onda específico e moléculas de oxigênio para formar os radicais livres que são prejudiciais aos microrganismos. Apresenta as vantagens de ser uma terapia localizada e não-invasiva, especificidade para as células-alvo, incapacidade de desenvolver resistência bacteriana, tornando possível a sua repetição, não induz efeitos colaterais, remoção de bactérias patogênicas em um curto espaço de tempo, sem risco de lesão do tecido circundante do hospedeiro, risco muito baixo de indução de mutações, atinge sítios inacessíveis, preservação da flora microbiana normal na cavidade oral (GHANBARI *et al.*, 2015; DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; NAJAFI *et al.*, 2016; BARIN *et al.*, 2017; BELINELLO-SOUZA *et al.*, 2017; DE MORAES *et al.*, 2017; PILLUSKY *et al.*, 2017; THEODORO *et al.*, 2017; PAL *et al.*, 2019).

A reação fotoquímica na TFDa ocorre através da absorção pelo FS de fótons (energia) diretamente da fonte de luz para sua excitação, digo, para a sua transformação em uma molécula instável. Essa energia ou esses elétrons são transferidos para uma molécula de oxigênio no estado fundamental, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (reação de tipo I) e oxigênio singleto (reação do tipo II) que são tóxicos para as células microbianas, causando danos irreversíveis à membrana citoplasmática da célula ou ácido desoxirribonucléico (DNA), que culmina na morte celular bacteriana, sem promover resistência (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; BARIN *et al.*, 2017; BELINELLO-SOUZA *et al.*, 2017; DE MORAES *et al.*, 2017; THEODORO *et al.*, 2017; PAL *et al.*, 2019).

Outro método alternativo para o tratamento das doenças periodontais é encontrar substâncias, com efeito antibiofilme que possam inibir a reprodução bacteriana (NAJAFI *et al.*, 2016).

A curcumina é um composto fenólico que corresponde a um componente popular do Açafrão-da-Índia, que é extraído do rizoma da *Curcuma longa* e apresenta propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, imunomoduladora e cicatrizante, o que a torna favorável para essa finalidade terapêutica (ZAMBRANO *et al.*, 2018; DE ALMEIDA BRANDÃO *et al.*, 2019).

Além de seus efeitos diretos, a curcumina também pode ser usada como FS para a TFDa, com um pico de absorção na faixa de 300 a 500nm (máximo em 430-435nm), tornando-o compatível com a luz azul, mais especificamente com diodo emissor de luz (LED), e não mostra efeitos tóxicos *in vivo* e *in vitro* (NAJAFI *et al.*, 2016; THEODORO *et al.*, 2017; SAITAWEE *et al.*, 2017; POURHAJIBAGHER *et al.*, 2018).

Apesar dos efeitos benéficos, a curcumina tem grandes limitações, incluindo baixa solubilidade, falta de biodisponibilidade sistêmica e rápida disposição metabólica. Dessa forma, são necessárias doses elevadas do composto, embora com a obtenção de baixos níveis séricos, limitando sua aplicação clínica (ZHANG *et al.*, 2012; ELBURKI *et al.*, 2017).

Por sua característica hidrofóbica, a mesma é solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO), acetona, etanol e óleos (POURHAJIBAGHER *et al.*, 2018), mas diferentes técnicas foram desenvolvidas para melhorar a sua eficácia, por meio de uma modificação química (ELBURKI *et al.*, 2017), inclusive utilizando vários dispositivos de distribuição locais como fibras, tiras, géis, micropartículas, películas e nanopartículas (ANURADHA *et al.*, 2015).

A curcumina também pode ser usada em combinação com a luz, potencializando seus efeitos terapêuticos, podendo levar a resultados promissores (NAJAFI *et al.*, 2016; SAITAWEE *et al.*, 2018; IVANAGA *et al.*, 2019).

Para avaliar a eficácia dos métodos terapêuticos da doença periodontal, as ferramentas tradicionais de investigação clínica para exames periodontais de rotina são a sondagem utilizada para avaliar o ganho de inserção clínica periodontal e a radiografia convencional (periapical, interproximal) rotineiramente utilizada para avaliar perda óssea alveolar interproximal. Pesquisas evidenciam que tais exames complementares podem subestimar a quantidade de perda óssea e sugerem, em estudos experimentais, o uso de abordagens para quantificar o osso alveolar como a histomorfometria e a microtomografia computadorizada (micro CT). Esse último método corresponde a uma técnica não-destrutiva com alto poder de resolução (até 10µm), especialmente para imagens em tecidos duros, podendo medir a densidade óssea quantitativa e tridimensional (3D) (WANG *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2017).

Portanto, com base nessa exposição prévia que demonstra uma possível relação bidirecional da DP e da DM e por ambas apresentarem mecanismos que podem estar

associados, o presente estudo buscou avaliar o efeito da TFDa com curcumina na reabsorção óssea periodontal em ratos diabéticos, por meio da microtomografia computadorizada (micro CT), com o intuito de subsidiar estratégias terapêuticas para essa condição patológica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana com curcumina na reabsorção óssea periodontal em ratos diabéticos por meio da microtomografia computadorizada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana com curcumina em relação às demais terapias na reabsorção óssea periodontal;
- Comparar a reabsorção óssea periodontal em animais diabéticos e não diabéticos.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo experimental *in vivo*, para avaliar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana com curcumina na redução da reabsorção óssea periodontal em ratos diabéticos por meio da microtomografia computadorizada.

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED) de Campina Grande/PB (nº de protocolo: 008014122018) e seguiu os preceitos da Lei Brasileira nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, assim como as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). (Anexo A).

3.3 LOCAL DA PESQUISA

A fase experimental foi conduzida no Biotério da FACISA, localizado em Campina Grande, Paraíba, Brasil. A etapa de aquisição e avaliação por microtomografia computadorizada (micro CT), foi desenvolvida no Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica da Universidade Federal da Paraíba (LAMIB-UFPB), localizado em João Pessoa, Paraíba, Brasil.

3.4 FASE EXPERIMENTAL

3.4.1 Animais

Foram utilizados 80 ratos machos, da espécie *Rattus norvegicus*, classe Mammalia, ordem Roedentia, linhagem Wistar, com idade entre 60 e 90 dias, massa entre 250 e 350 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Foram utilizados ratos machos para evitar a influência das variações hormonais sobre o processo de reparo ósseo. Estes animais foram acondicionados no Biotério da UNIFACISA e mantidos em gaiolas plásticas durante o experimento, com no máximo cinco animais,

separados de acordo com os grupos e períodos de tratamentos, sob um regime de 12/12h de ciclo dia/noite e recebendo ração padrão (Supralab[®], São Leopoldo, Brasil) e água *ad libitum*.

Antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais passaram por um período de 5 dias para aclimatação ao ambiente de laboratório a uma temperatura de 22 a 24°C. Foram incluídos no estudo os animais que se apresentaram em condições saudáveis e aptos a se submeterem aos procedimentos operatórios.

Os 80 animais foram alocados por meio de randomização simples em dois grupos: normoglicêmicos (NG) e diabéticos (DM). Cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos, de acordo com o tratamento a que foi submetido (FIGURA 1).

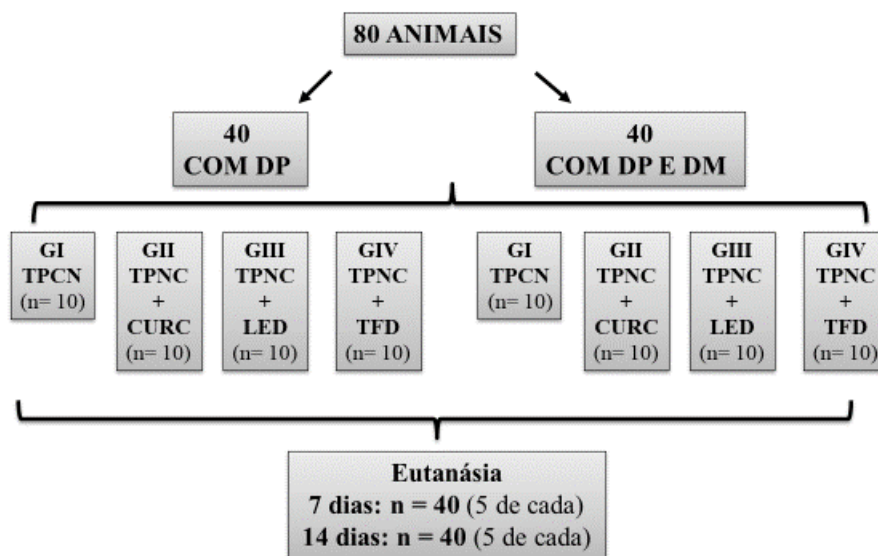


Figura 1. Fluxograma do estudo.

3.4.2 Indução da Diabetes

Antes da indução da diabetes tipo I, os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas para dieta sólida. O método utilizado foi a indução química por meio da aplicação intraperitoneal, de acordo com Filipini *et al.* (2019), com uma única dose de 50mg/kg de estreptozotocina (Cayman[®], Ann Arbor, Estados Unidos) dissolvida em solução de tampão citrato, com pH 4,5, na concentração de 0,01M, na proporção de 1mL/kg. Após 2 horas do procedimento, os animais receberam alimento sólido e líquido normalmente, sendo mantidos no biotério com acompanhamento diário da evolução do quadro clínico.

A glicemia foi verificada com a retirada de sangue da veia caudal no dia da indução da diabetes, para descartar a possibilidade de diabetes pré-existent, três dias depois, para a confirmação da efetividade do procedimento e nos dias de tratamento e da eutanásia com o

uso do glicosímetro (*On Call Plus*[®], San Diego, Estados Unidos). Os animais que apresentaram em todas as etapas alteração no índice glicêmico (glicemia ≥ 250 mg/dL), foram selecionados para o grupo com diabetes e os demais foram excluídos.

3.4.3 Indução da Periodontite

Antes da indução da doença periodontal pelo método da ligadura, os animais foram pesados em uma balança analítica (*Shimadzu*[®], São Paulo, Brasil) para o cálculo da correta dosagem do anestésico geral a ser administrado. Foi utilizada uma associação anestésica de 70mg/kg de cetamina (*Dopalen*[®], São Paulo, Brasil) e 6mg/kg de xilazina (*Anasedan*[®], São Paulo, Brasil).

Constatado o plano anestésico profundo, os animais foram posicionados em um aparato previamente confeccionado para que os maxilares fossem mantidos abertos por meio de bandas elásticas presas aos incisivos e facilitando o acesso aos dentes posteriores da mandíbula.

Um sonda exploradora de Odontopediatria foi introduzida entre o primeiro e segundo molar inferior para obtenção de um espaço entre os dentes e, em seguida, com a ajuda de um porta-agulha um fio de sutura de seda 3-0 (*Procure*[®], Rio de Janeiro, Brasil) que foi introduzido na posição subgingival do primeiro molar e mantido através de dois nós cirúrgicos simples voltados para mesial, por 7 dias, de acordo com Belinello-Souza *et al.*, 2017; De Moraes *et al.*, 2017; Pillusky *et al.*, 2017; Theodoro *et al.*, 2017; Filipini *et al.*, 2019) (FIGURA 2).

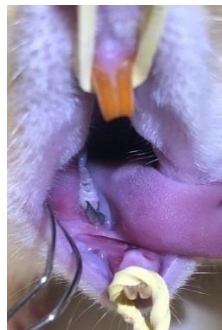


Figura 2. Inserção do fio de sutura para indução da periodontite.

Fonte: Arquivo pessoal.

Decorridos 7 dias da indução da periodontite experimental, os fios foram removidos e os animais foram divididos randomicamente, de acordo com o tratamento periodontal.

3.4.4 Tratamentos

Grupo I: Terapia periodontal não-cirúrgica (GI-TPNC)

Após o período de indução da condição patológica, os fios foram removidos e os animais submetidos a procedimentos de RACR com cureta de Gracey mini-five 5-6 (Trinity[®], São Paulo, Brasil) ao redor de todo o dente, por meio de 10 movimentos de tração distal-mesial nos sítios vestibular e lingual e com movimentos de tração cérvico-olcusais nas áreas de furca e interproximal, de forma que todo depósito de biofilme e/ou cálculo fosse removido. (Quadro 1).

Grupo II: Terapia periodontal não-cirúrgica + gel de curcumina a 2% (GII-CURC)

Após o período de indução da condição patológica, os fios foram removidos e os animais submetidos a procedimentos de RACR e, em seguida, o gel de curcumina foi inserido lentamente no interior do sulco gengival, na face vestibular e lingual dos primeiros molares inferiores, utilizando uma seringa com a ponta direcionada para o interior da bolsa periodontal sendo mantido por 5 minutos, sem qualquer iluminação artificial direta.

O gel de curcumina foi formulado no Laboratório Dilecta (João Pessoa, Paraíba, Brasil), conforme preconizado por Hosadurga *et al.*, 2014. Inicialmente foi preparado um gel de carbopol 2% que consistiu no aquecimento de nipagin (0,18%) em água purificada. Após seu resfriamento, houve a dispersão do carbopol em água, passando por uma hidratação de 4 horas. Em seguida, essa mistura foi levada ao agitador magnético para homogeneização. Foi adicionada a trietanolamina (1,7%) até atingir o pH 6,0 e acrescentado o propilenoglicol (25%). Por fim, a *Curcuma Longa* 2% (Valdequímica[®], Caxingui, São Paulo, Brasil) foi incorporado ao gel de carbopol q.s.p 50g, homogeneizado e verificado o pH final de 5,8, coloração laranja e consistência conforme (Anexo B). (Quadro 1).

Grupo III: Terapia periodontal não-cirúrgica + irradiação com LED (GIII-LED)

Após o período de indução da condição patológica, os fios foram removidos e os animais submetidos a procedimentos de RACR e, em seguida, à irradiação com LED azul (KaVo Poly 600[®]), com comprimento de onda de 450-460nm, potência radiada máxima 400-600mW/cm², potência mínima 3,3W, durante 60 segundos, com irradiação localizada e em contato com a área, no modo contínuo (FIGURA 3). (Quadro 1).



Figura 3. Modelo de LED azul utilizado na pesquisa.

(Google, 2020).

Grupo IV: Terapia periodontal não-cirúrgica + gel de curcumina a 2% + irradiação com LED (GIV-TFD).

Após o período de indução da condição patológica, os fios foram removidos e os animais submetidos a procedimentos de RACR e, em seguida, a aplicação do gel de curcumina a 2% (conforme GCURC). Decorrido o tempo de pré-irradiação, o excesso de gel foi removido com o auxílio de um algodão estéril e logo após a região foi irradiada com com LED (conforme parâmetros mencionado no GLED). (Quadro 1).

Quadro 1. Descrição dos grupos de tratamento

GRUPO	SUBGRUPO POR TRATAMENTO	DESCRIÇÃO
NG (n=40)	GI- TPNC (n=10)	Sem diabetes + terapia periodontal não cirúrgica.
	GII- CURC (n=10)	Sem diabetes + terapia periodontal não cirúrgica + aplicação do gel de curcumina 2%.
	GIII- LED (n=10)	Sem diabetes + terapia periodontal não cirúrgica + irradiação com LED.
	GIV- TFD (n=10)	Sem diabetes + terapia periodontal não cirúrgica + aplicação do gel de curcumina 2% + irradiação com LED.
DM (n=40)	GI- TPNC (n=10)	Com diabetes + terapia periodontal não cirúrgica.
	GII- CURC (n=10)	Com diabetes + terapia periodontal não cirúrgica + aplicação do gel de curcumina 2%.
	GIII- LED (n=10)	Com diabetes + terapia periodontal não cirúrgica + irradiação com LED.
	GIV- TFD (n=10)	Com diabetes + terapia periodontal não cirúrgica + aplicação do gel de curcumina 2% + irradiação com LED.

3.4.5 Eutanásia

Após o tratamento, 5 animais de cada subgrupo foram eutanasiados aos 7 e 14 dias, com a observância da glicemia para confirmação do estado diabético. A eutanásia foi realizada por anestesia inalatória com isoflurano (Cristália[®], São Paulo, Brasil) e depois de

constatada a morte do animal a mandíbula foi removida, separada em sua sínfise com o auxílio de uma tesoura metzembaum que era colocada entre os incisivos inferiores. Cada hemi-mandíbula foi colocada em frasco contendo formol 10% tamponado, para posterior análise da reabsorção óssea por microtomografia computadorizada (FIGURA 4).



Figura 4: Delineamento experimental do estudo.

3.5 FASE LABORATORIAL

Após a eutânasia, a hemi-mandíbula foi submetida ao escaneamento por microtomografia computadorizada (micro CT) e posteriormente analisadas no Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica (LAMIB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

3.5.1 Método da Microtomografia Computadorizada (micro CT)

A microtomografia computadorizada (micro CT) é uma versão em miniatura da técnica da tomografia computadorizada e vem sendo usada em análise experimental. Trata-se de um método de diagnóstico que permite a visualização de um objeto de forma não-destrutiva e o princípio do seu funcionamento baseia-se na propriedade dos materiais absorverem esta radiação de forma diferenciada, dependendo de sua composição química e densidade.

Essa técnica diagnóstica divide virtualmente o objeto do estudo em “fatias” nas quais são mapeados parâmetros físicos como a densidade e a porosidade de cada região interna do objeto, apresentadas na forma de imagens bidimensionais que podem ser compostas de modo a obter objetos virtuais tridimensionais (3D), por meio de algoritmos computacionais.

A obtenção de imagens tomográficas (secções transversais) é realizada em duas etapas: a primeira consiste na aquisição das imagens radiográficas de diversas projeções angulares da amostra ao longo de uma rotação de 180° ou 360° com passos de rotação muito

precisos; e a segunda permite a reconstrução das imagens das secções transversais a partir das imagens das projeções angulares por meio do algoritmo de reconstrução de feixe cônico de Feldkamp modificado que roda no *cluster* de computadores.

O uso de imagens para a análise da estrutura óssea apresenta algumas vantagens: método imparcial, permite a mensuração da estrutura tridimensional das trabéculas, sua conectividade e orientações arbitrárias, possibilidade de ser automatizado, dispensa métodos específicos para a preparação das amostras, realiza múltiplas simulações sem destruir a amostra e reduzindo o número de animais utilizados. Por outro lado, esse tipo de análise óssea não fornece informações sobre a atividade celular ou sobre a dinâmica do processo de mineralização.

3.5.2 Análise por Microtomografia Computadorizada (micro CT)

Para a realização da análise microtomográfica, foi utilizado o aparelho *SkyScan*[®] 1172 (Bruker, Kontich, Bélgica), conforme adaptação do protocolo de Fernandes, 2014. As amostras de hemi-mandíbula foram escaneadas em três planos espaciais padronizados com um tamanho de voxel isotrópico de 9µm, 60kV, 165µA em 180°, com um ângulo de rotação de 0,4°, no tempo de exposição de 0,5 segundos utilizando um filtro de alumínio de 0,5mm.

As peças foram posicionadas e fixadas no porta-amostra apropriado para o equipamento, com uma cera utilidade, possibilitando a estabilização a fim de prevenir qualquer tipo de movimentação durante o escaneamento. As imagens de cada amostra foram reconstruídas a partir do ápice da coroa, incluindo o processo do osso alveolar com o software específico NRecon[®] (v 1.6.3.3) em cerca de 100 fatias, de acordo com os parâmetros anatômicos adotados, para gerar a imagem tridimensional. Os *softwares* CTAn[®] (v 1.10.11.0), *Data Viewer*[®] (v 1.4.3) e CTvox[®] (v 2.0.0.0) foram utilizados para a visualização tridimensional e a análise qualitativa e quantitativa da anatomia interna e externa do osso alveolar.

