



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

MARIÉLLEN LONGO

Avaliação de diferentes protocolos de aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento da periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: Estudo histomorfométrico, imunoistoquímico, imunológico e microbiológico.

Araçatuba- São Paulo

2015



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

MARIÉLLEN LONGO

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Periodontia).

Orientadora: Professora Dra. Leticia Helena Theodoro

Co-orientador: Professor Titular Dr. Valdir Gouveia Garcia

Araçatuba- São Paulo

2015

Mariellen Longo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

L856a Longo, Mariéllen.
Avaliação de diferentes protocolos de aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento da periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: Estudo histomorfométrico, imunoistoquímico, imunológico e microbiológico/ Mariéllen Longo. - Araçatuba, 2015

178 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Letícia Helena Theodoro
Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

1. Periodontite 2. Quimioterapia 3. Raspagem dentária
4. Fotoquimioterapia I. T.

Black D6
CDD 617.64

Dados curriculares

Mariellen Longo

Nascimento: 26.01.1987 Porto Ferreira- SP

Filiação: Sebastião Longo
Roseli Aparecida dos Santos Longo

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

2010-2012: **Pós-Graduação em Odontologia**
Nível de Mestrado - ÀREA DE PERIODONTIA - Faculdade de
Odontologia de Araçatuba – UNESP

2012-2015: **Pós-Graduação em Odontologia**
Nível de Doutorado - ÀREA DE PERIODONTIA - Faculdade de
Odontologia de Araçatuba – UNESP

O maior prazer na vida é ter a paz que excede o entendimento. Hoje as palavras embargam num choro de felicidade, da alegria de percorrer um caminho tão sonhado. Neste peregrinar, por vezes houve sofrimento, angústias e decepções, porém nada foi superior a paz e ao amor de Deus.

ADeus

No silêncio desta hora, Entrego-me em espírito para o descanso de minha mente. Agradeço por tudo que recebi nesta fase da minha vida, em que tive oportunidade de ser testada. Obrigada meu Deus, pela vida! Por ter me dado uma família maravilhosa, saúde e disposição. Por ter me protegido,

Por ter me garantido serenidade, paciência e perseverança.

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

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

Por não permitir que desistisse nesta longa caminhada,

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

O Senhor sempre presente em todas as batalhas,

E hoje somos vitoriosos... como todos aqueles que caminham em Sua santa presença!

*“A melhor maneira que o homem dispõe para se aperfeiçoar,
é aproximar-se de Deus.”*

(Pitágoras)

Eu dedico esta conquista aos amores da minha vida, aos meus alicerces como pessoa e cidadã. Aqueles que fundamentam a minha história...

Aos meus Pais...

Esse trabalho não teria a mesma importância se não fosse para dedicá-lo a vocês. Sou muito grata por ter pais tão maravilhosos.

Sebastião e Roseli

Agradeço todos os dias à Deus por ter me dado pais tão maravilhosos, que sempre fizeram o possível e impossível para que estivéssemos bem, minha irmã e eu, que sem vocês hoje não teria conseguido chegar até aqui, e conquistado mais etapa em minha vida, sempre estiveram ao meu lado me incentivando!

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

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

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

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

*Tenho orgulho de ser filha de vocês! Jamais existirão palavras que descreva tudo o que representam pra mim! **Vocês são aqueles que serão eternos em minha vida...***

Amo muito vocês!

“Nos seus labores, o meu descanso... Nas suas preocupações, a minha tranquilidade... Nas suas lutas, a minha vitória... Nos seus cabelos brancos, a minha juventude... Nas suas lágrimas, o meu sorriso... Nas suas noites de insônia, os meus sonhos...”

*Irmã é uma dádiva de Deus... faz parte de mim!!! É a certeza de que nunca estou sozinha, de que tenho uma eterna amiga em quem posso confiar,
A maior riqueza da minha vida...*

A Minha Irmã (Gêmea)

Mayara

Sempre em meu coração e pensamento, agradeço todos os dias por Deus ter colocado você em minha vida como irmã!

Pessoa maravilhosa, agradeço muito a você por estar sempre perto de casa e poder estar mais perto do pai e da mãe, ajudando eles no que precisava enquanto eu estava longe, agradeço pelos incentivos e orações para que eu vencesse mais uma etapa em minha vida, sei que a ausência, a distância, foi muito difícil no começo, mas com o tempo pudemos verificar como uma faz falta a outra, e a importância de você em minha vida, amo você e agradeço pelo carinho, preocupação e paciência que teve comigo durante essa etapa.

Por entender que a minha distância teve um motivo nobre, e por saber que nossa ligação e amizade têm laços inquebráveis.

Sem você não teria conseguido chegar hoje até aqui, neste momento tão importante da minha vida e que você teve mérito junto comigo, por ter me escutado todas as vezes, me ajudando e tentando resolver meus problemas aqui, tentando entender meu trabalho, minhas dificuldades, hoje só tenho a te agradecer por mais esta conquista que conseguimos! Muito obrigada por cuidar do pai e da mãe todos esses anos que estive aqui em Araçatuba e olha que foram muitos heim 9 anos!

Muito obrigada por você existir em minha vida, sem você não sou ninguém, e posso acreditar que você foi um presente que Deus colocou na minha vida e que tive a sorte de nascer junto com você!

Amo muito você minha irmã!

*“Ser profundamente amado por alguém nos dá força;
amar alguém profundamente nos dá coragem.”*

Lao-Tse

“Quando sonhamos sozinhos, é só um sonho. Quando sonhamos juntos é o começo de uma nova realidade.”

A Meu Noivo Artur

Por ter compreendido e respeitado minha dedicação aos estudos, e acima de tudo me apoiando e estimulando a ir cada vez mais longe, me aconselhando nas dificuldades desta jornada, principalmente me escutando todos os dias por telefone ou pela internet quando eu chegava em casa, falando sobre as coisas que aconteciam aqui em Araçatuba, sobre meu projetos, análises e decisões....e você nunca reclamou sempre queria achar uma solução, se eu não tivesse você com essa força que me deu todos estes anos, não teria aguentado ficar tão longe de você e minha família!