O programa *Data Viewer*[®] foi utilizado para visualização e avaliação bidimensional (medidas lineares) dos eixos coronal, transaxial e sagital, bem como a definição da distância da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea (CO) nos aspectos vestibular e lingual dos dentes, e da região interproximal e de furca. A posição da crista óssea alveolar foi determinada como o primeiro contato do osso com a superfície radicular.

As análises lineares foram realizadas após o estabelecimento de uma posição ideal, determinada pelo examinador. Tal posição era representada quando, no plano sagital, era

possível visualizar, nitidamente, o primeiro e segundo molares, enquanto que no plano coronal, as raízes estavam completamente separadas. A medição na região de furca foi realizada na imagem existente no eixo sagital, ao passo que a quantificação de perda óssea por vestibular, lingual e interproximal foi feita nas imagens no eixo transaxial. Para avaliar a perda óssea alveolar, as distâncias da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea (CO) alveolar foram medidas em μm em quatro locais distintos: na face vestibular e lingual, na área de furca e na interproximal (FIGURA 5).

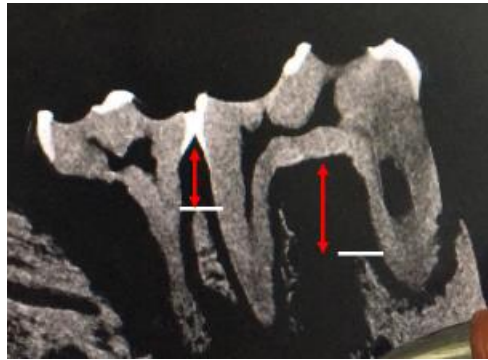


Figura 5. Ilustração das medidas lineares.

Fonte: Arquivo pessoal.

- Região de furca: distância do teto da furca até à CO interradicular;
- Região interproximal: distância do ponto de contato até à CO interproximal;
- Face vestibular: distância linear entre a JCE até à crista óssea vestibular (COV);
- Face lingual: distância linear entre a JCE até e à crista óssea lingual (COL)

As medições volumétricas foram realizadas após a seleção de uma região de interesse (ROI) (coronal) e utilizando o CTAn. A ROI foi delimitada a partir da raiz mesial do primeiro molar até a raiz mesial do segundo molar, servindo como bordas de ponto final, pois a doença periodontal experimental e a máxima perda óssea foram evidentes no primeiro molar, na região de furca e na área interproximal entre o primeiro e segundo molar.

O objetivo das análises volumétricas foi quantificar o volume de osso alveolar em duas regiões distintas: interproximal entre primeiro e segundo molar e furca do primeiro molar. Para tanto, foi selecionado como ponto de partida o corte (*slice*) em que as quatro raízes do primeiro molar inferior do animal foram visualizadas nitidamente e o ponto final foi determinado como a posição em que não era mais possível visualizar o osso interradicular, resultando na inclusão mínima das raízes dos dentes e quantificação máxima do osso alveolar.

Após a delimitação dessas referências e com desenho da ROI, guiado por pontos de referência morfológicos, os contornos foram traçados em intervalos regulares com um método baseado em fatias, a cada 10 planos, estabelecendo-se 100 cortes para análise. Todos os contornos foram traçados começando imediatamente abaixo da junção cimento-esmarte e deslocando-se 1,5mm na direção apical. Assim, toda a área óssea da região interproximal e a área de furca do primeiro molar foi envolvida pela ROI.

Após a interpolação dos ROIs (coronal, sagital e transaxial), unidos em uma só estrutura, foi realizado o processamento da imagem e, por fim, a geração dos dados volumétricos, através do aplicativo CTAn® com selecionamento prévio dos parâmetros de interesse para a posterior confecção das imagens em 3D da área de interesse, bem como da área total da amostra, com a utilização do aplicativo CTVox® (FIGURA 6).

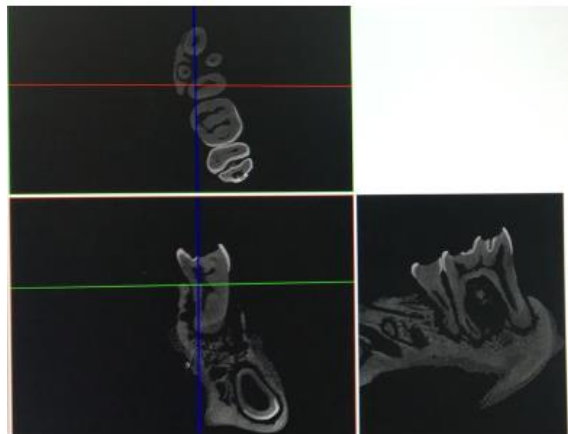


Figura 6. Medição das medidas volumétricas na região de interesse através dos eixos de orientação anatômica.

Fonte: Arquivo pessoal.

Com o CTAn foi possível definir a área de interesse para a avaliação tridimensional e ele permite analisar e medir a imagem de acordo com as escalas de cinza (threshold), possibilitando obter o volume de osso formado nos alvéolos em reparação.

Por meio de segmentação foi possível diferenciar voxels que correspondem a diferentes tecidos, tais como, tecido ósseo, esmalte, dentina e tecidos moles; existiam também voxels que não representavam tecidos e sim outras substâncias como água ou ar. Voxels mais claros significam alta quantidade de cálcio (alta densidade óssea), os voxels escuros representam tecidos moles ou menor quantidade de cálcio. Durante a segmentação estes voxels foram descartados.

Para a obtenção do volume ósseo foram eliminados, pelo processo de segmentação, a coroa e raiz dentária do primeiro molar, bem como a raiz do incisivo que passa por baixo desta unidade dentária. Para esse processo escolheu-se o threshold que determinou e diferenciou o tecido ósseo dos demais materiais e, a partir de então, procedeu-se a correção manual de pixels em cada fatia 2D para a seguir obter a reconstrução 3D do osso remanescente sem a unidade dentária.

Dentre os parâmetros investigados estão: o volume ósseo (VO), volume tecidual (VT) e a relação entre eles (VO/VT), além da área de superfície óssea (SO) e sua relação com o volume tecidual (SO/VT) e análise trabecular quanto à espessura (ESP.TRB), número (NUM.TRB) e separação trabecular (SEP.TRB). Durante o aparecimento de condições patológicas com envolvimento ósseo como no caso da periodontite, as trabéculas ósseas são perfuradas e a conectividade entre elas é parcialmente dissolvida.

Todos os cálculos são realizados sobre a região e/ou volume de interesses (VOI) selecionados e este, por sua vez, refere-se a soma de todos os ROIs coletivos sobre um conjunto contíguo de fatias de imagem de secção transversal, representando um volume 3D selecionado. Dessa forma, as análises morfométricas em 3D são realizadas em um VOI.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram organizados em um banco de planilha *Excell* e posteriormente transferidos para o programa *IBM SPSS Statistics* (versão 25.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA), para realização das análises estatísticas. Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão dos grupos experimentais em cada período, para os parâmetros lineares e volumétricos, considerando cada hemi-mandíbula como uma unidade experimental. Os dados foram analisados intragrupo considerando os diferentes pontos de tempos e intergrupo, a cada intervalo de tempo.

Para a seleção dos testes estatísticos, foram realizados testes de homogeneidade e homocedasticidade, através do Teste Z ($p < 0,05$). Os testes paramétricos, análise de variância (ANOVA *Two Way*) e pos-hoc de Bonferroni, foram utilizados para a avaliação intergrupo de perda óssea e microarquitetura óssea. O teste t para as amostras independentes foi realizado para obter a avaliação intragrupo nos tempos experimentais de 7 e 14 dias. Para todas as análises estatísticas, foi adotado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 ARTIGO

4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa foi desenvolvido e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Mediante execução desse projeto, um artigo é apresentado nesta tese: **“Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com curcumina na reabsorção óssea periodontal em ratos diabéticos”**.

O artigo será submetido ao periódico Photodiagnosis and Photodynamic Therapy (ISSN: 1572-1000; Fator de impacto: 2.894; Qualis Odontologia/Referência A1), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no ANEXO C.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com curcumina na reabsorção óssea periodontal em ratos diabéticos

Título breve: **Terapia Fotodinâmica antimicrobiana com curcumina em ratos diabéticos**

Ana Luzia Araújo Batista¹, Jhonathan Thiago Lacerda Santos¹, José de Alencar Fernandes Neto¹, Gustavo Henrique Apolinário Vieira², Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão¹

¹ *Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil.*

² *Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.*

Autor Correspondente:

Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Universidade Estadual da Paraíba
Rua Baraúnas 351 Bairro Universitário
Campina Grande-PB CEP 58429-500 Brazil
E-mail: mhelenact@zipmail.com.br

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) com curcumina a 2% na reabsorção óssea periodontal em ratos diabéticos. **Método:** Estudo experimental *in vivo*, com 80 ratos machos, divididos em 2 grupos: 40 normoglicêmicos (NG) e 40 diabéticos (DM), sendo subdivididos em 4 grupos a depender do tratamento: GI - terapia periodontal não cirúrgica (GI-TPNC); GII - TPNC + gel de curcumina 2% por 5 minutos e sem iluminação direta (GII-CURC); GIII - TPNC + LED (KaVo poly 600, 450-460nm, 400—600w/cm², 3,3W, 60 segundos) (GIII-LED); GIV - TPNC + TFDa (GIV-TFD). A diabetes foi induzida com estreptozotocina e a periodontite com ligadura no primeiro molar inferior. Após a intervenção, 7 e 14 dias depois, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados e as hemimandíbulas removidas e encaminhadas para análise da microarquitetura óssea trabecular por microtomografia computadorizada, através das medidas lineares e volumétricas. Foram utilizados os testes análise da variância (ANOVA two-way) para análise intragrupo e o teste t para amostras independentes. **Resultados:** As medidas de perda óssea linear nos animais NG e DM evidenciaram que não houve diferença entre os tratamentos nos dois tempos. Na análise intragrupo, o GII-CURC apresentou diferença significativa para os NG com menor perda óssea na região de furca aos 14 dias e para os DM, na face vestibular, um aumento da perda óssea. Com relação à análise volumétrica, nos NG a menor remodelação óssea foi registrada no GIV-TFD e na análise intragrupo, as diferenças significativas foram para GII-CURC com menor volume tecidual aos 14 dias, embora tenha apresentado aumento no número trabecular e diminuição na separação trabecular. Nos DM não houve diferença entre os tratamentos com 7 e 14 dias, mas na análise intragrupo, GIII-LED e GIV-TFD apresentaram diferença significativa com aumento na área de superfície óssea e espessura trabecular aos 14 dias. Na comparação entre DM e NG, as diferenças significativas não priorizaram nenhum grupo e nenhum tratamento específico. **Conclusão:** Em animais NG ou DM, as terapias complementares podem promover um benefício adicional com o decorrer do tempo, principalmente em região de difícil acesso. Para os DM, sugere-se um tratamento periodontal que seja iniciado com a TFDa ou curcumina e manutenção com repetição de sessões de TFDa, LED ou apenas com a TPNC, para que a eficácia seja garantida evitando a perda óssea gradativa. Na comparação entre NG e DM, a condição sistêmica não teve grande influência na perda óssea periodontal. **Palavras-chaves:** Curcumina; Ratos, Doenças periodontais; Microtomografia Computadorizada; Fotoquimioterapia.

Introdução

A doença periodontal (DP) é uma condição inflamatória que afeta os tecidos de suporte e proteção dos dentes, podendo levar à destruição do osso alveolar e do ligamento periodontal, sendo a periodontite uma das principais causas de perda dentária, afetando a qualidade de vida das pessoas em termos de capacidade funcional reduzida, autoestima e relações sociais (ZAMBRANO *et al.*, 2018; FILIPINI *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de tal condição é iniciado pelo biofilme microbiano oral, particularmente anaeróbios gram-negativos e seus produtos metabólicos que desempenham papel importante na resposta imune do hospedeiro. Portanto, sua patogênese é considerada um processo disbiótico resultante de um desequilíbrio entre os microrganismos do biofilme e as respostas do hospedeiro (ELBURKI *et al.*, 2017; ZAMBRANO *et al.*, 2018).

De acordo com a nova classificação das doenças periodontais, existem doenças sistêmicas comuns, como o DM não controlado, com efeitos variáveis que modificam o curso da periodontite. Estes efeitos parecem fazer parte da natureza multifatorial de doenças complexas como a periodontite e estão incluídos como um descritor no processo de estadiamento e graduação (CATON *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que a DP destrutiva é uma condição específica local que frequentemente afeta um número limitado de dentes e, apesar de ser uma condição sítio-específica, a infecção periodontal também pode ter implicações para a saúde sistêmica, particularmente diabetes mellitus (DM) (ELBURKI *et al.*, 2017; (PARK *et al.*, 2017; ZAMBRANO *et al.*, 2018; FILIPINI *et al.*, 2019).

A diabetes é uma condição patológica, com alta prevalência na população, corresponde a um distúrbio metabólico crônico caracterizado por um quadro de hiperglicemia em função da deficiência de insulina e também está associado à ativação da resposta imune, caracterizada por níveis aumentados de mediadores inflamatórios (ELBURKI *et al.*, 2017; IVANAGA *et al.*, 2019).

No princípio acreditava-se que a periodontite representava uma complicação da diabetes, mas atualmente considera-se que as duas condições têm relação bidirecional e, embora a diabetes não desencadeia a periodontite, é considerada um grande fator de risco e preditor (CORLAN PUŞCU *et al.*, 2016).

Esse estado de hiperglicemia crônica leva a respostas imunoinflamatórias que também pode ser ativada por antígenos bacterianos, amplificando a inflamação em condições infecciosas em diabéticos (ELBURKI *et al.*, 2017; IVANAGA *et al.*, 2019). Além disso, a diabetes tem um efeito importante sobre o aumento da osteoclastogênese e da apoptose de osteoblastos (LLAMBÉS, ARIAS-HERRERA, CAFFESSE, 2015).

Uma vez que o desequilíbrio dessa imunomodulação é o ponto chave para destruição dos tecidos associados à periodontite, existe um grande interesse em estratégias terapêuticas moduladoras do hospedeiro. Embora seja preconizado a terapia periodontal não cirúrgica (TPNC), por meio da raspagem e alisamento corono-radicular (RACR), devido suas limitações técnicas, novas alternativas a exemplo da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem se mostrado promissora como alternativa ou complementar (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; BARIN *et al.*, 2017; BELINELLO-SOUZA *et al.*, 2017; THEODORO *et al.*, 2017; ZAMBRANO *et al.*, 2018; IVANAGA *et al.*, 2019; PERON *et al.*, 2019).

Outro método alternativo para o tratamento é a busca por substâncias, com efeito, antibiofilme e a curcumina, composto fenólico extraído do rizoma da *Curcuma longa*, por suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, cicatrizante e imunomoduladora, tornou-se favorável para essa finalidade terapêutica (ZAMBRANO *et al.*, 2018; DE ALMEIDA BRANDÃO *et al.*, 2019). Além de seus efeitos diretos, a curcumina também pode ser usada como fotossensibilizador (FS) para a TFDa, com um pico de absorção na faixa de 300 a 500nm (máximo em 430-435nm), tornando-o compatível com a luz azul, mais especificamente com diodo emissor de luz (LED) (NAJAFI *et al.*, 2016; THEODORO *et al.*, 2017; SAITAWWEE *et al.*, 2017; POURHAJIBAGHER *et al.*, 2018).

Para avaliar a eficácia dos métodos terapêuticos, a microtomografia computadorizada (micro CT) tem se mostrado um método fidedigno, em função do alto poder de resolução e por possibilitar uma imagem tridimensional (WANG *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2017).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da TFDa com curcumina a 2% na reabsorção óssea periodontal em ratos diabéticos, por meio da micro CT, com o intuito de subsidiar estratégias terapêuticas para essa condição patológica.

Materiais e métodos

No presente estudo experimental pré-clínico *in vivo*, foram utilizados 80 ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*), com 2 a 3 meses de idade e pesando aproximadamente 250 a 350g, provenientes do Biotério da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco). Estes animais foram acondicionados no Biotério da UNIFACISA e mantidos em gaiolas plásticas durante o experimento, com no máximo cinco animais, separados de acordo com os grupos e períodos de tratamentos, sob um regime de 12/12h de ciclo dia/noite e recebendo ração padrão (Supralab, São Leopoldo, Brasil) e água *ad libitum*. Foram incluídos no estudo os animais que

se apresentaram em condições saudáveis e aptos a se submeterem aos procedimentos operatórios.

Aspectos Éticos

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED) de Campina Grande/PB e aprovado sob o nº 008014122018 (ANEXO A). Todo o experimento seguiu os preceitos da Lei nº 11.794 de 88 de outubro de 2008, no Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Indução da diabetes

Antes da indução da diabetes tipo I, os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas para dieta sólida. O método utilizado foi a indução química por meio da aplicação intraperitoneal de uma única dose de 50mg/kg de estreptozotocina (Cayman[®], Ann Arbor, USA) dissolvida em solução de tampão citrato na concentração de 0,1M mg/mL e na proporção de 1mL/kg com pH de 4,5. Após 2 horas do procedimento, os animais receberam alimento sólido e líquido normalmente, sendo mantidos no biotério com acompanhamento diário da evolução do quadro clínico.

A glicemia foi verificada com a retirada de sangue da veia caudal no dia da indução da diabetes, para descartar a possibilidade de diabetes pré-existent, três dias depois para a confirmação da efetividade do procedimento e nos dias de tratamento e da eutanásia com o uso do glicosímetro (*On Call Plus*[®], San Diego, Estados Unidos). Os animais que apresentaram em todas as etapas alteração no índice glicêmico (glicemia \geq 250mg/dL) foram selecionados para o grupo com diabetes e os demais foram excluídos.

Indução da periodontite

Antes da indução da periodontite pelo método da ligadura, os animais foram pesados em uma balança analítica (Shimadzu[®], São Paulo, Brasil) para o cálculo da correta dosagem do anestésico geral a ser administrado. Foi utilizada uma associação anestésica de 70mg/kg de cetamina (Dopalen[®], São Paulo, Brasil) e 6mg/kg de xilazina (Anasedan[®], São Paulo, Brasil). Constatado o plano anestésico profundo, os animais foram posicionados em um aparato

previamente confeccionados para que os maxilares fossem mantidos abertos por meio de bandas elásticas presas aos incisivos e facilitando o acesso aos dentes posteriores da mandíbula.

Um sonda exploradora de Odontopediatria foi introduzida entre o primeiro e segundo molar inferior para obtenção de um espaço entre os dentes e, em seguida, com a ajuda de um porta-agulha um fio de sutura de seda 3-0 (Procare[®], Rio de Janeiro, Brasil) que foi introduzido na posição subgingival do primeiro molar e mantido através de dois nós cirúrgicos simples voltados para mesial, por 7 dias. Não foram administrados anti-inflamatórios nem antibióticos para não influenciar o resultado do estudo.

Tratamentos

Após o período de indução das condições patológicas, os animais foram divididos em dois grupos: normoglicêmicos (NG) e diabéticos (DM) e subdivididos de acordo com o tratamento ao qual foi submetido.

Quadro 1. Descrição dos grupos de tratamento

GRUPO	SUBGRUPO POR TRATAMENTO	DESCRIÇÃO
NG (n=40)	GI - TPNC (n=10)	Sem diabetes + terapia periodontal não cirúrgica.
	GII - CURC (n=10)	Sem diabetes + terapia periodontal não cirúrgica + aplicação do gel de curcumina 2%.
	GIII - LED (n=10)	Sem diabetes + terapia periodontal não cirúrgica + irradiação com LED.
	GIV - TFD (n=10)	Sem diabetes + terapia periodontal não cirúrgica + aplicação do gel de curcumina 2% + irradiação com LED.
DM (n=40)	GI - TPNC (n=10)	Com diabetes + terapia periodontal não cirúrgica.
	GII - CURC (n=10)	Com diabetes + terapia periodontal não cirúrgica + aplicação do gel de curcumina 2%.
	GIII - LED (n=10)	Com diabetes + terapia periodontal não cirúrgica + irradiação com LED.
	GIV - TFD (n=10)	Com diabetes + terapia periodontal não cirúrgica + aplicação do gel de curcumina 2% + irradiação com LED.

Grupo I: Terapia periodontal não cirúrgica (GI-TPNC)

Após o período de indução da condição patológica, os fios foram removidos e os animais submetidos a procedimentos de RACR com cureta de Gracey mini-five 5-6 (Trinity[®], São Paulo, Brasil) ao redor de todo o dente, por meio de 10 movimentos de tração distal-mesial nos sítios vestibular e lingual e com movimentos de tração cérvico-olcusais nas áreas de furca e interproximal, de forma que todo depósito de biofilme e/ou cálculo fosse removido.

Grupo 2: Terapia periodontal não cirúrgica + gel de curcumina a 2% (GII-CURC)

Após o período de indução da condição patológica, os fios foram removidos e os animais submetidos a procedimentos de RACR e, em seguida, o gel de curcumina foi inserido

lentamente no interior do sulco gengival, na face vestibular e lingual dos primeiros molares inferiores, utilizando uma seringa com a ponta direcionada para o interior da bolsa periodontal sendo mantido por 5 minutos, com duas trocas, sem qualquer iluminação artificial direta.

O gel de curcumina foi formulado no Laboratório Dilecta (João Pessoa, Paraíba, Brasil), conforme preconizado por Hosadurga *et al.*, 2014. Inicialmente foi preparado um gel de carbopol 2% que consistiu no aquecimento de nipagin (0,18%) em água purificada. Após seu resfriamento, houve a dispersão do carbopol em água, passando por uma hidratação de 4 horas. Em seguida, essa mistura foi levada ao agitador magnético para homogeneização. Foi adicionada a trietanolamina (1,7%) até atingir o pH 6,0 e acrescentado o propilenoglicol (25%). Por fim, a *Curcuma Longa* 2% (Valdequímica[®], São Paulo, Brasil) foi incorporado ao gel de carbopol q.s.p 50g, homogeneizado e verificado o pH final de 5,8, coloração laranja e consistência conforme.

Grupo 3: Terapia periodontal não cirúrgica + irradiação com LED (GIII-LED)

Após o período de indução da condição patológica, os fios foram removidos e os animais submetidos a procedimentos de RACR e, em seguida, à irradiação com LED azul (KaVo Poly 600[®]), com comprimento de onda de 450-460nm, potência radiada máxima 400-600mW/cm², potência mínima 3,3W, durante 60 segundos, com irradiação localizada e em contato com a área, no modo contínuo

Grupo 4: Terapia periodontal não cirúrgica + gel de curcumina a 2% + irradiação com LED (GIV-TFDa)

Após o período de indução da condição patológica, os fios foram removidos e os animais submetidos a procedimentos de RACR e, em seguida, a aplicação do gel de curcumina (conforme GII-CUR). Decorrido o tempo de pré-irradiação, o excesso de gel foi removido com o auxílio de um algodão estéril e logo após a região foi irradiada com LED (conforme parâmetros mencionado no GIII-LED).

Eutanásia

Ao final do experimento, 5 animais de cada grupo foram sacrificados aos 7 e 14 dias, via dose letal de isoflurano (Cristália[®], São Paulo, Brasil). As hemi-mandíbulas foram

removidas e fixadas em formaldeído a 10% tamponado para posteriormente serem submetidas à análise de microtomografia computadorizada.

Análise por microtomografia computadorizada (micro CT)

Após a eutanásia, a hemi-mandíbula foi submetida ao escaneamento em microtomografia computadorizada (micro CT) e posteriormente analisadas no Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica da Universidade Federal da Paraíba. As amostras de hemi-mandíbula foram escaneadas no aparelho SkyScan 1172 (Bruker, Kontich, Bélgica) em três planos espaciais padronizados com um tamanho de voxel isotrópico de 9 μm , 60 kV, 165 μA , em 180°, ângulo de rotação de 0,4, com um tempo de exposição de 0,5 segundos e utilizando um filtro de alumínio de 0,5mm. Em seguida, todas as imagens foram salvas em cortes sagitais e reconstruídas com o auxílio de um software específico NRecon (Bruker micro CT).

As medidas lineares foram produzidas por meio do software DataViewer® (Bruker micro CT), utilizando como marco anatômico a junção cimento-esmalte (JCE), as cristas ósseas (CO) de cada face, onde é possível a visualização de três eixos (sagital, coronal e transaxial) para mensuração na face vestibular (da JCE para a CO vestibular), na face lingual (da JCE para a CO lingual), na interproximal (do ponto de contato para a CO interproximal) e na região de furca (do teto da furca para a CO interradicular).

As medições volumétricas foram realizadas utilizando um programa específico de análise 3D (CTAn), após a seleção de uma região de interesse (ROI) (coronal), delimitada a partir da raiz mesial do primeiro molar até a raiz mesial do segundo molar, servindo como bordas de ponto final, pois a doença periodontal experimental e a máxima perda óssea foram evidentes no primeiro molar, na região de furca e na área interproximal entre o primeiro e segundo molar.

Após a delimitação dessas referências e com desenho da ROI, guiado por pontos de referência morfológicos, os contornos foram traçados em intervalos regulares com um método baseado em fatias, a cada 10 planos, estabelecendo-se 100 cortes para análise. Todos os contornos foram traçados começando imediatamente abaixo da JCE e deslocando-se 1,5mm na direção apical. Assim, toda a área óssea da região interproximal e a área de furca do primeiro molar foi envolvida pela ROI.

Após a interpolação das ROIs (coronal, sagital e transaxial), unidos em uma só estrutura, foi realizado o processamento da imagem e, por fim, a geração dos dados volumétricos, através do aplicativo CTAn® com selecionamento prévio dos parâmetros de

interesse, para a posterior confecção das imagens em 3D da área de interesse, bem como da área total da amostra, com a utilização do aplicativo CTVox®.

Dentre os parâmetros investigados estão: o volume ósseo (VO), volume tecidual (VT) e a relação entre eles (VO/VT), além da área de superfície óssea (SO) e sua relação com o volume tecidual (SO/VT) e análise trabecular quanto à espessura (ESP.TRB), número (NUM.TRB) e separação trabecular (SEP.TRB).

Análise Estatística

Os dados obtidos foram organizados em um banco de planilha *Excell* e posteriormente transferidos para o programa *IBM SPSS Statistics* (versão 25.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA), para realização das análises estatísticas. Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão dos grupos experimentais em cada período, para os parâmetros lineares e volumétricos, considerando cada hemi-mandíbula como uma unidade experimental. Os dados foram analisados intragrupo considerando os diferentes ponto de tempos e intergrupo, a cada intervalo de tempo.

Para a seleção dos testes estatísticos, foram realizados testes de homogeneidade e homocedasticidade, através do Teste Z ($p < 1,96$). Os testes paramétricos, análise de variância (ANOVA *Two Way*) e pos-hoc de Bonferroni, foram utilizados para a avaliação intergrupo de perda óssea e microarquitetura óssea. O teste t para as amostras independentes foi realizado para obter a avaliação intragrupo nos tempos experimentais de 7 e 14 dias. Para todas as análises estatísticas, foi adotado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Os resultados das medidas de perda óssea linear nos animais normoglicêmicos, por meio da análise de variância, evidenciaram que não houve diferença entre os tratamentos com 7 e 14 dias ($p > 0,05$). Aos 14 dias, todos os grupos apresentaram diminuição na perda óssea na região de furca, com exceção do GI-TPNC (481,64 para 807,00) e, em contrapartida, aumento na perda óssea interproximal, com exceção do GIV-TFD (2.119,60 para 1.760,46), embora sem diferença estatística. Na análise intragrupo, o GII-CURC apresentou menor perda óssea na região de furca com 14 dias de tratamento (795,74), com diferença significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo com 7 dias de tratamento (1.357,68) (Tabela 1).

Na comparação dos tratamentos com relação aos parâmetros volumétricos em animais normoglicêmicos (Tabela 3), observou-se que os valores menos favoráveis à remodelação óssea foram registrados no GIV-TFD, com diferença significativa para o volume tecidual (VT), o volume ósseo (VO), a área de superfície óssea (SO) e a espessura trabecular (ESP.TRB) quando comparados aos grupos GI-TPNC e GII-CURC ($p < 0,05$) e na relação entre o volume ósseo e o volume tecidual (VO/VT) em comparação ao GI-TPNC ($p < 0,05$). Na análise intragrupo, houve aumento nas medidas em todos os grupos aos 14 dias em comparação com 7 dias de tratamento para as medidas de volume ósseo (VO), relação entre volume ósseo e volume tecidual (VO/VT), área de superfície óssea (SO), a relação entre a área de superfície óssea e o volume tecidual (SO/VT) e o número de trabéculas (NUM.TRB). Houve diferença estatisticamente significativa apenas para GII-CURC que apresentou menor volume tecidual (VT) aos 14 dias (0,87) quando comparado aos 7 dias (1,69), entretanto, apresentou aumento no número trabecular (NUM.TRB) (1,68 para 4,16) e diminuição na separação trabecular (SEP.TRB) com 14 dias de tratamento (0,25), quando comparado aos 7 dias de tratamento (0,59) ($p < 0,05$).

Os resultados das medidas de perda óssea linear nos animais diabéticos, por meio da análise de variância, evidenciaram que não houve diferença entre os tratamentos com 7 e 14 dias ($p > 0,05$). Aos 7 dias, as menores medidas de perda óssea foram registradas no GIV-TFD, com exceção da face vestibular. A maior perda na região de furca foi para o GI-TPNC (919,66) e na interproximal foi para o GII-CURC (1.953,42), sem diferença estatisticamente significativa. Aos 14 dias, todos os parâmetros de perda óssea aumentaram para GII-CURC e GIV-TFD, mas com diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para o GII-CURC com relação à face vestibular (1.487,22) em comparação com 7 dias (788,70), na análise intragrupo. Nesse período de 14 dias, houve aumento da perda óssea na região interproximal para todos os grupos e para a região de furca, exceto o GI-TPNC que apresentou redução (919,66 para 508,42), mas sem relevância em termos estatísticos (Tabela 2).

Na comparação dos tratamentos com relação aos parâmetros volumétricos em animais diabéticos, não houve diferença entre os tratamentos com 7 e 14 dias ($p > 0,05$). Na análise intergrupo de 7 dias, os piores resultados para a reparação óssea foram para o GIII-LED, enquanto o GII-CURC apresentou os melhores resultados, exceto para o volume tecidual (VT). Em contrapartida, aos 14 dias, o GIII-LED apresentou os melhores resultados, exceto para a relação entre volume ósseo e tecidual (VO/VT) e a área de superfície óssea e volume tecidual (SO/VT) e o GII-CURC, nesse mesmo período, não apresentou bons resultados em termos de remodelação da arquitetura óssea periodontal, mas com diferença significativa para

a espessura trabecular (ESP.TRB) (0,09 para 0,06). Apresentaram diferenças significativas na análise intragrupo, os grupos GIII-LED e GIV-TFD com relação ao aumento na área de superfície óssea (SO) (2,17 para 10,84 e 3,97 para 8,66, respectivamente) e na espessura trabecular (ESP.TRB) (0,07 para 0,11 e 0,08 para 0,11, respectivamente) aos 14 dias quando comparado aos 7 dias de tratamento ($p < 0,05$), mas com aumento em todos os parâmetros favoráveis à remodelação, inclusive no GI-TPNC (Tabela 4).

Na comparação entre os diabéticos e normoglicêmicos, com relação às medidas lineares aos 7 dias, verificou-se que os normoglicêmicos do GII-CURC e GIV-TFD apresentaram maior perda óssea nas regiões de furca ($p = 0,007$ e $p = 0,04$, respectivamente) e interproximal ($p = 0,05$ e $p = 0,02$, respectivamente) em relação aos diabéticos. Não foram observadas diferenças estatísticas nos grupos GI-TPNC e GIII-LED ($p > 0,05$), assim como na comparação intergrupos (Tabela 5). Aos 14 dias, a análise comparativa revelou diferença significativa ($p = 0,009$) com maior perda óssea na região de interproximal para o GII-CURC dos diabéticos (2.105,48) em comparação aos normoglicêmicos (1.528,10) (Tabela 6).

Na tabela 7, na comparação entre normoglicêmicos e diabéticos aos 7 dias com relação às medidas volumétricas, observou-se com diferença estatística que GI-TPNC ($p = 0,03$) e GII-CURC ($p = 0,001$) apresentaram maior volume tecidual (VT) em animais normoglicêmicos. No GII-CURC, verificou-se maior percentual na relação VO/VT ($p = 0,03$), na relação SO/VT ($p = 0,01$) e número trabecular (NUM.TRB) ($p = 0,01$) em ratos diabéticos, embora nesse grupo, a maior separação trabecular (SEP.TRB) ($p = 0,001$) foi em ratos normoglicêmicos.

Nessa mesma comparação aos 14 dias (Tabela 8) foi possível observar que o GI-TPNC apresentou maior volume tecidual (VT) em ratos normoglicêmicos ($p = 0,04$). Já o GII-CURC apresentou maior volume ósseo (VO) ($p = 0,03$) e maior espessura trabecular (ESP.TRB) em normoglicêmicos ($p = 0,003$). Porém, no GIV-TFD, a espessura trabecular (ESP.TRB) foi maior em diabéticos ($p = 0,02$).

Discussão

O tratamento mais difundido para a periodontite envolve a terapia periodontal não cirúrgica com remoção física/mecânica do biofilme por meio da raspagem e alisamento corono-radicular com o uso de instrumentos manuais ou ultrassônicos, podendo estar associado ao uso de agentes antimicrobianos. Clinicamente, é difícil determinar a eficácia desse procedimento, especialmente onde houve grande perda de tecido, com bolsas periodontais profundas e em regiões de furca e é provável que pequenas quantidades de

bactérias sejam mantidas, com efeito significativo de degradação contínua do tecido (Pal *et al.*, 2019). Esse estudo parte do princípio de que o tratamento mecânico continua sendo padrão-ouro e por isso é utilizado como grupo controle e as demais terapias complementares foram introduzidas com o intuito de avaliar os benefícios adicionais.

Por essas razões, a comunidade científica busca um método alternativo e/ou adjuvante que seja ideal para remover as bactérias periodontais, sem efeitos colaterais negativos indesejados (De Oliveira *et al.*, 2016; Pillusky *et al.*, 2017). Nesse sentido, diversas modalidades de tratamento têm sido propostas como monoterapia ou em associação ao tratamento convencional, a exemplo da antibioticoterapia, fototerapia/fotobiomodulação, fitoterapia e terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). Na presente pesquisa, foi feita um comparativo dessas modalidades terapêuticas, sempre em associação ao tratamento mecânico e essas terapias isoladas ou associadas, como é o caso da terapia fotodinâmica.

Pesquisas mais recente avaliaram e comprovaram a eficácia da TFDa, tanto em animais (De Oliveira *et al.*, 2016; Gualberto *et al.*, 2016; Pillusky *et al.*, 2017; Theodoro *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2018; Filipini *et al.*, 2019; Longo *et al.*, 2019; Macedo *et al.*, 2019) quanto em humanos (Martins *et al.*, 2016; Cadore *et al.*, 2019; Ivanaga *et al.*, 2019; Anselmo *et al.*, 2020; Derikvand *et al.*, 2020; Niazi *et al.*, 2020) e sugerem seu uso como adjuvante à terapia mecânica no tratamento da periodontite. No presente experimento, optou-se pelo uso de animais em virtude do baixo custo e por ser considerado uma opção de avaliação da eficácia de modalidade de tratamento.

Com relação aos resultados promissores da TFDa, os estudos mais atualizados mencionam seus efeitos na redução da viabilidade microbiana (Najafi *et al.*, 2016; Theodoro *et al.*, 2016; Pourhajibagher *et al.*, 2018; Saitawwee *et al.*, 2018; Longo *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Kumbar *et al.*, 2020) do processo inflamatório (Garcia *et al.*, 2014; Bakir *et al.*, 2016; De Oliveira *et al.*, 2016; Gualberto *et al.*, 2016; Elburki *et al.*, 2017; Theodoro *et al.*, 2017; Filipini *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019) e da reabsorção óssea (Garcia *et al.*, 2014; De Oliveira *et al.*, 2016; Gualberto *et al.*, 2016; Belinello-Souza *et al.*, 2017; Theodoro *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2018; Longo *et al.*, 2019; Filipini *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Com o uso do fotossensibilizador (curcumina) e da fonte de luz utilizada (LED azul) na pesquisa em questão, pretendia-se uma redução microbiana, anti-inflamatória, antioxidante, assim como uma redução na reabsorção óssea.

Peron *et al.* (2019) por meio de uma revisão sistemática abordando o assunto da erradicação de microrganismos com a TFDa, afirmam que, embora os resultados sugiram ação antimicrobiana, principalmente em bactérias na fase planctônica, a falta de uniformidade

nos protocolos leva a considerar que a eficácia bactericida contra periodontopatógenos permanece obscura. Além do que, na análise da eficácia dessa terapia em alguns estudos experimentais, algumas condições sistêmicas também podem estar associadas a exemplo dos estudos que avaliaram animais sob efeito da nicotina (Gualberto *et al.*, 2016; Garcia *et al.*, 2018), submetidos à quimioterapia (Theodoro *et al.*, 2017; Longo *et al.*, 2019) à ovariectomia/deficiência de estrogênio (Garcia *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2018) e diabetes (Almeida *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2013; Elburki *et al.*, 2017; Filipini *et al.*, 2019; Pimentel *et al.*, 2020). Em virtude de algumas lacunas de estudos anteriores e com a impossibilidade de afirmar algum benefício adicional, esses questionamentos levaram ao desenvolvimento do trabalho em questão, envolvendo também um comprometimento sistêmico, no caso a diabetes.

Alguns trabalhos mostraram que a TFDa forneceu estímulo positivo para a reparação óssea representado pela menor imunomarcção de RANKL ou da menor relação RANKL/OPG (Garcia *et al.*, 2014; De Oliveira *et al.*, 2016; Gualberto *et al.*, 2016; Theodoro *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2018; Longo *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019) e menor número de células positivas para TRAP (Garcia *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2016; Theodoro *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2018). Ao contrário da análise realizada por esses estudos que buscam um entendimento da dinâmica de reparo ósseo, o presente estudo buscou uma análise da microarquitetura óssea, tanto em termos lineares quanto volumétricos.