***“A certeza de que somos amados fortalece nosso coração e diminui nossas dificuldades.”** E foi assim que aconteceu, você me deu força para enfrentar todas as dificuldades que tive que enfrentar, sobre faculdade, mestrado, doutorado e até mesmo na minha família sem você eu não teria conseguido chegar até aqui hoje!*

***“O verdadeiro amor não nos prende, mas paradoxalmente, prende nosso coração, incentivando-nos a crescer, a mudar, a ousar, incentivando-nos a dar o melhor de nós.”** E é assim que me sinto com você ao meu lado, me fazendo sempre querer ser uma pessoa melhor, me incentivando a crescer e dar o meu melhor em tudo! Obrigada por fazer parte da minha vida!*

Obrigada por ter respeitado os momentos que eu estava ausente para realização deste trabalho, nos finais de semana que não dava para nos vermos e pelo imenso amor depositado em nossa relação. Você é minha força, meu guia, estando presente comigo desde o início da minha graduação, do meu mestrado e hoje estou muito feliz por estar comigo em mais esta conquista tão importante da minha vida, são quase 9 anos juntos e foram quase 600km de distância, mas o amor nunca nos separou por esta distância e sim posso dizer hoje que só aumentou. Obrigada por estar ao meu lado!

*Assim peço a Deus para que eu possa sempre ver no fundo de seus olhos, a vitalidade que protege a metade do meu coração, porque tudo de mim ama tudo em você, você é o meu fim e meu começo. **Amo muito você!***

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

As Meus Familiares

Família...

Ao meu Avó José Longo (in memorian) Amo o senhor para sempre! Exemplo de pessoa, sempre torceu por nós!

A minha Avó Maria, com seus 92 anos espero poder conviver com a senhora por muito tempo, amo a senhora! Sempre preocupada com agente perguntando sempre ao meu pai como estou, apesar de longe.

A minha Avó Dalva está sempre na ativa, sempre trabalhando, batalhando, preocupada com agente, um exemplo de pessoa, amo a senhora!

Ao meu Avó Mateus, exemplo de superação, amo o senhor!

A minha tia Maria, tio Vicente, e meu primo Diego, família maravilhosa, que sempre está com agente em todos os momentos! Amo vocês demais! Tia Maria, uma pessoa que sempre gosto de estar perto, nos transmite alegria, e é sempre muito bom estar perto de você e poder conversar! Sempre me dá força quando preciso e tenta sempre nos ajudar com suas belas palavras! Amo muito vocês!

A tia Rosana, tio Genor e meus primos Valesca, Jaqueline e Leonardo, e agora também a minha priminha "Manuela" uma família maravilhosa, que esta sempre com agente! Amo muito vocês!

Ao meu cunhado Gregório Brito, muito obrigada por sua amizade, pela sua companhia sempre que vou para porto, e até mesmo aqui em Araçatuba quando veio fazer companhia para minha irmã e eu. Pessoa maravilhosa, com um coração enorme, e que sempre traz alegria, sempre animado, e que faz a minha irmã muito feliz! Você é uma pessoa muito especial, e agora será meu padrinho de casamento heim! Muito obrigada por sua amizade sempre!

À minha sogra Conceição Vilas Bôas e meu sogro Geraldo Vilas Bôas, pelo grande apoio em todos esses anos, pelo incentivo aos estudos e pela grande amizade, pessoas extremamente dedicadas ao trabalho e à sua família! Tenho muita sorte de poder conviver com vocês! Muito Obrigada!

Ao meu cunhado Jonas Vilas Bôas, pela grande amizade, paciência, pela grande ajuda quando precisava nos meus trabalhos, muito obrigada! Pessoa extremamente competente!

À minha cunhada Ester, cunhado Adriano e sua filha Corine (minha Daminha), pela grande amizade, pela companhia sempre agradável, pelos passeios juntos, uma família maravilhosa que tenho a sorte de poder estar junto, muito obrigada!

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

“Dê a quem você ama: asas para voar, raízes para voltar e motivos para ficar.”

Dalai Lama Dalai Lama alai Lama

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

Obrigada! Nada Seria possível sem vocês!

*A memória é a coisa mais linda, quando guardada e relida pelo Coração,
Sobre o passado é depositado um sentimento,
Quando olho para os olhos da memória vejo um amor que já foi vivido,
e hoje é vivo eternamente.*

(Geraldo Tinôco)

A realização deste trabalho não é mérito apenas meu. Ele é a concretização de um sonho e, para torná-lo possível, foi necessário muito auxílio pessoal e acadêmico, que recebi de pessoas que carregarei para sempre em minhas memórias e em meu coração.

Gratidão eterna é a palavra que resume o maior sentimento neste momento. A todos que representam a marca desta vitória, recebam meu carinho e admiração. Amo todos incondicionalmente!

Amiha Orientadora

Professora Dra. Leticia Helena Theodora

Uma pessoa mais que especial, uma pessoa iluminada que tive a honra de conhecer, trabalhar junto e conviver, pessoa maravilhosa, que me ensinou muito durante todos estes anos, mesmo no mestrado e agora como minha orientadora no Doutorado que tive o privilégio! Uma pessoa como poucas, dedicada, inteligente, competente, com um coração enorme, uma profissional exemplar! Muito obrigada pelo convívio diário que foi maravilhoso. Aprendi muito com você tanto nas pesquisas, como profissional, nas clínicas e até mesmo um aprendizado pessoal.

Obrigada por seu enorme esforço, atenção, carinho, ensinamentos transmitidos e dedicação, jamais estaria aqui hoje, meu eterno carinho, reconhecimento e agradecimento por tudo que você fez por mim, por este trabalho, com os artigos, você me ajudando em tudo que precisei, abrindo as portas da sua casa para me acolher nos finais de semana para comer uma pizza, conversar, distrair, tornar o meu final de semana melhor, não tenho palavras para agradecer por tudo isso que fez para mim, não tenho como falar o quanto isso significou para mim nestes anos, me dando força para seguir em frente! Obrigada pela confiança depositada em mim durante todos estes anos! Leticia você se tornou uma grande amiga, uma pessoa muito especial e que quero carregar esta nossa amizade para sempre. Agradeço a Deus a possibilidade de estar ao seu lado, de aprender com você e levarei para sempre o seu exemplo de dignidade, ética, alegria e humanidade. Muito Obrigada.