Alberton Nuernberg *et al.* (2019) realizaram uma revisão sistemática com metanálise utilizando apenas estudo com animais para avaliar a influência da TFDa como adjuvante da RACR na perda óssea alveolar em DP, com ou sem envolvimento sistêmico, e descobriram que, em geral, demonstraram eficácia, embora com divergência de protocolos. Enquanto que as revisões sistemáticas, envolvendo ensaios clínicos, de Akram *et al.* (2016) e Pal *et al.* (2019) comparando a eficácia da TFDa como adjuvante ou apenas o tratamento mecânico isolado ou comparando a TFDa e os os antibióticos sistêmicos associados à TPNC, respectivamente, ao final ambos não puderam fazer nenhuma inferência sobre a melhora no resultado clínico. Sabe-se que as revisões sistemáticas apresentam as maiores evidências e, mesmo assim, as mencionadas anteriormente não trazem nenhuma elucidação quanto à superioridade dos tratamentos propostos o que também pode ser evidenciado pela diversidade de parâmetros utilizados nos estudos, o que dificulta uma comparação direta.

Com relação aos protocolos, grande parte dos estudos mais recentes em animais realiza apenas uma sessão da TFDa (Gualberto *et al.*, 2016; Theodoro *et al.*, 2016; Barin *et al.*, 2017; Pillusky *et al.*, 2017; Theodoro *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2018; Filipini *et al.*, 2019;

Zhang *et al.*, 2019). Os trabalhos de Garcia *et al.* (2013) e Longo *et al.* (2019) comparam a eficácia da TFDa em sessão única e múltipla e essa questão ainda é controversa. Em virtude das limitações impostas pelo experimento e da divergência quanto aos benefícios com relação ao aumento do número de sessões, optou-se, nessa pesquisa, por fazer apenas uma única intervenção.

Outros fatores também podem interferir na eficácia da TFDa como o FS, sua concentração e tempo de pré-irradiação, a fonte de luz e os parâmetros de irradiação (Ivanaga *et al.*, 2019). A luz terapêutica corresponde a uma pequena parcela da radiação eletromagnética total com comprimentos de onda do visível ao infravermelho, de 300 a 1100 nm (Peron *et al.*, 2019). A maioria dos trabalhos em animais utilizaram laser (Gualberto *et al.*, 2016; Theodoro *et al.*, 2016; Barin *et al.*, 2017; Pillusky *et al.*, 2017; Theodoro *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2018; Filipini *et al.*, 2019; Longo *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019) e outros LED (Carvalho *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2013; De Oliveira *et al.*, 2016; Belinello-Souza *et al.*, 2017; Theodoro *et al.*, 2017; Macedo *et al.*, 2019), em associação ao tratamento mecânico convencional atuando como terapia de fotobiomodulação (De Oliveira *et al.*, 2016; Gualberto *et al.*, 2016; Theodoro *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2018) ou como TFDa (De Oliveira *et al.*, 2016; Gualberto *et al.*, 2016; Barin *et al.*, 2017; Pillusky *et al.*, 2017; Theodoro *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2018; Filipini *et al.*, 2019; Longo *et al.*, 2019) ou ainda como monoterapia (Carvalho *et al.*, 2011; De Oliveira *et al.*, 2016; Theodoro *et al.*, 2016; Belinello-Souza *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019; Macedo *et al.*, 2019). Na realização dessa pesquisa, optou-se pelo uso da curcumina, em função das suas propriedades e, em virtude dessa escolha, utilizou-se a luz LED azul por corresponder ao comprimento de onda que é mais bem absorvido por esse fotossensibilizador.

Cada comprimento de onda irá determinar a cor da fonte luminosa e seu efeito biológico. A luz azul (LED λ 405nm), por exemplo, na dose bactericida pode atuar com eficácia e segurança na desinfecção oral e seu uso ainda é limitado como tratamento periodontal de suporte (GIANNELLI, LASAGNI, BANI, 2019).

É pertinente mencionar que a terapia LED oferece efeitos fotobiomoduladores o que pode ser benéfico para o processo de reparo do tecido, por mecanismos celulares que contribuem na cicatrização e com ação anti-inflamatórias. Para tanto, acredita-se que existe uma “resposta à dose bifásica” para que haja o efeito desejado e, quando a dose excede o valor ideal, desencadeia um efeito oposto (HAMBLIN *et al.*, 2017; IVANAGA *et al.*, 2019).

No estudo de Chang *et al.* (2013) a emissão dos LEDs (λ 600nm e 10 J/cm²) associada à terapia convencional para tratamento da periodontite em ratos foi eficaz na

redução da inflamação, na proliferação de fibroblastos e nova formação óssea, da mesma forma que Theodoro *et al.* (2017) (λ 465-485nm e 15 J/cm²) e Macedo *et al.* (2019) (λ 590nm e 34,10 J/cm²) também observaram biomodulação do reparo ósseo após um período agudo de infecção, mesmo sem associação com a terapia mecânica. Em contrapartida, o estudo de Carvalho *et al.* (2011) usando o LED (λ 440–480 nm) não reduziu significativamente a perda óssea alveolar quando usado como um tratamento adjuvante ao tratamento convencional. Na presente pesquisa, nos animais diabéticos o uso do LED em associação à TPNC com o passar do tempo apresentou um ganho em termos de remodelação óssea o que pode sugerir seu efeito fotobiomodulador.

Dentre os fotossensibilizadores, os mais utilizados são os fenotiazínicos a exemplo do azul de metileno (Garcia *et al.*, 2014; Barin *et al.*, 2017; Pillusky *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2019; Filipini *et al.*, 2019; Longo *et al.*, 2019) e o azul de toluidina (Garcia *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2014; Theodoro *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019). No entanto, novos fotossensibilizadores têm surgido como a hipericina-glucamina (Macedo *et al.*, 2019), eritrosina (De Oliveira *et al.*, 2016), protoporfirina (Belinello-Souza *et al.*, 2017) e curcumina (Gu *et al.*, 2013; Elburki *et al.*, 2014; Elburki *et al.*, 2017; Theodoro *et al.*, 2017; Curylofo-Zotti *et al.*, 2018; Zambrano *et al.*, 2018; Ivanaga *et al.*, 2019; Guimaraes-Stabili *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

Como FS, a curcumina foi avaliada em alguns estudos, seja na forma natural (Bakir *et al.*, 2016; Theodoro *et al.*, 2017; Guimarães-Stabili *et al.*, 2019, Pimentel *et al.*, 2020), modificada quimicamente (Gu *et al.*, 2013; Elburki *et al.*, 2014; Elburki *et al.*, 2017; Curylofo-Zotti *et al.*, 2018; De Almeida Brandão *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019) ou ainda comparando ambas (Gu *et al.*, 2013; Curylofo-Zotti *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019); nas formulações de solução, seja diluída em etanol ou DMSO (Bakir *et al.*, 2016; Theodoro *et al.*, 2017; Guimarães-Stabili *et al.*, 2019) ou formulações de veículos alternativos como gel (Hosadurga *et al.*, 2014), micelas poliméricas, nanopartículas (Zambrano *et al.*, 2018), seja por administração oral (Bakir *et al.*, 2016; Elburki *et al.*, 2014; Curylofo-Zotti *et al.*, 2018; Guimarães-Stabili *et al.*, 2019) ou sistêmica (Guimarães *et al.*, 2011). No experimento em questão, foi utilizada a curcumina na formulação em gel com o intuito de aumentar sua biodisponibilidade e facilitar sua permanência no sulco gengival uma vez que na cavidade oral tem a presença de diversos fluidos como sangue, saliva e fluido crevicular que tendem a diluir o produto e diminuir sua eficácia.

Alguns grupos de pesquisa relataram que a administração de curcumina, seja oral ou sistêmica, isolada ou associada à luz, inibia os fatores de sinalização associados ao processo

inflamatório, como interleucinas (Guimarães *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013; Elburki *et al.*, 2014; Elburki *et al.*, 2017; Theodoro *et al.*, 2017; De Almeida Brandão *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Pimentel *et al.*, 2020), MMPs (Gu *et al.*, 2013; Elburki *et al.*, 2014; Elburki *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019), TNF- α (Guimarães *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013; Elburki *et al.*, 2017; De Almeida Brandão *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Pimentel *et al.*, 2020), MAPKs (Elburki *et al.*, 2017; Zambrano *et al.*, 2018), TRAP (Theodoro *et al.*, 2017; Curylofo-Zotti *et al.*, 2018) e à inativação de NF- κ B (Guimarães *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2013; Elburki *et al.*, 2017; Zambrano *et al.*, 2018; Guimarães-Stabili *et al.*, 2019) e, conseqüentemente, suprime a expressão de RANKL/RANK/OPG (Zhou *et al.*, 2013; Theodoro *et al.*, 2017; Pimentel *et al.*, 2020), inibindo assim a perda óssea durante a periodontite experimental (Elburki *et al.*, 2014; Bakir *et al.*, 2016; Zambrano *et al.*, 2018; Guimarães-Stabili *et al.*, 2019). Em contraste, Guimarães *et al.* (2011) com administração oral e Hosadurga *et al.* (2014) com aplicação tópica em gel relataram que a reabsorção óssea não foi significativamente diferente entre os grupos testados e não tratados com curcumina. Curylofo-Zotti *et al.* (2018) e Wang *et al.* (2019) comparando curcumina natural e modificada (CMC 2.24), verificaram que ambas diminuíram a resposta inflamatória local, mas apenas a curcumina quimicamente modificada atenuou a reabsorção óssea. Acredita-se que a curcumina isolada já apresente uma determinada resposta satisfatória na doença periodontal e que suas ações benéficas podem ser potencializadas com a associação com a luz na terapia fotodinâmica.

Por suas propriedades anti-inflamatórias, anti-reabsortiva, imunomoduladora e antioxidantes, a curcumina tem sido considerada como uma opção terapêutica promissora para periodontite associada com alterações sistêmicas, a exemplo da diabetes, de modo isolado (Gu *et al.*, 2013; Elburki *et al.*, 2017, Ivanaga *et al.*, 2019) ou associado à luz na TFDa (De Almeida *et al.*, 2018; Evangelista *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2018; Filipini *et al.*, 2019; Mirza *et al.*, 2019; Elsadek *et al.*, 2020).

Está bem estabelecido que o diabetes seja um fator modificador importante de periodontite, uma vez que a hiperglicemia crônica promove o aumento do nível de AGEs, que podem interagir com seus receptores RAGEs, alterando a função celular e aumentando os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Esses mecanismos podem prejudicar a reparação dos tecidos, interferindo com o equilíbrio da razão RANKL/OPG, aumentando a destruição óssea e diminuindo a diferenciação dos osteoblastos (Ivanaga *et al.*, 2019). Nessa perspectiva, Elburki *et al.* (2017) e Pimentel *et al.* (2020) analisando a inter-relação dessas duas condições patológicas em animais com curcumina quimicamente modificada e curcumina natural

associado à insulina, respectivamente, observaram redução da perda óssea alveolar, modulando favoravelmente a resposta osteoinflamatória do hospedeiro. Essa pesquisa também buscou avaliar a inter-relação entre a diabetes e periodontite com relação à perda óssea alveolar com curcumina natural na formulação em gel na concentração 2% isolada ou em associação com uma fonte de luz.

Vários métodos estão disponíveis para avaliar a evolução da doença periodontal incluindo o uso da imuno-histoquímica para avaliar marcadores, em destaque para RANKL/OPG e/ou TRAP, que determinam o mecanismo de ação da reabsorção ou neoformação óssea (Zhou *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2014; De Oliveira *et al.*, 2016; Gualberto *et al.*, 2016; Theodoro *et al.*, 2017; De Almeida Brandão *et al.*, 2019; Longo *et al.*, 2019; Macedo *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019), enquanto outros realizaram análise histomorfológica (De Almeida *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013; Gualberto *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2017) ou histomorfométrica (De Almeida *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2014; Elburki *et al.*, 2014; Bakir *et al.*, 2016; De Oliveira *et al.*, 2016; Gualberto *et al.*, 2016; Barin *et al.*, 2017; Theodoro *et al.*, 2017; Longo *et al.*, 2019; Macedo *et al.*, 2019) ou mesmo radiográficas (De Almeida *et al.*, 2007; Elburki *et al.*, 2017) para medição da perda óssea alveolar.

Atualmente, as técnicas tridimensionais são amplamente aplicadas na prática odontológica, a exemplo da microtomografia computadorizada (Elburki *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017; Curylofo-Zotti *et al.*, 2018; Zambrano *et al.*, 2018; De Almeida Brandão *et al.*, 2019; Guimarães-Stabili *et al.*, 2019; Macedo *et al.* (2019).

No estudo de Park *et al.* (2017), comparando a histologia e dois métodos 3D (micro CT e TCO) como auxiliares de diagnóstico, os autores concluíram que TCO foi capaz de gerar imagens de alta resolução, mas alguns detalhes não eram visíveis em virtude da baixa penetração, só sendo possível evidenciar alguns marcos anatômicos pela micro CT. Essa visualização detalhada de tecidos biológicos com técnicas não invasivas e *in vivo* permite a detecção precoce da doença periodontal ativa ou a identificação de fatores causais, antes mesmo que ocorra a perda óssea alveolar significativa, assim como servem de registro permanente para futuras comparações com informações valiosas para diagnóstico e manutenção da terapia periodontal. Por ser considerada uma técnica destinada a estudos experimentais, nesse trabalho com animais, definiu-se seu uso por se tratar de uma técnica não-invasiva e tridimensional que mantém a amostra intacta para futuras análises.

Dos estudos que abordaram a análise por micro CT, Elburki *et al.* (2014), Curylofo-Zotti *et al.* (2018), Zambrano *et al.* (2018), De Almeida Brandão *et al.* (2019); Guimarães-

Stabili *et al.* (2019) o uso da curcumina, em destaque para a modifica quimicamente ou nanoparticulada, sem a associação com LED, proporcionou uma diminuição da inflamação e/ou da reabsorção óssea alveolar.

Os resultados da presente pesquisa, com relação à análise da reabsorção óssea por micro CT, sugerem que, em animais sem comprometimento sistêmico, as terapias complementares, com destaque para curcumina ou a TFDa, levam a um benefício adicional com o passar do tempo, como melhor reparo, menor infecção e inflamação tecidual especialmente em áreas de difícil acesso como na região de furca, como pôde ser observado com melhorias em alguns parâmetros aos 14 dias, no entanto, com reduzido ganho ósseo.

Em se tratando de animais diabéticos, os resultados sugerem um tratamento periodontal que seja iniciado com a curcumina ou TFDa, potencializando sua ação antimicrobiana e anti-inflamatória, tornando-se imprescindível um protocolo de manutenção periódica seja com associação de técnicas complementares ou com repetição de sessões de TFDa e ainda usando o LED atuando na fotobiomodulação, como forma de estagnar a perda óssea que tende a ser gradativa com o passar do tempo.

Considerando as limitações da pesquisa com relação ao tamanho amostral e ao próprio modelo experimental, sugere-se associar a compreensão da perda óssea da periodontite com o método imuno-histoquímico, assim como avaliação do componente inflamatório para melhor compreensão do mecanismo de ação das terapias propostas.

Agradecimentos

A parte experimental do estudo foi em parceria com o Biotério da UNIFACISA a quem reservamos agradecimento especial à Técnica Tatiana Carvalho Marques e à Médica Veterinária Tharcia Kiara Beserra de Oliveira.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesse

Referências

[1] Zambrano LMG, Brandao DA, Rocha FRG, Marsiglio RP, Longo IB, Primo FL, Tedesco AC, Guimaraes-Stabili MR, Rossa Junior C. Local administration of curcumin-loaded nanoparticles effectively inhibits inflammation and bone resorption associated with

- experimental periodontal disease. *Sci Rep.* 2018 Apr 27;8(1):6652. doi: 10.1038/s41598-018-24866-2. PMID: 29703905; PMCID: PMC5923426.
- [2] Filipini SMR, Campagnolo CB, Dutra DAM, Maciel RM, Danesi CC, Kantorski KZ. Adjunctive antimicrobial photodynamic therapy using methylene blue/ethanol formulation in experimental periodontitis in diabetic rats: short-term results. *Lasers Med Sci.* 2019 Aug;34(6):1253-1260. doi: 10.1007/s10103-019-02733-4. Epub 2019 Feb 8. PMID: 30737587.
- [3] Elburki MS, Moore DD, Terezakis NG, Zhang Y, Lee HM, Johnson F, Golub LM. A novel chemically modified curcumin reduces inflammation-mediated connective tissue breakdown in a rat model of diabetes: periodontal and systemic effects. *J Periodontal Res.* 2017 Apr;52(2):186-200. doi: 10.1111/jre.12381. Epub 2016 Apr 1. PMID: 27038334.
- [4] Park JY, Chung JH, Lee JS, Kim HJ, Choi SH, Jung UW. Comparisons of the diagnostic accuracies of optical coherence tomography, micro-computed tomography, and histology in periodontal disease: an *ex vivo* study. *J Periodontal Implant Sci.* 2017 Feb;47(1):30-40. doi: 10.5051/jpis.2017.47.1.30. Epub 2017 Feb 28. PMID: 28261522; PMCID: PMC5332333.
- [5] Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S1-S8. doi: 10.1002/JPER.18-0157. PMID: 29926946.
- [6] Ivanaga CA, Miessi DMJ, Nuernberg MAA, Claudio MM, Garcia VG, Theodoro LH. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with curcumin and LED, as an enhancement to scaling and root planing in the treatment of residual pockets in diabetic patients: A randomized and controlled split-mouth clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Sep;27:388-395. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.07.005. Epub 2019 Jul 10. PMID: 31301434.
- [7] Corlan Pușcu D, Ciuluvică RC, Anghel A, Mălăescu GD, Ciursaș AN, Popa GV, Agop Forna D, Busuioc CJ, Siloși I. Periodontal disease in diabetic patients - clinical and histopathological aspects. *Rom J Morphol Embryol.* 2016;57(4):1323-1329. PMID: 28174799.
- [8] Llambés F, Arias-Herrera S, Caffesse R. Relationship between diabetes and periodontal infection. *World J Diabetes.* 2015 Jul 10;6(7):927-35. doi: 10.4239/wjd.v6.i7.927. PMID: 26185600; PMCID: PMC4499526.
- [9] de Oliveira PG, Silveira E Souza AM, Novaes AB Jr, Taba M Jr, Messoria MR, Palioto DB, Grisi MF, Tedesco AC, de Souza SL. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy in induced periodontal disease. Animal study with histomorphometrical,

- immunohistochemical, and cytokine evaluation. *Lasers Med Sci.* 2016 Sep;31(7):1275-83. doi: 10.1007/s10103-016-1960-5. Epub 2016 Jun 28. PMID: 27351664.
- [10] Barin LM, Barcelos RCS, Vey LT, Pillusky FM, Palma VM, Kantorski KZ, Bürger ME, Maciel RM, Danesi CC. Role of the adjunctive antimicrobial photodynamic therapy to periodontal treatment at plasmatic oxidative stress and vascular behavior. *J Photochem Photobiol B.* 2017 Aug;173:538-544. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.06.039. Epub 2017 Jun 28. PMID: 28692925.
- [11] Belinello-Souza EL, Alvarenga LH, Lima-Leal C, Almeida P, Leite CG, Lima TR, Godoy-Miranda B, Previati-Oliveira J, de Pretto L, de Freitas AZ, Fernandes AU, Labat Marcos R, Prates RA. Antimicrobial photodynamic therapy combined to periodontal treatment: Experimental model. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017 Jun;18:275-278. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.03.008. Epub 2017 Mar 19. PMID: 28330815.
- [12] Theodoro LH, Ferro-Alves ML, Longo M, Nuernberg MAA, Ferreira RP, Andreati A, Ervolino E, Duque C, Garcia VG. Curcumin photodynamic effect in the treatment of the induced periodontitis in rats. *Lasers Med Sci.* 2017 Nov;32(8):1783-1791. doi: 10.1007/s10103-017-2261-3. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28674790.
- [13] Peron D, Bergamo A, Prates R, Vieira SS, de Tarso Camillo de Carvalho P, Serra AJ. Photodynamic antimicrobial chemotherapy has an overt killing effect on periodontal pathogens? A systematic review of experimental studies. *Lasers Med Sci.* 2019 Oct;34(8):1527-1534. doi: 10.1007/s10103-019-02806-4. Epub 2019 May 21. PMID: 31111263.
- [14] de Almeida Brandão D, Spolidorio LC, Johnson F, Golub LM, Guimarães-Stabili MR, Rossa C Jr. Dose-response assessment of chemically modified curcumin in experimental periodontitis. *J Periodontol.* 2019 May;90(5):535-545. doi: 10.1002/JPER.18-0392. Epub 2018 Dec 20. PMID: 30394523.
- [15] Najafi S, Khayamzadeh M, Paknejad M, Poursepanj G, Kharazi Fard MJ, Bahador A. An In Vitro Comparison of Antimicrobial Effects of Curcumin-Based Photodynamic Therapy and Chlorhexidine, on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Lasers Med Sci.* 2016 Winter;7(1):21-5. doi: 10.15171/jlms.2016.05. Epub 2016 Jan 7. PMID: 27330693; PMCID: PMC4908980.
- [16] Saitawee D, Teerakapong A, Morales NP, Jitprasertwong P, Hormdee D. Photodynamic therapy of *Curcuma longa* extract stimulated with blue light against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018 Jun;22:101-105. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.03.001. Epub 2018 Mar 10. PMID: 29535046.

- [17] Pourhajibagher M, Chiniforush N, Monzavi A, Barikani H, Monzavi MM, Sobhani S, Shahabi S, Bahador A. Inhibitory Effects of Antimicrobial Photodynamic Therapy with Curcumin on Biofilm-Associated Gene Expression Profile of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. J Dent (Tehran). 2018 May;15(3):169-177. PMID: 30090117; PMCID: PMC6079183.
- [18] Wang TF, Jen IA, Chou C, Lei YP. Effects of periodontal therapy on metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus and periodontal disease: a meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2014 Dec;93(28):e292. doi: 10.1097/MD.0000000000000292. PMID: 25526470; PMCID: PMC4603101.
- [19] Hosadurga RR, Rao SN, Jose J, Rompicharla NC, Shakil M, Shashidhara R. Evaluation of the efficacy of 2% curcumin gel in the treatment of experimental periodontitis. Pharmacognosy Res 2014; 6(4): 326-33.
- [20] Pal A, Paul S, Perry R, Puryer J. Is the Use of Antimicrobial Photodynamic Therapy or Systemic Antibiotics More Effective in Improving Periodontal Health When Used in Conjunction with Localised Non-Surgical Periodontal Therapy? A Systematic Review. Dent J (Basel). 2019 Nov 18;7(4):108. doi: 10.3390/dj7040108. PMID: 31752098; PMCID: PMC6960859.
- [21] Pillusky FM, Barcelos RCS, Vey LT, Barin LM, de Mello Palma V, Maciel RM, Kantorski KZ, Bürger ME, Danesi CC. Antimicrobial photodynamic therapy with photosensitizer in ethanol improves oxidative status and gingival collagen in a short-term in periodontitis. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017 Sep;19:119-127. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.05.010. Epub 2017 May 12. PMID: 28506773.
- [22] Gualberto EC Jr, Theodoro LH, Longo M, Novaes VC, Nagata MJ, Ervolino E, Garcia VG. Antimicrobial photodynamic therapy minimizes the deleterious effect of nicotine in female rats with induced periodontitis. Lasers Med Sci. 2016 Jan;31(1):83-94. doi: 10.1007/s10103-015-1820-8. Epub 2015 Nov 6. PMID: 26545755.
- [23] Longo M, Garcia VG, Ervolino E, Alves MLF, Duque C, Wainwright M, Theodoro LH. Multiple aPDT sessions on periodontitis in rats treated with chemotherapy: Histomorphometrical, Immunohistochemical, Immunological and Microbiological Analyses. Photodiagnosis Photodyn Ther. (2018), <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.11.014>
- [24] Macedo PD, Corbi ST, de Oliveira GJPL, Perussi JR, Ribeiro AO, Marcantonio RAC. Hypericin-glucamine antimicrobial photodynamic therapy in the progression of experimentally induced periodontal disease in rats. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019 Mar;25:43-49. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.11.003. Epub 2018 Nov 3. PMID: 30399457.

- [25] Martins F, Simões A, Oliveira M, Luiz AC, Gallottini M, Pannuti C. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy as an adjuvant in periodontal treatment in Down syndrome patients. *Lasers Med Sci.* 2016 Dec;31(9):1977-1981. doi: 10.1007/s10103-016-2020-x. Epub 2016 Jul 6. PMID: 27384040.
- [26] Cadore UB, Reis MBL, Martins SHL, Invernici MM, Novaes AB Jr, Taba M Jr, Palioto DB, Messoria MR, Souza SLS. Multiple sessions of antimicrobial photodynamic therapy associated with surgical periodontal treatment in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2019 Apr;90(4):339-349. doi: 10.1002/JPER.18-0373. Epub 2018 Nov 21. PMID: 30383298.
- [27] Anselmo GG, Tortamano ACAC, Gonçalves MLL, Leal-Rossi A, Godoy-Miranda BA, Oliveira MRC, Oliveira PHC, Alves CB, Bussadori SK, Prates RA. Antimicrobial photodynamic chemotherapy mediated by PapaMBlue on chronic periodontal disease: Study protocol for a randomized, blind, controlled trial. *Medicine (Baltimore).* 2020 Feb;99(6):e18854. doi: 10.1097/MD.00000000000018854. PMID: 32028395; PMCID: PMC7015550.
- [28] Derikvand N, Ghasemi SS, Safiaghdam H, Piriaei H, Chiniforush N. Antimicrobial Photodynamic Therapy with Diode laser and Methylene blue as an adjunct to scaling and root planning: A clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Sep;31:101818. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101818. Epub 2020 May 13. PMID: 32413508.
- [29] Niazi FH, Noushad M, Tanvir SB, Ali S, Al-Khalifa KS, Qamar Z, Al-Sheikh R. Antimicrobial efficacy of indocyanine green-mediated photodynamic therapy compared with *Salvadora persica* gel application in the treatment of moderate and deep pockets in periodontitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Mar;29:101665. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101665. Epub 2020 Jan 21. PMID: 31978565.
- [30] Theodoro LH, Longo M, Ervolino E, Duque C, Ferro-Alves ML, Assem NZ, Louzada LM, Garcia VG. Effect of low-level laser therapy as an adjuvant in the treatment of periodontitis induced in rats subjected to 5-fluorouracil chemotherapy. *J Periodontal Res.* 2016 Oct;51(5):669-80. doi: 10.1111/jre.12347. Epub 2016 Jan 10. PMID: 26750739.
- [31] Zhang J, Liang H, Zheng Y, Wang D, Xia J, Peng W, Cheng K, Wang L, Liu Y, Peng W, Li Q. Photodynamic therapy versus systemic antibiotic for the treatment of periodontitis in a rat model. *J Periodontol.* 2019 Jul;90(7):798-807. doi: 10.1002/JPER.18-0305. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30632612.
- [32] Kumbar VM, Peram MR, Kugaji MS, Shah T, Patil SP, Muddapur UM, Bhat KG. Effect of curcumin on growth, biofilm formation and virulence factor gene expression of

Porphyromonas gingivalis. *Odontology*. 2020 Apr 11. doi: 10.1007/s10266-020-00514-y. Epub ahead of print. PMID: 32279229.

[33] Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, Theodoro LH. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2014 Oct;49(5):584-94. doi: 10.1111/jre.12138. Epub 2013 Nov 9. PMID: 24206053.

[34] Bakır B, Yetkin Ay Z, Büyükbayram Hİ, Kumbul Doğuç D, Bayram D, Candan IA, Uskun E. Effect of Curcumin on Systemic T Helper 17 Cell Response; Gingival Expressions of Interleukin-17 and Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor γ t; and Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis. *J Periodontol*. 2016 Nov;87(11):e183-e191. doi: 10.1902/jop.2016.150722. Epub 2016 Jul 23. PMID: 27452394.

[35] Elburki MS, Rossa C Jr, Guimarães-Stabili MR, Lee HM, Curylofo-Zotti FA, Johnson F, Golub LM. A Chemically Modified Curcumin (CMC 2.24) Inhibits Nuclear Factor κ B Activation and Inflammatory Bone Loss in Murine Models of LPS-Induced Experimental Periodontitis and Diabetes-Associated Natural Periodontitis. *Inflammation*. 2017 Aug;40(4):1436-1449. doi: 10.1007/s10753-017-0587-4. PMID: 28534138.

[36] Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Gualberto EC Jr, Santinoni Cdos S, Bosco AF, Nagata MJ, Theodoro LH. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2013 Jan;28(1):143-50. doi: 10.1007/s10103-012-1099-y. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22526974.

[37] de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol*. 2008 Nov;79(11):2156-65. doi: 10.1902/jop.2008.080103. PMID: 18980525.

[38] Gu Y, Lee HM, Napolitano N, Clemens M, Zhang Y, Sorsa T, Zhang Y, Johnson F, Golub LM. 4-methoxycarbonyl curcumin: a unique inhibitor of both inflammatory mediators and periodontal inflammation. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:329740. doi: 10.1155/2013/329740. Epub 2013 Dec 24. PMID: 24453415; PMCID: PMC3886587.

[39] Pimentel SP, Casati MZ, Ribeiro FV, Corrêa MG, Franck FC, Benatti BB, Cirano FR. Impact of natural curcumin on the progression of experimental periodontitis in diabetic rats. *J Periodontal Res*. 2020 Jan;55(1):41-50. doi: 10.1111/jre.12683. Epub 2019 Jul 18. PMID: 31321775.

[40] Alberton Nuernberg MA, Janjacomio Miessi DM, Ivanaga CA, Bocalon Olivo M, Ervolino E, Gouveia Garcia V, Wainwright M, Theodoro LH. Influence of antimicrobial

- photodynamic therapy as an adjunctive to scaling and root planing on alveolar bone loss: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Mar;25:354-363. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.01.020. Epub 2019 Jan 15. PMID: 30658106.
- [41] Akram Z, Al-Shareef SA, Daood U, Asiri FY, Shah AH, AlQahtani MA, Vohra F, Javed F. Bactericidal Efficacy of Photodynamic Therapy Against Periodontal Pathogens in Periodontal Disease: A Systematic Review. *Photomed Laser Surg.* 2016 Apr;34(4):137-49. doi: 10.1089/pho.2015.4076. Epub 2016 Mar 16. PMID: 26982216.
- [42] Carvalho AS, Napimoga MH, Coelho-Campos J, Silva-Filho VJ, Thedei G. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomed Laser Surg.* 2011 Nov;29(11):735-40. doi: 10.1089/pho.2010.2969. Epub 2011 Jun 8. PMID: 21651385.
- [43] Chang PC, Chien LY, Ye Y, Kao MJ. Irradiation by light-emitting diode light as an adjunct to facilitate healing of experimental periodontitis in vivo. *J Periodontal Res.* 2013 Apr;48(2):135-43. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01511.x. Epub 2012 Jul 29. PMID: 22845797.
- [44] Giannelli M, Lasagni M, Bani D. Photonic Therapy in Periodontal Diseases an Overview with Appraisal of the Literature and Reasoned Treatment Recommendations. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 24;20(19):4741. doi: 10.3390/ijms20194741. PMID: 31554277; PMCID: PMC6801906.
- [45] Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys.* 2017;4(3):337-361. doi: 10.3934/biophys.2017.3.337. Epub 2017 May 19. PMID: 28748217; PMCID: PMC5523874.
- [46] Jiang C, Yang W, Wang C, Qin W, Ming J, Zhang M, Qian H, Jiao T. Methylene Blue-Mediated Photodynamic Therapy Induces Macrophage Apoptosis via ROS and Reduces Bone Resorption in Periodontitis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Aug 14;2019:1529520. doi: 10.1155/2019/1529520. PMID: 31485288; PMCID: PMC6710739.
- [47] Elburki MS, Rossa C, Guimaraes MR, Goodenough M, Lee HM, Curylofo FA, Zhang Y, Johnson F, Golub LM. A novel chemically modified curcumin reduces severity of experimental periodontal disease in rats: initial observations. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:959471. doi: 10.1155/2014/959471. Epub 2014 Jun 29. PMID: 25104884; PMCID: PMC4101223.
- [48] Curylofo-Zotti FA, Elburki MS, Oliveira PA, Cerri PS, Santos LA, Lee HM, Johnson F, Golub LM, Rossa C Junior, Guimarães-Stabili MR. Differential effects of natural Curcumin and chemically modified curcumin on inflammation and bone resorption in model of

- experimental periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2018 Jul;91:42-50. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.04.007. Epub 2018 Apr 10. PMID: 29669267.
- [49] Guimaraes-Stabili MR, de Aquino SG, de Almeida Curylofo F, Tasso CO, Rocha FRG, de Medeiros MC, de Pizzol JP Jr, Cerri PS, Romito GA, Rossa C Jr. Systemic administration of curcumin or piperine enhances the periodontal repair: a preliminary study in rats. *Clin Oral Investig.* 2019 Aug;23(8):3297-3306. doi: 10.1007/s00784-018-2755-9. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30498979.
- [50] Wang HH, Lee HM, Raja V, Hou W, Iacono VJ, Scaduto J, Johnson F, Golub LM, Gu Y. Enhanced efficacy of chemically modified curcumin in experimental periodontitis: systemic implications. *J Exp Pharmacol.* 2019 Jan 23;11:1-14. doi: 10.2147/JEP.S171119. Erratum in: *J Exp Pharmacol.* 2020 Mar 10;12:73. PMID: 30774454; PMCID: PMC6350653.
- [51] Hosadurga RR, Rao SN, Jose J, Rompicharla NC, Shakil M, Shashidhara R. Evaluation of the efficacy of 2% curcumin gel in the treatment of experimental periodontitis. *Pharmacognosy Res.* 2014 Oct;6(4):326-33. doi: 10.4103/0974-8490.138287. PMID: 25276071; PMCID: PMC4166822.
- [52] Guimarães MR, Coimbra LS, de Aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res.* 2011 Apr;46(2):269-79. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01342.x. Epub 2011 Feb 8. PMID: 21306385; PMCID: PMC3086370.
- [53] Guimarães MR, de Aquino SG, Coimbra LS, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. *Innate Immun.* 2012 Feb;18(1):155-63. doi: 10.1177/1753425910392935. Epub 2011 Jan 17. PMID: 21242275; PMCID: PMC3132291.
- [54] Zhou T, Chen D, Li Q, Sun X, Song Y, Wang C. Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. *Acta Odontol Scand.* 2013 Mar;71(2):349-56. doi: 10.3109/00016357.2012.682092. Epub 2012 May 4. PMID: 22554269.
- [55] Evangelista EE, França CM, Veni P, de Oliveira Silva T, Gonçalves RM, de Carvalho VF, Deana AM, Fernandes KP, Mesquita-Ferrari RA, Camacho CP, Bussadori SK, Alvarenga LH, Prates RA. Antimicrobial photodynamic therapy combined with periodontal treatment for metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2015 May 27;16:229. doi: 10.1186/s13063-015-0757-3. PMID: 26013003; PMCID: PMC4453758.

- [56] Barbosa FI, Araújo PV, Machado LJC, Magalhães CS, Guimarães MMM, Moreira AN. Effect of photodynamic therapy as an adjuvant to non-surgical periodontal therapy: Periodontal and metabolic evaluation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018 Jun;22:245-250. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.04.013. Epub 2018 Apr 27. PMID: 29709606.
- [57] Mirza S, Khan AA, Al-Kheraif AA, Khan SZ, Shafqat SS. Efficacy of adjunctive photodynamic therapy on the clinical periodontal, HbA1c and advanced glycation end product levels among mild to moderate chronic periodontal disease patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Dec;28:177-182. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.08.003. Epub 2019 Aug 5. PMID: 31394300.
- [58] Elsadek MF, Ahmed BM, Alkhawtani DM, Zia Siddiqui A. A comparative clinical, microbiological and glyceemic analysis of photodynamic therapy and *Lactobacillus reuteri* in the treatment of chronic periodontitis in type-2 diabetes mellitus patients. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Mar;29:101629. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.101629. Epub 2019 Dec 20. PMID: 31870899.
- [59] de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3):566-75. doi: 10.1902/jop.2007.060214. PMID: 17335382.

Tabela 1. Distribuição das avaliações quantitativas quanto à perda óssea linear em ratos normoglicêmicos.

ANIMAIS NORMOGLICÊMICOS								
7 dias				14 dias				
FURCA	INTERPROXIMAL	VESTIBULAR	LINGUAL	FURCA	INTERPROXIMAL	VESTIBULAR	LINGUAL	
<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	
GRUPOS								
GI-TPNC	481,64 (115,8) ^{Aa}	1.542,14 (756,0) ^{Aa}	1.118,28 (329,4) ^{Aa}	1.463,2 (286,0) ^{Aa}	807,00 (595,8) ^{Aa}	1.711,18 (801,2) ^{Aa}	1.207,00 (268,0) ^{Aa}	1.383,00 (350,8) ^{Aa}
GII-CURC	1.357,68 (438,2) ^{Aa}	1.298,54 (233,0) ^{Aa}	1.067,54 (404,5) ^{Aa}	1.332,30 (211,1) ^{Aa}	795,74 (341,5) ^{Ab}	1.528,10 (285,7) ^{Aa}	1.249,20 (341,1) ^{Aa}	1.091,48 (289,23) ^{Aa}
GIII-LED	678,84 (408,5) ^{Aa}	1.337,94 (301,4) ^{Aa}	747,84 (366,4) ^{Aa}	1.130,92 (101,2) ^{Aa}	604,2 (286,9) ^{Aa}	1.864,70 (601,0) ^{Aa}	822,50 (334,2) ^{Aa}	1.085,86 (241,5) ^{Aa}
GIV-TFD	1.063,30 (524,7) ^{Aa}	2.119,60 (358,8) ^{Aa}	1.063,34 (422,1) ^{Aa}	1.192,88 (193,9) ^{Aa}	801,36 (292,1) ^{Aa}	1.760,46 (652,8) ^{Aa}	1.353,44 (903,2) ^{Aa}	1.166,14 (416,4) ^{Aa}

Nota. *M* = média; DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$); ⁽¹⁾ Letras maiúsculas comparam valores na vertical (avaliação intergrupo, GI vs GII vs GIII vs GIV); ⁽²⁾ Letras minúsculas comparam valores na horizontal (avaliação intragrupo, 7 dias vs 14 dias).