*“As pessoas entram em nossa vida por acaso,
mas não é por acaso que elas permanecem.”*

Lilian Tonet

Neste momento, o que sinto é uma mistura de sentimentos: a sensação de saudades e uma profunda gratidão...

Felizmente, o nosso Deus, por algum motivo que às vezes não é conhecido, nos traz presentes, na forma humana, que vem a cada dia nos auxiliar nesta caminhada...

À meu sempre Orientador,

Professor Titular Dr. Valdir Gouveia Garcia

Conviver com o senhor foi um grande privilégio e um grande aprendizado! Um presente de Deus encontrar o senhor nesta caminhada...

Uma vez li em um livro sobre o “fio do destino” – esse fio que pode se emaranhar, mas nunca se quebrar, e que conecta as pessoas por alguma razão, é isso que sinto sobre nossa amizade, uma grande amizade que foi construída com amor, respeito, lealdade, comprometimento, gratidão e fé que tornan-se laços inquebráveis.

Professor Valdir, aprendi com o senhor que a maior dádiva do professor é proporcionar ao aluno oportunidades que levam ao crescimento, assim sou eternamente grata por este crescimento que o senhor me proporcionou, pela oportunidade da convivência com o senhor, além do privilégio de aprender dia-a-dia, seja na pesquisa, na clínica ou no meu crescimento enquanto Ser humano.

Serenidade, humildade e paciência são características marcantes que o faz um Ser humano especial. Aprendo com o senhor sempre. Muito obrigado por confiar em mim, por abrir sua casa também, muitas vezes me chamando no final de semana para me distrair quando estava sozinha aqui em Araçatuba o senhor e a Letícia, não tenho palavras para agradecer por isto, por esta preocupação constante com o meu bem estar, com minha família, sempre disponível em tudo o que precisei, o senhor foi um pai para mim aqui em Araçatuba, tanto na pesquisa por me ensinar desde o começo e hoje eu estar aqui e tanto na vida pessoal. Nunca se esqueça de que a por toda a minha vida

serei grata pela oportunidade que o senhor me deu, desde a graduação até a defesa do Doutorado!

Meu muito obrigado e receba meu carinho! O senhor será sempre o meu Orientador!

Tem gente que Deus coloca na nossa vida só pra nos dar paz. Que nos empurra para o melhor de nós, que nos guia para o caminho do bem. Gente que é sorriso em dia feio, que é suporte quando parece faltar chão.

Tem gente que pensa e repensa jeitos de nos fazer bem, que se preocupa e demonstra. Gente que é abraço, mesmo de longe, e a certeza que tudo vai dar certo. Que empresta coração pra gente morar, que planta pensamentos bonitos nos dias da gente...

*Ao querido **Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida**, um exemplo de professor, um amigo que encontrei aqui na faculdade de Araçatuba, desde minha graduação até o Doutorado, você sempre esteve presente me ajudando no que eu precisasse, uma pessoa tranquila, carismática, sempre buscando o bem para as pessoas, um exemplo de pesquisador, um profissional exemplar, um clínico excelente com uma enorme capacidade de operar e ensinar, agradeço pela orientação, pelas conversas, ajuda com animais, laboratório, equipamentos, e muito obrigada pela ajuda e convivência nas clínicas de Pós-graduação e da Graduação.*

Muito obrigada por sua grande amizade, pelo carinho, respeito, pelo constante apoio, conhecimentos transmitidos, e sua imensa colaboração com tudo que estava ao seu alcance.

Obrigada pela agradável convivência diariamente no departamento, pela confiança, e por sua presença sempre tranqüila e amiga, cuja convivência proporcionou uma grande admiração. Muito Obrigada do fundo do meu coração!

*Ao querido **Prof. Dr. Álvaro Francisco Bosco**, pela distinção pessoal e profissional com que sempre me acolheu. Uma grande pessoa! Muito obrigada pelo conhecimento compartilhado sempre, por seus ensinamentos transmitidos, com a sabedoria e simplicidade de um grande mestre, por ser essa pessoa maravilhosa, competente, que sempre buscou nos ensinar o melhor e com muita força de vontade, sempre disposto a ajudar, com paciência e confiança. Obrigada pela agradável convivência toda semana, é uma alegria poder estar com o senhor sempre, essa pessoa calma, carinhosa, alegre que o senhor é!*

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

Obrigada do Fundo do meu coração!

Ao querido **Prof. Dr. Edilson Ervolino**, um professor admirável, extremamente competente que pude ter o privilégio de conhecer desde a minha Graduação, onde tive a felicidade e sorte de ter o senhor como meu professor e hoje me sinto honrada em te-lo como professor e um grande amigo na pós-graduação, por poder conviver com o senhor sendo esta pessoa maravilhosa. Professor, não sei como te agradecer por toda a ajuda, paciência e ensinamentos enriquecedores em todos os trabalhos e neste meu trabalho agora do doutorado. Seu extremo cuidado com as análises histológicas e imunoistoquímicas aprimoram brilhantemente os resultados dos trabalhos. Muito obrigada pela convivência, pelos dias agradáveis no seu departamento tanto para fazer as imunossagens como conversando, discutindo sobre trabalhos, me ajudando com aconselhamentos, e até me dando carona de vez em quando, quando não tinha como ir ao campus! Professor muito obrigada por compartilhar seus conhecimentos e sua amizade! O senhor é um grande exemplo de pesquisador, professor e ser humano, com um coração enorme, sempre querendo ajudar a todos! Um exemplo a ser seguido! Meus sinceros agradecimentos do fundo do meu coração! Obrigada por tudo! Sou eternamente grata

A querida **Professora Dr^a. Cristiane Duque**, por sua disponibilidade imediata em me ajudar nesta pesquisa na parte microbiológica do PCR, e na parte do imunológico com as análises estatísticas. Professora do departamento de Pediatria, uma professora extremamente competente, que pude conhecer e admirar. Agradeço especialmente, por seu respeito e carinho comigo, mesmo tão ocupada sempre me atendeu prontamente, me dando força quando desanimava com o PCR, quando eu achava que não ia dar certo, falando siga em frente, vai dar certo, respondendo meus emails prontamente. A senhora é um exemplo de professora, pesquisadora e ser humano, uma pessoa tranquila e extremamente talentosa! Receba minha admiração, e meus agradecimentos! Muito obrigada professora senão fosse a senhora nessa parte do PCR, eu não teria conseguido!