Tabela 2. Distribuição das avaliações quantitativas quanto à perda óssea linear em ratos diabéticos.

ANIMAIS DIABÉTICOS								
7 dias				14 dias				
FURCA	INTERPROXIMAL	VESTIBULAR	LINGUAL	FURCA	INTERPROXIMAL	VESTIBULAR	LINGUAL	
<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	
GRUPOS								
GI-TPNC	919,66 (489,9) ^{Aa}	1.583,02 (366,2) ^{Aa}	899,9 (146,6) ^{Aa}	1.245,00 (418,9) ^{Aa}	508,42 (571,7) ^{Aa}	1.702,72 (638,8) ^{Aa}	1.026,70 (372,3) ^{Aa}	1.077,40 (346,6) ^{Aa}
GII-CURC	529,56 (352,1) ^{Aa}	1.953,42 (612,2) ^{Aa}	788,70 (284,4) ^{Ab}	1.280,18 (239,0) ^{Aa}	894,32 (438,2) ^{Aa}	2.105,48 (249,9) ^{Aa}	1.487,22 (275,9) ^{Ac}	1.346,40 (353,8) ^{Aa}
GIII-LED	754,90 (439,2) ^{Aa}	1.704,12 (708,6) ^{Aa}	2.847,84 (4.631,3) ^{Aa}	1.298,52 (321,2) ^{Aa}	792,92 (288,5) ^{Aa}	1.836,52 (143,8) ^{Aa}	942,20 (261,3) ^{Aa}	1.352,04 (312,4) ^{Aa}
GIV-TFD	385,90 (346,8) ^{Aa}	1.546,38 (296,1) ^{Aa}	923,88 (251,9) ^{Aa}	1.167,52 (315,5) ^{Aa}	518,28 (366,9) ^{Aa}	2.042,14 (570,1) ^{Aa}	1.014,02 (373,7) ^{Aa}	1.383,02 (185,6) ^{Aa}

Nota. *M* = média; DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultados estatisticamente significativo ($p < 0,05$); ⁽¹⁾ Letras maiúsculas comparam valores na vertical (avaliação intergrupo, GI vs GII vs GIII vs GIV); ⁽²⁾ Letras minúsculas comparam valores na horizontal (avaliação intragrupo, 7 dias vs 14 dias).

Tabela 3. Avaliação dos parâmetros volumétricos na região de furca dos grupos experimentais com tempo de eutanásia de 7 e 14 dias de animais normoglicêmicos.

ANIMAIS NORMOGLICÊMICOS								
7 dias				14 dias				
VT (mm ³)	VO (mm ³)	VO/VT (%)	SO (mm ²)	VT (mm ³)	VO (mm ³)	VO/VT (%)	SO (mm ²)	
<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	
GRUPOS								
GI-TPNC	1,08 (0,41) ^{Aa}	0,22 (0,20) ^{Aa}	26,67 (27,76) ^{Aa}	7,87 (5,37) ^{Aa}	1,04 (0,39) ^{Aa}	0,50 (0,39) ^{Aa}	48,11 (23,82) ^{Aa}	11,57 (6,94) ^{Aa}
GII-CURC	1,69 (0,30) ^{Aa}	0,32 (0,23) ^{Aa}	19,51 (13,05) ^{ABa}	10,91 (5,72) ^{Aa}	0,87 (0,44) ^{Ab}	0,42 (0,26) ^{Aa}	49,25 (27,96) ^{ABa}	11,43 (5,78) ^{Aa}
GIII-LED	0,69 (0,35) ^{Aba}	0,17 (0,13) ^{Aba}	26,67 (22,71) ^{ABa}	5,55 (3,19) ^{ABa}	0,69 (0,24) ^{ABa}	0,19 (0,16) ^{ABa}	28,13 (19,37) ^{ABa}	6,63 (4,13) ^{ABa}
GIV-TFD	0,59 (0,13) ^{Ba}	0,03 (0,009) ^{Ba}	6,99 (3,08) ^{Ba}	2,45 (0,78) ^{Ba}	0,58 (0,13) ^{Ba}	0,10 (0,14) ^{Ba}	16,12 (19,82) ^{Ba}	3,74 (4,71) ^{Ba}

Nota. *M* = média; DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$); ⁽¹⁾ Letras maiúsculas comparam valores na vertical (avaliação intergrupo, GI vs GII vs GIII vs GIV); ⁽²⁾ Letras minúsculas comparam valores na horizontal (avaliação intragrupo, 7 dias vs 14 dias).

Tabela 3 (Continuação). Avaliação dos parâmetros volumétricos na região de furca dos grupos experimentais com tempo de eutanásia de 7 e 14 dias de animais normoglicêmicos.

ANIMAIS NORMOGLICÊMICOS								
7 dias				14 dias				
SO/VT	ESP.TRB	NUM.TRB	SEP.TRB	SO/VT	ESP.TRB	NUM.TRB	SEP.TRB	
(1/mm)	(mm)	(1/mm)	(mm)	(1/mm)	(mm)	(1/mm)	(mm)	
<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	
GRUPOS								
GI-TPNC	9,26 (8,06) ^{Aa}	0,10 (0,01) ^{Aa}	2,48 (2,29) ^{Aa}	0,37 (0,24) ^{Aa}	11,68 (4,57) ^{Aa}	0,13 (0,02) ^{Aa}	3,54 (1,50) ^{Aa}	0,23 (0,15) ^{Aa}
GII-CURC	6,46 (3,09) ^{Aa}	0,10 (0,02) ^{Aa}	1,68 (0,92) ^{Aa}	0,59 (0,07) ^{Aa}	13,87 (7,40) ^{Aa}	0,11 (0,01) ^{Aa}	4,16 (2,26) ^{Ab}	0,25 (0,21) ^{Ac}
GIII-LED	8,34 (439,2) ^{Aa}	0,10 (0,02) ^{Aba}	2,37 (1,53) ^{Aa}	0,31 (0,15) ^{Aa}	9,60 (5,11) ^{Aa}	0,09 (0,01) ^{ABa}	2,78 (1,69) ^{Aa}	0,32 (0,15) ^{Aa}
GIV-TFD	4,56 (2,40) ^{Aa}	0,06 (0,01) ^{Ba}	1,06 (0,60) ^{Aa}	0,40 (0,10) ^{Aa}	5,87 (6,27) ^{Aa}	0,07 (0,02) ^{Ba}	1,66 (1,92) ^{Aa}	0,38 (0,17) ^{Aa}

Nota. *M* = média; DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$); ⁽¹⁾ Letras maiúsculas comparam valores na vertical (avaliação intergrupo, GI vs GII vs GIII vs GIV); ⁽²⁾ Letras minúsculas comparam valores na horizontal (avaliação intragrupo, 7 dias vs 14 dias).

Tabela 4. Avaliação dos parâmetros volumétricos na região de furca dos grupos experimentais com tempo de eutanásia de 7 e 14 dias de animais diabéticos.

ANIMAIS DIABÉTICOS								
GRUPOS	7 dias				14 dias			
	VT (mm ³)	VO (mm ³)	VO/VT (%)	SO (mm ²)	VT (mm ³)	VO (mm ³)	VO/VT (%)	SO (mm ²)
	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)
GI-TPNC	0,49 (0,06) ^{Aa}	0,11 (0,14) ^{Aa}	22,17 (27,11) ^{Aa}	3,55 (3,41) ^{Aa}	0,55 (0,13) ^{Aa}	0,18 (0,11) ^{Aa}	37,56 (24,70) ^{Aa}	6,26 (3,26) ^{Aa}
GII-CURC	0,56 (0,12) ^{Aa}	0,20 (0,05) ^{Aa}	39,07 (11,76) ^{Aa}	8,05 (1,99) ^{Aa}	0,57 (0,11) ^{Aa}	0,10 (0,09) ^{Aa}	19,92 (20,15) ^{Aa}	6,10 (4,13) ^{Aa}
GIII-LED	0,45 (0,06) ^{Aa}	0,05 (0,10) ^{Aa}	14,04 (24,94) ^{Aa}	2,17 (3,04) ^{Aa}	0,91 (0,43) ^{Aa}	0,40 (0,33) ^{Aa}	38,21 (21,47) ^{Aa}	10,84 (7,46) ^{Ab}
GIV-TFD	0,57 (0,09) ^{Aa}	0,10 (0,13) ^{Aa}	21,21 (28,73) ^{Aa}	3,97 (2,60) ^{Aa}	0,66 (0,04) ^{Aa}	0,25 (0,09) ^{Aa}	38,27 (11,71) ^{Aa}	8,66 (3,26) ^{Ab}

Nota. *M* = média; DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$); ⁽¹⁾ Letras maiúsculas comparam valores na vertical (avaliação intergrupo, GI vs GII vs GIII vs GIV); ⁽²⁾ Letras minúsculas comparam valores na horizontal (avaliação intragrupo, 7 dias vs 14 dias).

Tabela 4 (Continuação). Avaliação dos parâmetros volumétricos na região de furca dos grupos experimentais com tempo de eutanásia de 7 e 14 dias de animais diabéticos.

ANIMAIS DIABÉTICOS								
/	7 dias				14 dias			
	SO/VT	ESP.TRB	NUM.TRB	SEP.TRB	SO/VT	ESP.TRB	NUM.TRB	SEP.TRB
	(1/mm)	(mm)	(1/mm)	(mm)	(1/mm)	(mm)	(1/mm)	(mm)
	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)
GRUPOS								
GI-TPNC	6,73 (6,30) ^{Aa}	0,08 (0,05) ^{Aa}	1,83 (1,79) ^{Aa}	0,32 (0,19) ^{Aa}	12,17 (7,02) ^{Aa}	0,11 (0,01) ^{Aa}	3,31 (2,16) ^{Aa}	0,23 (0,17) ^{Aa}
GII-CURC	15,03 (4,61) ^{Aa}	0,09 (0,01) ^{Aa}	3,93 (1,18) ^{Aa}	0,17 (0,10) ^{Aa}	10,71 (8,23) ^{Aa}	0,06 (0,01) ^{Ab}	2,66 (2,21) ^{Aa}	0,25 (0,12) ^{Aa}
GIII-LED	5,07 (7,60) ^{Aa}	0,07 (0,03) ^{Aa}	1,34 (2,17) ^{Aa}	0,37 (0,16) ^{Aa}	11,45 (5,96) ^{Aa}	0,11 (0,02) ^{Ab}	3,47 (1,97) ^{Aa}	0,27 (0,14) ^{Aa}
GIV-TFD	7,39 (6,01) ^{Aa}	0,08 (0,02) ^{Aa}	2,01 (2,00) ^{Aa}	0,29 (0,16) ^{Aa}	12,81 (4,49) ^{Aa}	0,11 (0,02) ^{Ab}	3,35 (1,31) ^{Aa}	0,20 (0,07) ^{Aa}

Nota. *M* = média; DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$); ⁽¹⁾ Letras maiúsculas comparam valores na vertical (avaliação intergrupo, GI vs GII vs GIII vs GIV); ⁽²⁾ Letras minúsculas comparam valores na horizontal (avaliação intragrupo, 7 dias vs 14 dias).

Tabela 5. Comparação das variáveis quanto à perda óssea linear em ratos diabéticos e normoglicêmicos aos sete dias de tratamento.

7 DIAS DE TRATAMENTO								
DIABÉTICOS				NORMOGLICÊMICOS				
FURCA	INTERPROXIMAL	VESTIBULAR	LINGUAL	FURCA	INTERPROXIMAL	VESTIBULAR	LINGUAL	
<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	
GRUPOS								
GI-TPNC	919,66 (489,9) ^a	1.583,02 (366,2) ^a	899,94 (146,6) ^a	1.245,00 (418,9) ^a	481,64 (115,8) ^a	1.542,14 (756,0) ^a	1.118,28 (329,4) ^a	1.463,28 (286,0) ^a
GII-CURC	529,56 (352,1) ^a	1.953,42 (612,2) ^a	788,70 (284,4) ^a	1.280,18 (239,0) ^a	1.357,68 (372,0) ^b	1.298,54 (233,0) ^b	1.067,54 (404,5) ^a	1.332,30 (211,1) ^a
GIII-LED	754,90 (439,2) ^a	1.704,12 (708,6) ^a	2.847,84 (4.631,3) ^a	1.298,52 (321,2) ^a	678,84 (408,5) ^a	1.337,94 (301,4) ^a	747,84 (366,4) ^a	1.130,92 (101,2) ^a
GIV-TFD	385,90 (346,8) ^a	1.546,38 (296,1) ^a	923,88 (251,9) ^a	1.167,52 (315,5) ^a	1.063,30 (524,7) ^b	2.119,60 (358,8) ^b	1.063,34 (422,1) ^a	1.192,8 (193,9) ^a

Nota. *M* = média; DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultados estatisticamente significativo ($p < 0,05$); ^(a) Comparação na horizontal (avaliação intragrupo, diabéticos vs normoglicêmicos).

Tabela 6. Comparação das variáveis quanto à perda óssea linear em ratos diabéticos e normoglicêmicos aos quatorze dias de tratamento.

14 DIAS DE TRATAMENTO								
DIABÉTICOS				NORMOGLICÊMICOS				
FURCA	INTERPROXIMAL	VESTIBULAR	LINGUAL	FURCA	INTERPROXIMAL	VESTIBULAR	LINGUAL	
<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	
GRUPOS								
GI-TPNC	508,4 (571,7) ^a	1.702,72 (638,8) ^a	1.026,70 (372,3) ^a	1.077,40 (346,6) ^a	807,00 (595,8) ^a	1.711,18 (801,2) ^a	1.207,00 (268,0) ^a	1.383,00 (350,8) ^a
GII-CURC	894,32 (438,2) ^a	2.105,48 (249,9) ^a	1.487,22 (275,9) ^a	1.346,40 (353,8) ^a	795,74 (341,5) ^a	1.528,10 (285,7) ^b	1.249,20 (341,1) ^a	1.091,48 (289,23) ^a
GIII-LED	792,9 (288,5) ^a	1.836,52 (143,8) ^a	942,20 (261,3) ^a	1.352,04 (312,4) ^a	604,2 (286,9) ^a	1.864,70 (601,0) ^a	822,50 (334,2) ^a	1.085,86 (241,5) ^a
GIV-TFD	518,28 (366,9) ^a	2.042,14 (570,1) ^a	1.014,02 (373,7) ^a	1.383,02 (185,6) ^a	801,36 (292,1) ^a	1.760,46 (652,8) ^a	1.353,44 (903,2) ^a	1.166,14 (416,4) ^a

Nota. *M* = média; DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultados estatisticamente significativo ($p < 0,05$); ^(a) Comparação na horizontal (avaliação intragrupo, diabéticos vs normoglicêmicos).

Tabela 7. Comparação dos parâmetros volumétricos em animais diabéticos e normoglicêmicos aos sete dias de tratamento.

7 DIAS DE TRATAMENTO								
DIABÉTICOS					NORMOGLICÊMICOS			
	VT (mm ³)	VO (mm ³)	VO/VT (%)	SO (mm ²)	VT (mm ³)	VO (mm ³)	VO/VT (%)	SO (mm ²)
	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)
GRUPOS								
GI-TPNC	0,49 (0,06) ^a	0,11 (0,14) ^a	22,17 (27,11) ^a	3,55 (3,41) ^a	1,08 (0,41) ^b	0,22 (0,20) ^a	27,67 (27,76) ^a	7,87 (5,37) ^a
GII-CURC	0,56 (0,12) ^a	0,20 (0,05) ^a	39,07 (11,76) ^a	8,05 (1,99) ^a	1,69 (0,30) ^b	0,32 (0,23) ^a	19,51 (13,05) ^b	10,91 (5,72) ^a
GIII-LED	0,45 (0,06) ^a	0,05 (0,10) ^a	14,04 (24,94) ^a	2,17 (3,04) ^a	0,69 (0,35) ^a	0,17 (0,13) ^a	26,67 (22,7) ^a	5,55 (3,19) ^a
GIV-TFD	0,57 (0,09) ^a	0,10 (0,13) ^a	21,21 (28,73) ^a	3,97 (2,60) ^a	0,59 (0,13) ^a	0,03 (0,09) ^a	6,99 (3,08) ^a	2,45 (0,78) ^a

Nota. *M* = média; DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$); ^(a) Comparação na horizontal (avaliação intragrupo, diabéticos vs normoglicêmicos).

Tabela 7 (Continuação). Comparação dos parâmetros volumétricos em animais diabéticos e normoglicêmicos aos sete dias de tratamento.

7 DIAS DE TRATAMENTO								
DIABÉTICOS					NORMOGLICÊMICOS			
	SO/VT	ESP.TRB	NUM.TRB	SEP.TRB	SO/VT	ESP.TRB	NUM.TRB	SEP.TRB
	(1/mm)	(mm)	(1/mm)	(mm)	(1/mm)	(mm)	(1/mm)	(mm)
	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)
GRUPOS								
GI-TPNC	6,73 (6,30) ^a	0,08 (0,05) ^a	1,83 (1,79) ^a	0,32 (0,19) ^a	9,26 (8,06) ^a	0,10 (0,01) ^a	2,48 (2,29) ^a	0,37 (0,24) ^a
GII-CURC	15,03 (4,61) ^a	0,09 (0,01) ^a	3,93 (1,18) ^a	0,17 (0,10) ^a	6,46 (3,09) ^a	0,10 (0,02) ^a	1,68 (0,92) ^b	0,59 (0,07) ^b
GIII-LED	5,07 (7,60) ^a	0,07 (0,03) ^a	1,34 (2,17) ^a	0,37 (0,16) ^a	8,34 (4,53) ^a	0,10 (0,02) ^a	2,37 (1,56) ^a	0,31 (0,15) ^a
GIV-TFD	7,39 (6,01) ^a	0,08 (0,02) ^a	2,01 (2,00) ^a	0,29 (0,16) ^a	4,56 (2,40) ^a	0,06 (0,01) ^a	1,06 (0,60) ^a	0,40 (0,10) ^a

Nota. *M* = média; DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$); ^(a) Comparação na horizontal (avaliação intragrupo, diabéticos vs normoglicêmicos).

Tabela 8. Comparação dos parâmetros volumétricos em animais diabéticos e normoglicêmicos aos quatorze dias de tratamento.

14 DIAS DE TRATAMENTO								
	DIABÉTICOS				NORMOGLICÊMICOS			
	VT (mm ³)	VO (mm ³)	VO/VT (%)	SO (mm ²)	VT (mm ³)	VO (mm ³)	VO/VT (%)	SO (mm ²)
	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)
GRUPOS								
GI-TPNC	0,55 (0,13) ^a	0,18 (0,11) ^a	37,56 (24,70) ^a	6,26 (3,26) ^a	1,04 (0,39) ^b	0,50 (0,39) ^a	48,11 (23,82) ^a	11,57 (6,94) ^a
GII-CURC	0,57 (0,11) ^a	0,10 (0,09) ^a	19,92 (20,15) ^a	6,10 (4,13) ^a	0,87 (0,44) ^a	0,42 (0,26) ^b	49,25 (27,96) ^a	11,43 (5,78) ^a
GIII-LED	0,91 (0,43) ^a	0,40 (0,33) ^a	38,21 (21,47) ^a	10,84 (7,46) ^a	0,69 (0,24) ^a	0,19 (0,16) ^a	28,13 (19,37) ^a	6,63 (4,13) ^a
GIV-TFD	0,66 (0,04) ^a	0,25 (0,09) ^a	38,27 (11,7) ^a	8,66 (3,26) ^a	0,58 (0,13) ^a	0,10 (0,14) ^a	16,12 (19,82) ^a	3,74 (4,71) ^a

Nota. *M* = média; DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$); ^(a) Comparação na horizontal (avaliação intragrupo, diabéticos vs normoglicêmicos).