À Prof.^a Dr.^a Suely Bonfim, e sua equipe do Curso de Medicina Veterinária, agradeço pela grande colaboração profissional, contribuindo para a elaboração e execução desse trabalho. Professora apaixonada pelo que faz, competente e profissional. Obrigada pelo convívio agradável e carinhoso. É sempre um prazer estar em sua companhia!

À Prof.^a Dra. Maria José Hitomi Nagata, uma respeitosa professora, ética, justa, apaixonada pelo seu trabalho, exemplo de dignidade, competência profissional, uma pessoa admirável.

Agradeço pela cooperação, conhecimento, atenção e dedicação inigualável.

Pelo maravilhoso convívio diariamente, pelas conversas, sempre presente e disponível, fazendo o máximo para nos ajudar e ensinar, nos passando um pouco do seu conhecimento científico, sendo um exemplo de dedicação à pesquisa e de pessoa. Obrigada por tudo o que a senhora fez por mim!

Aos meus grandes Amigos, que me acompanharam nesta caminhada.....

Ao meu Grande e para Sempre Amigo Erivan Clementino Gualberto Jr., Uma pessoa muito especial que encontrei nesta caminhada e que vou guardar para sempre no meu coração! Pessoa determinada e que sempre está disposto a nos ajudar! Uma pessoa brilhante, com talentos admiráveis. Muito obrigada por tudo, você me ensinou muito durante todos esses anos desde minha iniciação até no doutorado, uma ótima companhia que eu sempre pude contar, obrigada por todos os momentos que convivemos, jamais terei como agradecer toda a ajuda, todas as gargalhadas, alegrias, até os cansaços, na periodontia, desde nos laboratórios até nas padarias.. rrsrrs, muitas vezes deixava de fazer suas coisas para me ajudar. Obrigada pela grande amizade que cultivamos, pelo respeito, carinho e aprendizado um com o outro, pelo grande apoio, torço muito por você. Obrigada pelo carinho e companhia sempre, mesmo longe agora você sempre está em meus pensamentos, você pra mim é muito especial e ter a tua companhia e a tua amizade é um grande privilégio.

Agradeço imensamente pela confiança e paciência comigo. Por me proporcionar aprendizado constante e partilhar do privilégio da sua convivência. Você é um exemplo de competência, garra e coragem.

À minha Grande e para Sempre Amiga Vivian Cristina Noronha Novaes, uma amiga verdadeira, e como dizem, “amigos agente não conhece e sim reconhece”, e foi assim com você, te reconheci como uma grande amiga aqui dentro da Perio e fora, uma pessoa maravilhosa, com quem eu já me identifiquei muito, sempre me ouvindo tentando me ajudar, uma pessoa extremamente dedicada com o que faz, um comprometimento enorme com a pesquisa, com os trabalhos e com sua família.

Com você pude aprender muitas coisas e te agradeço imensamente por isso! Um exemplo de mãe, esposa e família, pode ter certeza que você é um modelo a ser seguido. Vivian não tenho como te agradecer por tudo que fez por mim, muitas vezes abrindo as portas da sua casa para me acolher nos finais de semana quando eu ficava aqui sozinha,, isso significou muito para mim, me dando força para aguentar mais uma semana. Você, o Pedro e suas filhas (Laura e Helena) são pessoas muito especiais e

que tenho muito que agradecer por me acolherem tão bem em sua casa.

Uma família maravilhosa que tive o privilégio de conviver, vou sentir muita falta de você, das nossas conversas, dos seus conselhos e da nossa maravilhosa convivência diária!

Obrigada pela preocupação e carinho com que sempre teve comigo! Te desejo toda a sorte e sucesso do mundo! Você é muito especial, e espero que nossa amizade permaneça sempre, pois já esta guardada no meu coração!

*À amiga **Carol**, que estudou comigo desde a graduação, fizemos o mestrado e agora o doutorado juntas, uma pessoa extremamente dedicada, alegre, prestativa em tudo, uma pessoa carinhosa, amiga, extremamente competente. Obrigada pela grande amizade, pela maravilhosa convivência diária, companheirismo, pelas conversas, pelas caronas, ajuda no departamento. Meu sincero agradecimento, espero que você hoje consiga tudo o que deseja, terminando o Doutorado também, que tenha muito sucesso! Você é uma pessoa muito especial.*

*À amiga **Paula Faleiros (Paulinha)**, uma pessoa maravilhosa, que tive a oportunidade de conhecer no mestrado, uma pessoa com quem eu sempre pude contar, sempre feliz e sorrindo, uma pessoa com o coração enorme, sempre querendo ajudar a todos, obrigada por me ajudar com tudo. Pelas conversas no fim de tarde, por sua amizade sincera e verdadeira, pelas caronas... Desejo toda a felicidade do mundo à você, que você consiga tudo o que deseja tanto na vida profissional quanto na vida pessoal! Você é muito especial! Obrigada pela convivência, carinho e companhia sempre!*

*À amiga **Natália Pola**, pessoa alegre, guerreira, obrigada pela disponibilidade, amizade, companheirismo na periodontia, pelas boas gargalhadas, você é muito especial.*

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

À amiga **Naida Zanini Assen**, que entrou um pouco depois e se tornou uma pessoa muito especial para mim, uma grande amiga que vou levar para vida toda, em que sempre podia contar com sua ajuda e disponibilidade. Sua amizade foi muito importante para mim nestes 2 anos juntas convivendo diariamente no departamento, nas clínicas de perio me ajudando muito, nas cirurgias, e no laboratório de microbiologia, e que pude aprender muito com você. Obrigada pela ajuda, pelas conversas, aconselhamentos, caronas.... Você é uma pessoa muito especial, uma grande amiga, pessoa sempre de bem com a vida, animada, obrigada pela grande ajuda, e amizade sincera! Que você tenha sucesso em tudo que fizer! Meus sinceros agradecimentos!