Tabela 8 (Continuação). Comparação dos parâmetros volumétricos em animais diabéticos e normoglicêmicos aos quatorze dias de tratamento.

14 DIAS DE TRATAMENTO								
GRUPOS	DIABÉTICOS				NORMOGLICÊMICOS			
	SO/VT	ESP.TRB	NUM.TRB	SEP.TRB	SO/VT	ESP.TRB	NUM.TRB	SEP.TRB
	(1/mm)	(mm)	(1/mm)	(mm)	(1/mm)	(mm)	(1/mm)	(mm)
	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)	<i>M</i> (DP)
GI-TPNC	12,17 (7,02) ^a	0,11 (0,01) ^a	3,31 (2,16) ^a	0,23 (0,17) ^a	11,68 (4,57) ^a	0,13 (0,02) ^a	3,54 (1,50) ^a	0,23 (0,15) ^a
GII-CURC	10,71 (8,23) ^a	0,06 (0,01) ^a	2,66 (2,21) ^a	0,25 (0,12) ^a	13,87 (7,40) ^a	0,11 (0,01) ^b	4,16 (2,26) ^a	0,25 (0,21) ^a
GIII-LED	11,45 (5,96) ^a	0,11 (0,02) ^a	3,47 (1,97) ^a	0,27 (0,14) ^a	9,60 (5,11) ^a	0,09 (0,01) ^a	2,78 (1,69) ^a	0,32 (0,15) ^a
GIV-TFD	12,81 (4,49) ^a	0,11 (0,02) ^a	3,35 (1,31) ^a	0,20 (0,07) ^a	5,87 (6,27) ^a	0,07 (0,02) ^b	1,66 (1,92) ^a	0,38 (0,17) ^a

Nota. *M* = média; DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$); ^(a) Comparação na horizontal (avaliação intragrupo, diabéticos vs normoglicêmicos).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para os animais normoglicêmicos, os resultados das medidas lineares sugerem que, em animais sem comprometimento sistêmico, as terapias complementares promovem um benefício adicional com o tempo uma vez que, principalmente na região de difícil acesso como a furca, o modo de ação possibilita atingir as bactérias periodontopatogênicas que permanecem no local, mesmo após a terapia convencional. Embora a TFDa tenha sido a terapia complementar que proporcionou os melhores ganhos em três parâmetros aos 14 dias, apenas a curcumina apresentou diferença significativa, podendo ambas ser uma escolha para a manutenção periodontal periódica.

Com relação às medidas volumétricas, os resultados sugerem que em animais normoglicêmicos, inicialmente, os benefícios podem não ser perceptíveis, mas pode haver um estímulo na remodelação óssea desses tratamentos adicionais que podem ser visualizados com o passar do tempo. A curcumina, inclusive, por ter ação antimicrobiana e anti-inflamatória, pode eliminar os periodontopatógenos, reduzindo a inflamação e conseqüentemente a perda óssea, assim como promovendo a imunomodulação na resposta do hospedeiro.

Para os animais com doença periodontal e com comprometimento sistêmico pela diabetes, os resultados das medidas lineares da reabsorção óssea podem sugerir um tratamento periodontal que seja iniciado com a TFDa. Por sua vez, a terapia de manutenção pode ser realizada com repetição de sessões de TFDa ou apenas com a terapia mecânica, mas torna-se imprescindível, uma vez que a perda óssea linear nas regiões mais críticas (furca e interproximal) foram gradativas com o passar do tempo. Para tanto, recomenda-se que novos estudos avaliem a continuidade destas terapias a fim de comprovar tal fato.

Com relação às medidas volumétricas, para os animais diabéticos, pode-se propor que o tratamento periodontal seja iniciado com a curcumina como terapia complementar e o protocolo de manutenção pode ser com LED, atuando como fotobiomodulador, ou com a TFDa, potencializando a ação da curcumina.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AKRAM, Z.; AL-SHAREEF, S.A.; DAOOD, U.; ASIRI, F.Y.; SHAH, A.H.; ALQAHTANI, M.A.; VOHRA, F.; JAVED, F. Bactericidal Efficacy of Photodynamic Therapy Against Periodontal Pathogens in Periodontal Disease: A Systematic Review. **Photomed Laser Surg**, v.34, n.4, p.137-149, 2016.
- ALBERTON NUERNBERG, M.A.; JANJACOMO MIESSI, D.M.; IVANAGA, C.A.; BOCALON OLIVO, M.; ERVOLINO, E.; GOUVEIA GARCIA, V.; WAINWRIGHT, M.; THEODORO, L.H. Influence of antimicrobial photodynamic therapy as an adjunctive to scaling and root planing on alveolar bone loss: A systematic review and meta-analysis of animal studies. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 25, p. 354-363, 2019.
- ANSELMO, G.G.; TORTAMANO, A.C.A.C.; GONÇALVES, M.L.L.; LEAL-ROSSI, A.; GODOY-MIRANDA, B.A.; OLIVEIRA, M.R.C.; OLIVEIRA, P.H.C.; ALVES, C.B.; BUSSADORI, S.K.; PRATES, R.A. Antimicrobial photodynamic chemotherapy mediated by PapaMBlue on chronic periodontal disease: Study protocol for a randomized, blind, controlled trial. **Medicine**, v. 99, n.6, e1885, 2020.
- ANURADHA, B.R.; BAI, Y.D.; SAILAJA, S.; SUDHAKAR, J.; PRIYANKA, M.; DEEPIKA, V. Evaluation of Anti-Inflammatory Effects of Curcumin Gel as an Adjunct to Scaling and Root Planing: A Clinical Study. **J Int Oral Health**, v.7, n.7, p. 90-3, 2015.
- BARBOSA, F.I.; ARAÚJO, P.V.; MACHADO, L.J.C.; MAGALHÃES, C.S.; GUIMARÃES, M.M.M.; MOREIRA, A.N. Effect of photodynamic therapy as an adjuvant to non-surgical periodontal therapy: Periodontal and metabolic evaluation in patients with type 2 diabetes mellitus. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 22, p. 245-250, 2018.
- BAKIR, B.; YETKIN, A.Y.Z.; BÜYÜKBAYRAM, H.İ.; KUMBUL DOĞUÇ, D.; BAYRAM, D.; CANDAN, I.A.; USKUN, E. Effect of curcumin on systemic T helper 17 cell response; gingival expressions of interleukin- 17 and retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t; and alveolar bone loss in experimental periodontitis. **J Periodontol**, v. 87, n.11, p. e183-e191, 2016.
- BARIN, L.M.; BARCELOS, R.C.S.; VEY, L.T.; PILLUSKY, F.M.; PALMA, V.M.; KANTORSKI, K.Z.; BÜRGER, M.E.; MACIEL, R.M.; DANESI, C.C. Role of the adjunctive antimicrobial photodynamic therapy to periodontal treatment at plasmatic oxidative stress and vascular behavior. **J Photochem Photobiol B**, v. 173, p.538-544, 2017.
- BELINELLO-SOUZA, E.L.; ALVARENGA, L.H.; LIMA-LEAL, C.; ALMEIDA, P.; LEITE, C.G.; LIMA, T.R.; GODOY-MIRANDA, B.; PREVIATI-OLIVEIRA, J.; DE PRETTO, L.; DE FREITAS, A.Z.; FERNANDES, A.U.; LABAT MARCOS, R.; PRATES, R.A. Antimicrobial photodynamic therapy combined to periodontal treatment: Experimental model. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v.18, p. 275-278, 2017.
- CADORE, U.B.; REIS, M.B.L.; MARTINS, S.H.L.; INVERNICI, M.M.; NOVAES, A.B. JR.; TABA, M. JR.; PALIOTO, D.B.; MESSORA, M.R.; SOUZA, S.L.S. Multiple sessions of antimicrobial photodynamic therapy associated with surgical periodontal treatment in patients with chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 90, n.4, p. 339-349, 2019.

CARVALHO, A.S.; NAPIMOGA, M.H.; COELHO-CAMPOS, J.; SILVA-FILHO, V.J.; THEDEI, G. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. **Photomed Laser Surg**, v.29, n.11, p.735-40, 2011.

CHANG, P.C.; CHIEN, L.Y.; YE, Y.; KAO, M.J. Irradiation by light-emitting diode light as an adjunct to facilitate healing of experimental periodontitis in vivo. **J Periodontal Res**, v. 48, n.2, p.135-43, 2013.

CATON, J.G.; ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T.; CHAPPLE, I.L.C.; JEPSEN, S.; KORNMAN, K.S.; MEALEY, B.L.; PAPAPANOU, P.N.; SANZ, M.; TONETTI, M.S. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. **J Periodontol**, v 89 Suppl 1:S1-S8, 2018.

CURYLOFO-ZOTTI, F.A.; ELBURKI, M.S.; OLIVEIRA, P.A.; CERRI, P.S.; SANTOS, L.A.; LEE, H.M.; JOHNSON, F.; GOLUB, L.M.; ROSSA, C. JUNIOR.; GUIMARÃES-STABILI, M.R. Differential effects of natural Curcumin and chemically modified curcumin on inflammation and bone resorption in model of experimental periodontitis. **Arch Oral Biol**, v. 91, p.42-50, 2018.

DE ALMEIDA, J.M.; THEODORO, L.H.; BOSCO, A.F.; NAGATA, M.J.; OSHIWA, M.; GARCIA, V.G. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontol**, v.78, n.3, p.566-575, 2007.

DE ALMEIDA, J.M.; THEODORO, L.H.; BOSCO, A.F.; NAGATA, M.J.; BONFANTE, S.; GARCIA, V.G. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. **J Periodontol**, v. 79, n. 11, p. 2156-65, 2008.

DE ALMEIDA BRANDÃO, D.; SPOLIDORIO, L.C.; JOHNSON, F.; GOLUB, L.M.; GUIMARÃES-STABILI, M.R.; ROSSA, C. JR. Dose-response assessment of chemically modified curcumin in experimental periodontitis. **J Periodontol**, v. 90, n.5, p. 535-545, 2019.

DERIKVAND, N.; GHASEMI, S.S.; SAFIAGHDAM, H.; PIRIAEI, H.; CHINIFORUSH, N. Antimicrobial Photodynamic Therapy with Diode laser and Methylene blue as an adjunct to scaling and root planning: A clinical trial. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 31, 101818, 2020.

DE MORAES, M.; VASCONCELOS, R.C.; LONGO, J.P.; MUEHLMANN, L.A.; DE AZEVEDO, R.B.; DE ARAÚJO JÚNIOR, R.F.; ARAUJO, A.A.; DE LISBOA LOPES COSTA, A. Photodynamic therapy using chloro-aluminum phthalocyanine decreases inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. **J Photochem Photobiol B**, v.167, p.208-215, 2017.

DE OLIVEIRA, P.G.; SILVEIRA E SOUZA, A.M.; NOVAES, A.B. JR.; TABA, M. JR.; MESSORA, M.R.; PALIOTO, D.B.; GRISI, M.F.; TEDESCO, A.C.; DE SOUZA, S.L. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy in induced periodontal disease. Animal study with histomorphometrical, imunohistochemical, and cytokine evaluation. **Laser Med Sci**, v. 31, n.7, p.1275-83, 2016.

ELBURKI, M.S.; ROSSA, C.; GUIMARÃES, M.R.; GOODENOUGH, M.; LEE, H.M.; CURYLOFO, F.A.; ZHANG, Y.; JOHNSON, F.; GOLUB, L.M. A novel chemically modified curcumin reduces severity of experimental periodontal disease in rats: initial observations. **Mediators Inflamm**, 959471, 2014.

ELBURKI, M.S.; MOORE, D.D.; TEREZAKIS, N.G.; ZHANG, Y.; LEE, H.M.; JOHNSON, F.; GOLUB, L.M. A novel chemically modified curcumin reduces inflammation-mediated connective tissue breakdown in a rat model of diabetes: periodontal and systemic effects. **J Periodontal Res**, v.52, n. 2, p. 186-200, 2017.

ELBURKI, M.S.; ROSSA, C. JR.; GUIMARÃES-STABILI, M.R.; LEE, H.M.; CURYLOFO-ZOTTI, F.A.; JOHNSON, F.; GOLUB, L.M. A chemically modified curcumin (CMC 2.24) inhibits nuclear factor κ B activation and inflammatory bone loss in murine models of LPS-induced experimental periodontitis and diabetes-associated natural periodontitis. **Inflammation**, v.40, n.4, p.1436-1449, 2017.

ELSADEK, M.F.; AHMED, B.M.; ALKHAWTANI, D.M.; ZIA SIDDIQUI, A. A comparative clinical, microbiological and glycemic analysis of photodynamic therapy and *Lactobacillus reuteri* in the treatment of chronic periodontitis in type-2 diabetes mellitus patients. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v.29, 101629, 2020.

EVANGELISTA, E.E.; FRANÇA, C.M.; VENI, P.; DE OLIVEIRA SILVA, T.; GONÇALVES, R.M.; DE CARVALHO, V.F.; DEANA, A.M.; FERNANDES, K.P.; MESQUITA-FERRARI, R.A.; CAMACHO, C.P.; BUSSADORI, S.K.; ALVARENGA, L.H.; PRATES, R.A. Antimicrobial photodynamic therapy combined with periodontal treatment for metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v.27, n.16, p.229, 2015.

FERNANDES, PATRÍCIA GARANI. Aplicação da microtomografia computadorizada para a análise morfométrica bi e tridimensional na avaliação da perda óssea experimental em ratos. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 2014. 124p.

FILIPINI, S.M.R.; CAMPAGNOLO, C.B.; DUTRA, D.A.M.; MACIEL, R.M.; DANESI, C.C.; KANTORSKI, K.Z. Adjunctive antimicrobial photodynamic therapy using methylene blue/ethanol formulation in experimental periodontitis in diabetic rats: short-term results. **Lasers Med Sci**. v. 34, n. 6, p. 1253-1260, 2019.

GHANBARI, H.; MOUSAVI, S.A.; FOROUZANFAR, A.; ZAKERI, M.; SHAFABEE, H.; SHAHNASERI, S. Synergic phototoxic effect of visible light or Gallium-Arsenide laser in the presence of different photo-sensitizers on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. **Dent Res J**, v.12, n. 4, p. 323-30, 2015.

GARCIA, V.G.; LONGO, M.; GUALBERTO JÚNIOR, E.C.; BOSCO, A.F.; NAGATA, M.J.; ERVOLINO, E.; THEODORO, L.H. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. **J Periodontal Res**, v.49, n.5, p. 584-94, 2014.

GARCIA, V.G.; LONGO, M.; FERNANDES, L.A.; GUALBERTO, E.C. JR.; SANTINONI CDOS, S.; BOSCO, A.F.; NAGATA, M.J.; THEODORO, L.H. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. **Lasers Med Sci**, v.28, n.1, p. 143-150, 2013.

GIANNELLI, M.; LASAGNI, M.; BANI, D. Photonic Therapy in Periodontal Diseases an Overview with Appraisal of the Literature and Reasoned Treatment Recommendations. **Int J Mol Sci**, v.20, n.19, p. 4741, 2019.

GRAVES D.T.; DING Z.; YANG Y. The impact of diabetes on periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2020 Feb;82(1):214-224. doi: 10.1111/prd.12318. PMID: 31850631.

GU, Y.; LEE, H.M.; NAPOLITANO, N.; CLEMENS, M.; ZHANG, Y.; SORSA, T.; ZHANG, Y.; JOHNSON, F.; GOLUB, L.M. 4-methoxycarbonyl curcumin: a unique inhibitor of both inflammatory mediators and periodontal inflammation. **Mediators of inflammation**, 2013; 2013:329740. doi: 10.1155/2013/329740. Epub 2013 Dec 24. PMID: 24453415; PMCID: PMC3886587.

GUALBERTO, E.C. JR.; THEODORO, L.H.; LONGO, M.; NOVAES, V.C.; NAGATA, M.J.; ERVOLINO, E.; GARCIA, V.G. Antimicrobial photodynamic therapy minimizes the deleterious effect of nicotine in female rats with induced periodontitis. **Lasers Med Sci**, v.31, n.1, p.83-94, 2016.

GUIMARÃES, M.R.; COIMBRA, L.S.; DE AQUINO, S.G.; SPOLIDORIO, L.C.; KIRKWOOD, K.L.; ROSSA, C. JR. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. **J Periodontal Res**, v. 46, n.2, p. 269–279, 2011.

GUIMARÃES, M.R.; DE AQUINO, S.G.; COIMBRA, L.S.; SPOLIDORIO, L.C.; KIRKWOOD, K.L.; ROSSA, C. JR. Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. **Innate Immun**, v.18, n. 1, p.155–163, 2012.

GUIMARAES-STABILI, M.R.; DE AQUINO, S.G.; DE ALMEIDA CURYLOFO, F.; TASSO, C.O.; ROCHA, F.R.G.; DE MEDEIROS, M.C.; DE PIZZOL, J.P. JR.; CERRI, P.S.; ROMITO, G.A.; ROSSA, C, JR. Systemic administration of curcumin or piperine enhances the periodontal repair: a preliminary study in rats. **Clin Oral Investig**, v. 23, n. 8, p.3297-3306, 2019.

HAMBLIN, M.R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophys**, v.4, n.3, p.337–361, 2017.

HOSADURGA, R.R.; RAO, S.N.; JOSE, J.; ROMPICHARLA, N.C.; SHAKIL, M.; SHASHIDHARA, R. Evaluation of the efficacy of 2% curcumin gel in the treatment of experimental periodontitis. **Pharmacognosy Res**, v.6, n.4, p. 326-33, 2014.

IVANAGA, C.A.; MIESSI, D.M.J.; NUERNBERG, M.A.A.; CLAUDIO, M.M.; GARCIA, V.G.; THEODORO, L.H. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with curcumina and LED, as an enhancement to scaling and root planing in the treatment of residual pockets in diabetic patients: a randomized and controlled split-mouth clinical trial. **Photodiagnosis Photody Ther**, v. 27, p. 388–395, 2019.

JIANG, C.; YANG, W.; WANG, C.; QIN, W.; MING, J.; ZHANG, M.; QIAN, H.; JIAO, T. Methylene Blue-Mediated Photodynamic Therapy Induces Macrophage Apoptosis via ROS and Reduces Bone Resorption in Periodontitis. **Oxid Med Cell Longev**, v.14, 1529520, 2019.

KUMBAR, V.M.; PERAM, M.R.; KUGAJI, M.S.; SHAH, T.; PATIL, S.P.; MUDDAPUR, U.M.; BHAT, K.G. Effect of curcumin on growth, biofilm formation and virulence factor gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. **Odontology**, 2020.
doi: 10.1007/s10266-020-00514-y. Epub ahead of print. PMID: 32279229.

LLAMBÉS, F.; ARIAS-HERRERA, S.; CAFFESSE, R. Relationship between diabetes and periodontal infection. **World J Diabetes**, v.6, n.7, p. 927-935, 2015.

LONGO, M.; GOUVEIA GARCIA, V.; ERVOLINO, E.; FERRO ALVES, M.L.; DUQUE, C.; WAINWRIGHT, M.; THEODORO, L.H. Multiple aPDT sessions on periodontitis in rats treated with chemotherapy: Histomorphometrical, Immunohistochemical, Immunological and Microbiological Analyses. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, (2018)
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.11.014>

MACEDO, P.D.; CORBI, S.T.; DE OLIVEIRA, G.J.P.L.; PERUSSI, JR.; RIBEIRO, A.O.; MARCANTONIO, R.A.C. Hypericin-glucamine antimicrobial photodynamic therapy in the progression of experimentally induced periodontal disease in rats. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v.25, p. 43-49, 2019.

MARTINS, F.; SIMÕES, A.; OLIVEIRA, M.; LUIZ, A.C.; GALLOTTINI, M.; PANNUTI, C. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy as an adjuvant in periodontal treatment in Down syndrome patients. **Lasers Med Sci**, v.31, n.9, p. 1977-1981, 2016.

MIRZA, S.; KHAN, A.A.; AL-KHERAIF, A.A.; KHAN, S.Z.; SHAFQAT, S.S. Efficacy of adjunctive photodynamic therapy on the clinical periodontal, HbA1c and advanced glycation end product levels among mild to moderate chronic periodontal disease patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled clinical trial. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 28, p. 177-182, 2019.

NAJAFI, S.; KHAYAMZADEH, M.; PAKNEJAD, M.; POURSEPANJ, G.; KHARAZI FARD, M.J.; BAHADOR, A. An In Vitro Comparison of Antimicrobial Effects of Curcumin-Based Photodynamic Therapy and Chlorhexidine, on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J Lasers Med Sci**, v. 7, n.1, p. 21-5, 2016.

NIAZI, F.H.; NOUSHAD, M.; TANVIR, S.B.; ALI, S.; AL-KHALIFA, K.S.; QAMAR, Z.; AL-SHEIKH, R. Antimicrobial efficacy of indocyanine green-mediated photodynamic therapy compared with *Salvadora persica* gel application in the treatment of moderate and deep pockets in periodontitis. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v.29, 101665, 2020.

PAL, A.; PAUL, S.; PERRY, R.; PURYER, J. Is the Use of Antimicrobial Photodynamic Therapy or Systemic Antibiotics More Effective in Improving Periodontal Health When Used in Conjunction with Localised Non-Surgical Periodontal Therapy? A Systematic Review. **Dent J**, v. 7, n.4, p.108, 2019.

PARK, J.Y.; CHUNG, J.H.; LEE, J.S.; KIM, H.J.; CHOI, S.H.; JUNG, U.W. Comparisons of the diagnostic accuracies of optical coherence tomography, micro-computed tomography, and histology in periodontal disease: an *ex vivo* study. **J Periodontal Implant Sci**, v.47, n.1, p.30-40, 2017.

PERON, D.; BERGAMO, A.; PRATES, R.; VIEIRA, S.S.; DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO, P.; SERRA, A.J. Photodynamic antimicrobial chemotherapy has an overt killing effect on periodontal pathogens? A systematic review of experimental studies. **Lasers Med Sci**, n. 34, v.8, p. 1527-1534, 2019.

PILLUSKY, F.M.; BARCELOS, R.C.S.; VEY, L.T.; BARIN, L.M.; DE MELLO PALMA, V.; MACIEL, R.M.; KANTORSKI, K.Z.; BÜRGER, M.E.; DANESI, C.C. Antimicrobial photodynamic therapy with photosensitizer in ethanol improves oxidative status and gingival collagen in a short-term in periodontitis. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v.19, p.119-127, 2017.

PIMENTEL, S.P.; CASATI, M.Z.; RIBEIRO, F.V.; CORRÊA, M.G.; FRANCK, F.C.; BENATTI, B.B.; CIRANO, F.R. Impact of natural curcumin on the progression of experimental periodontitis in diabetic rats. **J Periodontal Res**, v.55, n.1, p.41-50, 2020.

POURHAJIBAGHER, M.; CHINIFORUSH, N.; MONZAVI, A.; BARIKANI, H.; MONZAVI, M.M.; SOBHANI, S.; SHAHABI, S.; BAHADOR, A. Inhibitory Effects of Antimicrobial Photodynamic Therapy with Curcumin on Biofilm-Associated Gene Expression Profile of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J Dent**, v. 15, n.3, p. 169-177, 2018.

SAITAWEE, D.; TEERAKAPONG, A.; MORALES, N.P.; JITPRASERTWONG, P.; HORMDEE, D. Photodynamic therapy of *Curcuma longa* extract stimulated with blue light against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photodiagnosis Photodyn. Ther**, v. 22, p. 101–105, 2018.

THEODORO, L.H.; LONGO, M.; ERVOLINO, E.; DUQUE, C.; FERRO-ALVES, M.L.; ASSEM, N.Z.; LOUZADA, L.M.; GARCIA, V.G. Effect of low-level laser therapy as an adjuvant in the treatment of periodontitis induced in rats subjected to 5-fluorouracil chemotherapy. **J Periodontal Res**, v. 51, n.5, p. 669–680, 2016.

THEODORO, L.H.; FERRO-ALVES, M.L.; LONGO, M.; NUERNBERG, M.A.A.; FERREIRA, R.P.; ANDREATI, A.; ERVOLINO, E.; DUQUE, C.; GARCIA, V.G. Curcumin photodynamic effect in the treatment of the induced periodontitis in rats. **Lasers Med. Sci**, v.32, n.8, p. 1783–1791, 2017.

THEODORO, L.H.; LONGO, M.; NOVAES, V.C.N.; MIESSI, D.M.J.; FERRO-ALVES, M.L.; ERVOLINO, E.; DE ALMEIDA, J.M.; GARCIA, V.G. Low-level laser and antimicrobial photodynamic therapy on experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy by 5-fluorouracil. **Support Care Cancer**, v.10, p. 3261-3271, 2017.

WANG, T.F.; JEN, I.A.; CHOU, C.; LEI Y.P. Effects of periodontal therapy on metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus and periodontal disease: a meta-analysis. **Medicine**, v. 93, n. 28, p. e292, 2014.

WANG, H.H.; LEE, H.M.; RAJA, V.; HOU, W.; IACONO, V.J.; SCADUTO, J.; JOHNSON, F.; GOLUB, L.M.; GU, Y. Enhanced efficacy of chemically modified curcumin in experimental periodontitis: systemic implications [published correction appears in *J Exp Pharmacol*. 2020 Mar 10;12:73]. **J Exp Pharmacol**, v.11, p.1-14, 2019.

ZAMBRANO, L.M.G.; BRANDÃO, D.A.; ROCHA, F.R.G.; MARSIGLIO, R.P.; LONGO, I.B.; PRIMO, F.L.; TEDESCO, A.C.; GUIMARÃES-STABILI, M.R.; ROSSA JUNIOR, C. Local administration of curcumin-loaded nanoparticles effectively inhibits inflammation and bone resorption associated with experimental periodontal disease. **Sci Rep**, v.8, n.1, p. 6652, 2018.

ZHANG, Y.; GOLUB, L.M.; JOHNSON, F.; WISHNIA, A. pKa, zinc- and serum albumin-binding of curcumin and two novel biologically-active chemically-modified curcumins. **Curr Med Chem**, v. 19, p. 4367-4475, 2012.

ZHANG, D.W.; FU, M.; GAO, S.H.; LIU, J.L. Curcumin and diabetes: a systematic review. **Evid Based Complement Altern Med**, 636053, 2013.

ZHANG, J.; LIANG, H.; ZHENG, Y.; WANG, D.; XIA, J.; PENG, W.; CHENG, K.; WANG, L.; LIU, Y.; PENG, W.; LI, Q. Photodynamic therapy versus systemic antibiotic for the treatment of periodontitis in a rat model. **J Periodontol**, v.90, n.7, p. 798-807, 2019.

ZHOU, T.; CHEN, D.; LI, Q.; SUN, X.; SONG, Y.; WANG, C. Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. **Acta Odontol Scand**, v.71, n.2, p. 349-356, 2013.

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) do CESED



PARECER

NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO: 008014122018

CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012

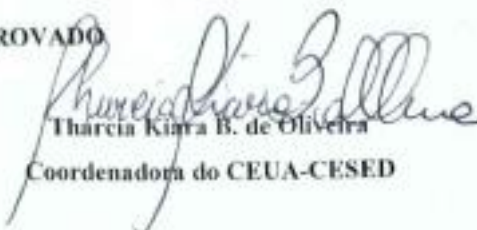
DATA DO PARECER: 14/12/2018

1. **Pesquisador Responsável:** Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão
Título do Projeto: EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA REDUÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA, DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA REABSORÇÃO NA DOENÇA PERIODONTAL EM RATOS

2. **Considerações:** Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em reunião de 14 / 12 / 2018.

Vigência do Projeto	01 de Dezembro de 2018 a 30 de Abril 2019
Espécie / linhagem	Rattus norvegicus / Wistar
Nº de animais	100
Peso / idade	200-250 g / 60-90 dias
Sexo	Machos
Origem	BIOTÉRIO CESED

3. **Parecer Final: APROVADO**


 Tharcia Kiara B. de Oliveira
 Coordenadora do CEUA-CESED

ANEXO B – Preparo do Gel de Curcumina 2%



PRODUÇÃO: Gel de carbopol 2%


Composição	Porcentagem
Água destilada	71,12%
Carbopol	2%
Nipagin	0,18%
Propilenoglicol	25%
Trietanolamina	1,7%

Técnica de preparo do gel de carbopol 2%:

- 1-Levar ao aquecimento o nipagin em água purificada;
- 2-Depois do resfriamento, dispersar o carbopol na água e deixar hidratando pelo menos 4 horas;
- 3-Levar ao agitador mecânico Gehaka até a mistura ficar homogênea;
- 4-Adicionar a trietanolamina até o pH=6;
- 5-Acrescentar propilenoglicol e homogeneizar;
- 6-Envasar e registrar o pH final 6.

Preparo do gel de curcumina 2%

Incorporação da *Curcuma longa* 2% (Valdequímica®) em gel de carbopol 2% q.s.p. 50g, homogeneizado e verificado o pH 5,8, cor laranja, consistência conforme.



 Farmacêutica
 CRF - PB 04421
 Farmacêutico responsável

ANEXO C - Normas para submissão de artigos ao periódico *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*

PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY (ISSN:1572-1000)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS: Description, Audience, Impact Factor, Abstracting and Indexing, Editorial Board, Guide for Authors

DESCRIPTION

Official Journal of the European Platform for Photodynamic Medicine

Affiliated with the International Photodynamic Association

Also affiliated with the British Medical Laser Association and the Polish Society for Photodynamic

Medicine

INDEXED in MEDLINE/PubMed, SciSearch/Science Citation Index Expanded, Current Contents/Clinical Medicine.

Aims and Scope:

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy is an international journal for the dissemination of scientific knowledge and clinical developments of **Photodiagnosis** and **Photodynamic Therapy** in all medical specialties. The journal publishes original articles, review articles, case presentations, "how-to-do-it" articles, Letters to the Editor, short communications and relevant images with short descriptions. All submitted material is subject to a strict peer-review process.

AUDIENCE

Professionals in all medical disciplines with an interest in medical and biological applications of lasers and light sources, and photodiagnosis/photodynamic therapy in the treatment of human disease.

IMPACT FACTOR

2019: 2.894 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

Current Contents - Clinical Medicine

Journal Citation Reports - Science Edition

Science Citation Index Expanded

Scopus

ScienceDirect

PubMed/Medline

PubMed/Medline

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

R. Allison, 21st Century Oncology Greenville, Greenville, North Carolina, United States

Emeritus Editor

K. Moghissi, Yorkshire Laser Centre, Goole, United Kingdom

Associate Editors

H. Barr, Gloucester, United Kingdom

R. Boyle, Hull, United Kingdom

K. Dixon, Goole, United Kingdom

M. Eljamel, Lanark, United Kingdom

L. Freitag, Hemer, Germany

K. Furukawa, Tokyo, Japan

R. Hamblin, Boston, Massachusetts, United States

C. Hopper, Bromley, United Kingdom

Z. Huang, Lakewood, Colorado, United States

H. Kato, Tokyo, Japan

T. Mang, Orchard Park, New York, United States

H. Moseley, Dundee, United Kingdom

L. Turnbull, Hull, United Kingdom

H. Walt, Zurich, Switzerland

H. Wolfson, Jacksonville, Florida, United States

Editorial Board

M. Adamek, Katowice, Poland

A. Akopov, St. Petersburg, Russian Federation
D. Allan, Manchester, United Kingdom
E. Allan, Knutsford, United Kingdom
P. Barber, Dundee, United Kingdom
A. Batlle, Buenos Aires, Brazil
K. Berg, Oslo, Norway
G. Downie, Mount Pleasant, Texas, United States
R Fekrazad, Tehran, Iran, Islamic Republic of
L. Gasparyan, Helsinki, Finland
G. Gasser, Zurich, Switzerland
P. Hillemanns, Hannover, Germany
T. Horvath, Brno, Czech Republic
S. Ibbotson, Dundee, United Kingdom
P. Jichlinski, Lausanne, Switzerland
A. Juzeniene, Oslo, Norway
N. Kashef, Tehran, Iran, Islamic Republic of
H. Kostron, Innsbruck, Austria
S. Lecleire, Rouen, France
M. Leroy, Suresnes, France
L. Li, Guangzhou, Guangdong, China
A. Makela, Helsinki, Finland
S. Mordon, Loos, France
T. Nakamura, Shimotsuga-gun, Japan
D. Robinson, Rotterdam, Netherlands
P Ross, Columbus, Ohio, United States
A. Sieron, Bytom, Poland
W. Stummer, Münster, Germany
I.B. Tan, Amsterdam, Netherlands
A. Thorpe, Leeds, United Kingdom
R. Waidelich, Munich, Germany
M. Wainwright, Liverpool, United Kingdom
X. Wang, Shanghai, China
A. Woong-Shick, Seocho-gu, Korea, Republic of
P. Ziolkowski, Wroclaw, Poland

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Scope

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy is an international journal for the dissemination of scientific knowledge and clinical developments of Photodiagnosis and Photodynamic Therapy in all medical specialities. The journal publishes original articles, review articles, case presentations, "how-to-do-it" articles, Letters to the Editor, short communications and relevant images with short descriptions. All submitted material is subject to a strict peer review process.

Types of manuscript

Research Papers should report original clinical studies or research not previously published or being considered for publication elsewhere. Work in Progress may also be submitted. See below for the standard layout. Submission of a manuscript to this journal gives the publisher the right to publish that paper if it is accepted. Manuscripts may be edited to improve clarity and expression.

Review articles, including institutional reviews of recent developments are welcome, and will undergo peer review. Reviews should have an abstract of up to 250 words.

Editorials

Although most Editorials in the journal are commissioned, authors may contact the Editor-in-Chief to request submission of their own Editorial.

Correspondence. Readers are encouraged to write about any topic that relates to photodiagnosis or photodynamic therapy, clinical, scientific, educational, social or economic. Letters should be no longer than 500 words and may include discussions on material previously printed in the Journal.

Case report will be considered if formatted as a research letter with 2 figures maximum. Maximum length is up to 1000 words with no headings and up to 6 references and 2 tables or figures. An abstract of 150-200 words should also be provided.

Short Communications should not exceed 1000 words and should consist of a background section (not to exceed 100 words), aims (not to exceed 50 words), methods (not to exceed 250 words), results (not to exceed 250 words) and conclusion (not to exceed 250 words). An

abstract of 150-200 words should also be provided. The editorial team reserves the right to decide which tables/figures submitted are necessary.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements.

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

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

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to

eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees who are willing to review the article (please obtain confirmation from the referees before submitting your manuscript). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Revised version of the manuscript

On the basis of the comments of the referees and editors, Authors may be asked to revise their manuscript. In order to facilitate the evaluation of the revisions by the referees and editors, upon revision, Authors are asked:

- to indicate all changes to the original manuscript by means of 'track changes'
- to add a letter for the referees, explaining how they dealt with all of the recommendations and questions from the referees. Authors should submit their revised version no later than 9 months after they were informed about the decision that the manuscript needs revision. If no revised manuscript is received 9 months after the decision, the manuscript will be considered as rejected.

PREPARATION

Style

Please use **no abbreviations**. Headlines and Subheadlines should be liberally employed in the Methods, Results, and Discussion sections. Use short paragraphs whenever possible. Clarity of expression, good syntax and the avoidance of medical jargon will be appreciated by the editors, reviewers and readers.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of one independent expert reviewer to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

Open access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. *Open Access*

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

2. *Subscription*

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees.
<https://www.elsevier.com/fundingbodies>

If you need to comply with your funding body policy you can apply for the CC-BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$USD 2,500** excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>

Layout of manuscript

Divide the manuscript into the following sections: Title page, Structured Abstract, Key words (3-6), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References. The editors will consider the use of other sections if more suitable for certain manuscripts.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

The **Structured Abstract**, of no more than 250 words, should be written with particular care since this will be the only part of the article studied by some readers. The preferred subheadings are: Background, Methods, Results and Conclusions.

The **Introduction** should be brief and set out the purposes for which the study has been performed along with relevant previous studies only where essential.

The **Materials and Methods** should be sufficiently detailed so that readers and reviewers can understand precisely what has been done without studying the references directly. The description may be abbreviated when well accepted techniques are used.

The **Results** should be presented precisely. Keep discussion of their importance to a minimum in this section of the manuscript.

The **Discussion** should directly relate to the study being reported. Do not include a general review of the topic.

Tables should be typed with double spacing and each should be on a separate sheet. They should be numbered consecutively with Arabic numerals, and contain only horizontal lines. Provide a short descriptive heading above each table with footnotes and/or explanations underneath.

Figures should ideally be submitted in high-resolution TIF format, or alternatively in GIF, JPEG/JPG or EPS format. The figures should be placed in separate files, named purely with the figure numbers (e.g. "Figure1.tif".) The cost of colour figures will be paid by the author. Legends for Figures should be typed with double-spacing on a separate sheet.

Gene Accession Numbers

For each and every gene accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. Example: (GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117).

Supplementary data

The journal accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university,

college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

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

Formats

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

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

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>.

Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/photodiagnosis-and-photodynamic-therapy>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

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

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

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

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are

sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission.

This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The

statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

Process of submission

Online submission

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy uses an online submission and review system. Authors can upload their article via the Elsevier Editorial System at <https://www.evise.com/profile/api/navigate/PDPDT>. By accessing the website Authors will be guided stepwise through the uploading of the various files. Editable file formats are necessary. We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect or LaTeX is preferred. Figure files (TIFF, EPS, JPEG) should be uploaded separately. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used. The system generates an Adobe Acrobat PDF version of the article which is used for the reviewing process. Authors, Reviewers and Editors send and receive all correspondence by e-mail and no paper correspondence is necessary.

For assistance please visit our Support Center.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions

for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying,

as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>