À **Adrielle**, que pude conviver também nestes 2 anos, apesar de não trabalharmos juntas, sempre estávamos perto, conversando no departamento, saindo para comer algo, conversar. Uma pessoa muito amiga, que transmite alegria a todos ao seu redor, e que sempre é bom estar por perto, com um coração enorme, sempre querendo ajudar a todos, extremamente competente, feliz, animada, e que sempre pude confiar. Obrigada pela amizade, conversas, caronas..... Torço muito por você! Você é uma pessoa iluminada!

Ao **Fabrizio**, uma pessoa que se tornou um grande amigo para mim dentro da periodontia, sempre pude confiar em você, é uma pessoa maravilhosa, um coração bondoso, que veio de longe buscar seus objetivos, às vezes na dificuldade dos trabalhos, sempre tentando ajudar, sempre muito alegre, amigo, prestativo e competente. Obrigada pelas conversas amigas, aconselhamentos! Torço muito por você e te desejo a maior felicidade do mundo e agora com sua filhinha Luna! Muito Obrigada!

*Aos novos colegas da periodontia, **Alessandra, Eduarda, Eliane e Marcio**, obrigada pela alegre convivência. Boa sorte nesta nova etapa e que seus sonhos se realizem!*

*Ao **Marcio**, que entrou ano passado no Mestrado, mas que já estava com agente na iniciação, muito obrigada por sua amizade, convivência, pela ajuda com os animais, por carregar algumas caixas de ratos rsrrs, pela ajuda no departamento e até mesmo com as estatísticas, te desejo boa sorte nesta etapa de sua vida! Muito Obrigada!*

*Ao **Luiz**, que estava na iniciação científica e me ajudou algumas vezes com os animais e no departamento, uma pessoa muito prestativa!, Muito obrigada!*

*Aos **alunos da graduação**, pela oportunidade em compartilharmos informações e aprendizado.*

Em especial, agradeço imensamente:

*Às meninas da iniciação científica.... **Adrielle, Camila, Lidiane, Ludimila, Renata, Tamara, Thaiane, Marilise e Natalia**.... pela grande ajuda no departamento, desde as cirurgias com os animais e até no laboratório de microbiologia, vocês me ajudaram muito! Obrigada pela sempre agradável convivência que tivemos ao longo desses anos. Torço muito por você!*

*Ao **Joilson**, gentil e atencioso, me ajudou diversas vezes, esclarecendo os caminhos burocráticos que deveriam ser seguidos. Obrigada!*

Podem ter certeza que aprendi muito mesmo com cada um de vocês. Obrigada do fundo do meu coração!

*Ao **Bruno Theodoro**, pela grande ajuda nas traduções de textos para o inglês em muitos trabalhos, e por sua amizade! Muito Obrigada!*

A *todos os professores do Doutorado.*

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

À *todos os colegas do Mestrado e Doutorado.*

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

*“Amigos de verdade não esperam que os procuremos,
simplesmente se fazem presentes”.*

(Augusto Branco)

Foram muitas as pessoas que estiveram ao meu lado durante essa caminhada. Talvez eu não consiga expressar toda a minha gratidão por meio de palavras...

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa da diretora **Profa Adj. Ana Maria Pires Soubhia** e do Senhor Vice-Diretor **Prof. Titular Wilson Roberto Poi** por proporcionarem a realização desta pesquisa e crescimento profissional, pela oportunidade de realização dos cursos de Graduação, Mestrado e Doutorado.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” **Profa. Adj. Maria José Hitomi Nagata**, pela competência e afincos na condução da nossa pós-graduação. Estendo os meus sinceros agradecimentos ao vice-coordenador, o **Prof. Adj. Celso Koogi Sonoda**, um exemplo de professor e ser humano.

A **colega Natália da pós-graduação em Odontopediatria**, pela disposição em me ajudar sempre na pesquisa, na parte do PCR e por sua amizade.

A **Professora Morgana Guimarães** da Faculdade de odontologia de Araraquara – UNESP, pela enorme ajuda para execução de parte deste trabalho.

Aos Professores **Cláudio Aparecido Casatti**, **Roelf Justino Cruz Rizzolo**, **Alaide Gonçalves** e **José Américo de Oliveira**, aos funcionários **André** e **Sandra** por tornarem o Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba a minha segunda casa nesta faculdade.

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

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

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

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

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

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

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

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

Aos pacientes, pela credibilidade e confiança depositadas a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas e, como sempre estaremos em nossas vidas, aprendendo constantemente. Minha eterna gratidão.

Aos animais, por servir à humanidade com suas vidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Doutorado durante os primeiros meses do curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro e com isso, permitir que fosse possível a realização do doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Doutorado (Processo 2012/05864-0), e do Auxílio à Pesquisa (Processo nº 2012/08649-3) indispensável para a realização deste estudo e minha sobrevivência na pós-graduação.

Aos professores que compõem a Banca Examinadora, a Profa. Dra. Letícia Helena Theodoro, Prof. Dr. Edilson Ervolino, Profa. Dra. Cristiane Duque, Prof. Dr. Renato Casarin e Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, por terem aceitado prontamente o convite para avaliar este trabalho, pela paciência e esforços realizados para conseguirmos ajustar a data da defesa, e por terem dedicado seu tempo e atenção para correção desta tese.

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

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

OBRIGADA!

“Um profissional é uma pessoa que consegue dar o melhor de si em um momento no qual ele não se sente particularmente assim.”

Alistair Cooke

O homem só fracassa, quando desiste de lutar.

Todos os dias, me levanto para vencer.

Aristóteles

Em atalhos mergulhei nos caminhos do saber. Conheci a inquietude, o descontentamento, mas também o fascínio irresistível do maravilhoso. Pequeno ante o grandioso, grande ante a pequenez do espírito e a pretensa força dos poderosos, de tudo procurei me aproximar, tangido pela atração do desconhecido, do irrealizado. Não haveria contudo, atalho ou caminho, não estivesse em mim a força irresistível do prazer em percorrê-lo.

Leonardo da Vinci

LONGO, M. **Avaliação de diferentes protocolos de aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento da periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: Estudo histomorfométrico, imunoistoquímico, imunológico e microbiológico** [Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

Resumo Geral

Objetivo: Este estudo avaliou a influência de múltiplas sessões da Terapia com Laser em Baixa Intensidade (LLLT) coadjuvante a raspagem e alisamento radicular (RAR), e da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) associada ou não ao tratamento mecânico de RAR, no tratamento da periodontite experimental (PE) em ratos submetidos à quimioterapia com 5-Fluorouracil. **Materiais e Métodos:** Duzentos e dezesseis ratos foram submetidos à indução da PE por meio de ligadura no primeiro molar inferior direito e esquerdo. Após 7 dias a ligadura foi removida e os animais separados aleatoriamente em 9 grupos: PE (n=24) – sem tratamento; 5FU-PE (n=24) – tratados sistemicamente com 5FU (60mg/kg e 40mg/kg); 5FU-PE-RAR (n=24) – tratados sistemicamente com 5-FU e com RAR; 5FU-PE-RAR-1LLLT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU, com RAR seguida da LLLT (sessão única) (660 nm; 0,035 W; 4,2 J, 120 segundos; 1,23 W/cm²); 5FU-PE-RAR-4LLLT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU, com RAR seguida da LLLT (0, 24, 48 e 72 horas); 5FU-PE-RAR-1aPDT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU, com RAR e 1 episódio de aPDT (LLLT + azul de metileno); 5FU-PE-RAR-4aPDT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU, com RAR e aPDT (0, 24, 48, 72 horas); 5FU-PE-1aPDT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU seguida da aPDT; 5FU-PE-4aPDT (n=24) -

tratados sistemicamente com 5-FU, seguida da aPDT (0, 24, 48, 72 horas). Oito animais de cada grupo foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após tratamento local. A área de perda óssea (PO) na região de furca foi analisada histometricamente, histologicamente e análise dos padrões de imunomarcção para TRAP, PCNA RANKL, OPG e CASP-3-AT foram realizadas. A quantificação da citocina PGE₂ foi avaliada pelo ELISA e TNF- α e IL-6 foram avaliadas pelos Kits de ensaio Multiplex. A prevalência de periodontopatógenos, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Prevotella nigrescens* (*Pn*), *Prevotella intermedia* (*Pi*) e *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) foram avaliados pela técnica da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Os dados foram submetidos à análise estatística ($\alpha = 5\%$). **Resultados:** Nos grupos 5FU-PE, 5FU-PE-RAR e 5FU-PE-1LLLT houve maior PO comparada aos animais do grupo PE e menor PO no grupo 5FU-PE-4LLLT, quando comparado ao grupo 5FU-PE aos 7 dias; houve menor PO aos 30 dias nos grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT e 5FU-PE-4aPDT quando comparado ao 5FU-PE-RAR, além de redução de células TRAP-positivas, maior número de células PCNA-positivas, com redução de imunomarcção de RANKL. Houve redução significativa de TNF- α e IL-6 no grupo 5FU-PE-4LLLT aos 30dias. Houve menor expressão de PGE₂ no grupo 5FU-PE-RAR-1aPDT e 5FU-PE-RAR-4aPDT e menor expressão de TNF- α e IL-6 nos grupos tratados com aPDT. Houve redução significativa de *Pn* aos 7 e 30 dias no grupo 5FU-PE-1LLLT e aos 30 dias no grupo 5FU-PE-4LLLT. No grupo 5FU-PE-1aPDT e 5FU-PE-4aPDT houve redução significativa de *Aa* aos 30 dias e no grupo 5FU-PE-4aPDT houve redução de *Pn* aos 15 dias, quando comparado com 5FU-PE. **Conclusão:** Conclui-se que o 5-FU agravou a periodontite, e que múltiplas sessões de LLLT coadjuvante à RAR, e episódios repetidos de aPDT como terapia coadjuvante ou alternativa foram efetivos no tratamento de PE, em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU.

Palavras-chave: Periodontite; Fotoquimioterapia; Quimioterapia; Lasers

LONGO, M. **Evaluation of different protocols of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of the induced periodontitis in rats treated with chemotherapy: a histomorphometric, immunohistochemical, immunologic and microbiological study** [Thesis]. Araçatuba: Univ Estadual Paulista; 2015.

General Abstract

Objective: This study evaluated the influence of multiple sessions of Low Level Laser Therapy (LLLT), adjuvant to the scaling and root planing (SRP), and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), with or without the mechanical treatment of SRP, in the treatment of experimental periodontitis (EP) in rats treated with chemotherapy 5-fluorouracil (5-FU). **Materials and methods:** Two hundred and sixteen animals were subjected to induction of EP by ligature in mandibular first molar right and left. 7 days after the ligature was removed, the animals were randomly divided into 9 groups: EP (n=24) - no treatment; 5FU-EP (n=24) - systemically treated with 5-FU (60mg/kg and 40mg/kg); 5FU-EP-SRP (n=24) - systemically treated with 5-FU, with SRP; 5FU-EP-SRP-1LLLT (n= 24) - systemically treated with 5-FU, with SRP, followed by LLLT (single session) (660 nm, 0.035 W; 4.2 J, 120 seconds; 1.23 W/cm²); 5FU-EP-SRP-4LLLT (n= 24) - systemically treated with 5-FU, with SRP, followed by LLLT (0, 24, 48 and 72 hours); 5FU-EP-SRP-1aPDT (n=24) - systemically treated with 5-FU, with SRP, followed by one application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) (LLLT + methylene blue); 5FU-EP-SRP-4aPDT (n=24) - systemically treated with 5-FU, with SRP followed by aPDT (0, 24, 48, 72 hours); 5FU-EP-1aPDT (n=24) - systemically treated with 5-FU followed by aPDT; 5FU-EP-4aPDT (n=24) - treated systemically with 5-FU, followed by treatment with aPDT (0, 24, 48, 72 hours). Eight animals in each group were euthanized at 7, 15 and 30 days after local treatment. The

area of bone loss (BL) in the furcation region was analyzed histometrically, histologically and analysis of immunostaining patterns for RANKL, OPG, TRAP, PCNA and CASP-3-AT were performed. Quantity of cytokine was measured by ELISA for PGE₂ and TNF- α and IL-6 were evaluated by kits multiplex assays. The prevalence of periodontopathogens *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Prevotella nigrescens* (*Pn*), *Prevotella intermedia* (*Pi*) and *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) were evaluated by Polymerase Chain Reaction (PCR). Data were subjected to statistical analysis ($\alpha = 5\%$). **Results:** In 5FU-EP, 5FU-EP-SRP and 5FU-EP-1LLLT groups there was a higher BL compared to animals of the EP group and less BL in 5FU-EP-4LLLT group, when compared to 5FU-EP group at 7 days; there was lower BL at 30 days in the 5FU-PE-RAR-4aPDT group and 5FU-PE-4aPDT group, compared to 5FU-PE-RAR, and reduction of TRAP-positive cells, more PCNA-positive cells with reduction immunostaining of RANKL. There was significant reduction of TNF- α and IL-6 in the 5FU-EP-SRP-4LLLT group at 30days. There was a lower expression of PGE₂ in 5FU-EP-SRP-1aPDT group and 5FU-EP-SRP-4aPDT group, and a lower expression of TNF- α and IL-6 in the groups treated with aPDT. There was a significant reduction of *Pn* at 7 and 30 days in the 5FU-EP-1LLLT group and at 30 days in the 5FU-EP-4LLLT group. In 5FU-EP-1aPDT group and 5FU-EP-4aPDT there was significant reduction of *Aa* at 30 days and in 5FU-PE-4aPDT group there was decreased *Pn* at 15 days, compared with 5FU-EP. **Conclusion:** We concluded that 5-FU aggravated periodontitis, and that LLLT multiple sessions adjuvant to the SRP and repeated episodes of aPDT as an adjunct or alternative therapy were effective in the treatment of EP in rats subjected to chemotherapy with 5-FU.

Key-words: Periodontitis; Photochemotherapy; Chemotherapy; Lasers

CAPÍTULO 1

- Figura 1** Fotomicrografias do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando a magnitude da resposta inflamatória local, o nível de perda óssea alveolar e o processo de reparo periodontal nos grupos 5FU-PE (**a, e, i, m**), 5FU-PE-RAR (**b, f, j, n**), 5FU-PE-RAR-1LLLT (**c, g, k, o**) e 5FU-PE-RAR-4LLLT (**d, h, l, p**) aos 7 (**a-h**) e aos 30 (**i-p**) dias. Notar que os grupos 5FU-PE-RAR-1LLLT e 5FU-PE-RAR-4LLLT apresentam, aos 7 dias, uma menor magnitude na inflamação local (**c, d, g, h**) e, aos 30 dias, um curso mais favorável no processo de reparação periodontal (**k, l, o, p**). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; n, restos de osso necrosado. Aumento original: (**a-d**) e (**i-l**): 40x; (**e-h**) e (**m-p**): 160x. Barras de escala: (**a-d**) e (**i-l**): 500 μm ; (**e-h**) e (**m-p**): 100 μm . Coloração: hematoxilina e eosina (H&E).
- Figura 2** Gráfico mostrando média e desvio-padrão da área de perda óssea alveolar (mm^2) na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais e períodos. Abreviações e símbolos: ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PE no mesmo período; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR no mesmo período; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE no mesmo período.
- Figura 3** Imunomarcção para TRAP e PCNA na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (**a**) Gráfico mostrando média e desvio-padrão da quantidade de células TRAP-positivas por mm^2 nos diferentes grupos experimentais e períodos. (**b-e**) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para TRAP (setas azuis) nos grupos 5FU-PE (**b**), 5FU-PE-RAR (**c**), 5FU-PE-RAR-1LLLT (**d**) e 5FU-PE-RAR-4LLLT (**e**) aos 7 dias. (**f**) Gráfico mostrando média e desvio-padrão da quantidade de células PCNA-positivas por mm^2 nos diferentes grupos experimentais e períodos. (**g-j**) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para PCNA (setas vermelhas) nos grupos 5FU-PE (**g**), 5FU-PE-RAR (**h**), 5FU-PE-RAR-1LLLT (**i**) e 5FU-PE-RAR-4LLLT (**j**) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: ao, osso

alveolar; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR no mesmo período; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PE no mesmo período; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE no mesmo período. Aumento original: **(b-e)** e **(g-j)**: 1000x. Barras de escala: **(b-e)** e **(g-j)**: 25 µm. Contra-coloração: **(b-e)**: Hematoxilina de Harris; **(g-j)**: *fast green*.

Figura 4

Imunomarcção para RANKL, OPG e CASP-3-AT na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. **(a-b)** Gráfico mostrando a distribuição dos escores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcção para RANKL **(a)** e OPG **(b)**. **(c-f)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para RANKL (setas azuis) nos grupos 5FU-PE **(b)**, 5FU-PE-RAR **(d)**, 5FU-PE-RAR-1LLLTT **(e)** e 5FU-PE-RAR-4LLLTT **(f)** aos 7 dias. **(g-j)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OPG (setas azuis) nos grupos 5FU-PE **(g)**, 5FU-PE-RAR **(h)**, 5FU-PE-RAR-1LLLTT **(i)** e 5FU-PE-RAR-4LLLTT **(j)** aos 15 dias. **(k)** Gráfico mostrando média e desvio-padrão da quantidade de osteócitos CASP-3-AT-positivos por mm² de osso alveolar nos diferentes grupos experimentais e períodos. **(l-m)** Fotomicrografias evidenciando um osteócito CASP-3-AT-negativo **(l)** e osteócito CASP-3-AT-positivo **(m)** no osso alveolar. Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar; A, diferença estatisticamente significativa entre os períodos em relação aos 7 dias, considerando cada grupo isoladamente, §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR no mesmo período; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PE no mesmo período; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE no mesmo período. Aumento original: **(c-j)**: 1000x; **(l-m)**: 5000x. Barras de escala: **(c-j)**: 25 µm; **(l-m)**: 5 µm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

Figura 5

Gráficos evidenciando a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* **(a)**, *P. gingivalis* **(b)**, *P. nigrescens* **(c)** e *F. nucleatum* **(d)** nos diferentes grupos experimentais e períodos. Letras maiúsculas diferentes (A, B e C) representam diferença estatisticamente significativa entre os períodos, considerando cada grupo isoladamente. Símbolos: ‡: Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE no mesmo período. §: Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR no mesmo período.

CAPÍTULO 2

Figura 1 Fotomicrografias do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando a magnitude da resposta inflamatória local, o nível de perda óssea alveolar e o processo de reparo periodontal nos grupos nos grupos 5FU-PE (**a, e, i, m**), 5FU-PE-RAR-1aPDT (**b, f, j, n**), 5FU-PE-RAR-4aPDT (**c, g, k, o**) e 5FU-PE-4aPDT (**d, h, l, p**) aos 7 (**a-h**) e aos 30 (**i-p**) dias. Notar que os grupos 5FU-PE-RAR-1aPDT, 5FU-PE-RAR-4aPDT e 5FU-PE-4aPDT apresentam, aos 7 dias, uma menor magnitude na inflamação local (**c, d, g, h**) e, aos 30 dias, um curso mais favorável no processo de reparação periodontal (**k, l, o, p**). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; n, restos de osso necrosado. Aumento original: (**a-d**) e (**i-l**): 40x; (**e-h**) e (**m-p**): 160x. Barras de escala: (**a-d**) e (**i-l**): 500 μm ; (**e-h**) e (**m-p**): 100 μm . Coloração: hematoxilina e eosina (H&E).

Figura 2 Gráfico mostrando média e desvio-padrão da área de perda óssea alveolar (mm^2) na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais e períodos. Abreviações e símbolos: ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PE no mesmo período; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT no mesmo período; ||, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR no mesmo período.

Figura 3 Imunomarcacão para TRAP e PCNA na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (**a**) Gráfico mostrando média e desvio-padrão da quantidade de células TRAP-positivas por mm^2 nos diferentes grupos experimentais e períodos. (**b-e**) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para TRAP (setas azuis) nos grupos 5FU-PE (**b**), 5FU-PE-RAR-1aPDT (**c**), 5FU-PE-RAR-4aPDT (**d**) e 5FU-PE-4aPDT (**e**) aos 7 dias. (**f**) Gráfico mostrando média e desvio-padrão da quantidade de células PCNA-positivas por mm^2 nos diferentes grupos experimentais e períodos. (**g-j**) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para PCNA (setas vermelhas) nos grupos 5FU-PE (**g**), 5FU-PE-RAR-1aPDT (**h**), 5FU-PE-RAR-4aPDT (**i**) e 5FU-PE-4aPDT (**j**) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar; ¶ Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT no mesmo período; § Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo

5FU-PE-RAR-1aPDT no mesmo período; ‡Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PE no mesmo período; † Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-1aPDT no mesmo período. Aumento original: **(b-e)** e **(g-j)**: 1000x. Barras de escala: **(b-e)** e **(g-j)**: 25 µm. Contra-coloração: **(b-e)**: Hematoxilina de Harris; **(g-j)**: *fast green*.

Figura 4

Imunomarcção para RANKL, OPG e CASP-3-AT na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. **(a-b)** Gráfico mostrando a distribuição dos escores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcção para RANKL **(a)** e OPG **(b)**. **(c-f)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para RANKL (setas azuis) nos grupos 5FU-PE **(b)**, 5FU-PE-RAR-1aPDT **(d)**, 5FU-PE-RAR-4aPDT **(e)** e 5FU-PE-4aPDT **(f)** aos 7 dias. **(g-j)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OPG (setas azuis) nos grupos 5FU-PE **(g)**, 5FU-PE-RAR-1aPDT **(h)**, 5FU-PE-RAR-4aPDT **(i)** e 5FU-PE-4aPDT **(j)** aos 15 dias. **(k)** Gráfico mostrando média e desvio-padrão da quantidade de osteócitos CASP-3-AT-positivos por mm² de osso alveolar nos diferentes grupos experimentais e períodos. **(l-m)** Fotomicrografias evidenciando um osteócito CASP-3-AT-negativo **(l)** e osteócito CASP-3-AT-positivo **(m)** no osso alveolar. Abreviações e símbolos: ao, osso alveolar; A diferença estatisticamente significativa entre os períodos em relação aos 7 dias, considerando cada grupo isoladamente. §Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5-FU-PE-4aPDT no mesmo período; ‡ Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5-FU-PE-RAR-4aPDT no mesmo período; ¶ Diferença estatisticamente significativa em relação o grupo 5-FU-PE-1aPDT no mesmo período. Aumento original: **(c-j)**: 1000x; **(l-m)**: 5000x. Barras de escala: **(c-j)**: 25 µm; **(l-m)**: 5 µm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

Figura 5

Gráficos evidenciando a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* **(a)**, *P. gingivalis* **(b)**, *P. nigrescens* **(c)** e *F. nucleatum* **(d)** nos diferentes grupos experimentais e períodos. Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos, considerando cada grupo isoladamente. Símbolos: §, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT no mesmo período. ¶ Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE no mesmo período. ‡ Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PE no mesmo período.

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Média/Mediana (mínimo-máximo) dos valores obtidos para os biomarcadores proinflamatórios (PGE ₂ , TNF- α e IL-6) nos diferentes grupos experimentais e períodos. Letras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os tempos, considerando cada grupo isoladamente, segundo o teste de Mann Whitney, $p \leq 0,05$. Símbolos mostram diferença estatística entre os grupos experimentais, segundo o teste Mann-Whitney, $p \leq 0,05$: * Não houve diferença estatística entre os grupos considerando cada tempo isoladamente, segundo o teste de Mann Whitney, $p > 0,05$.	68
----------	---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Média/Mediana (mínimo-máximo) dos valores obtidos para os biomarcadores proinflamatórios (PGE ₂ , TNF- α e IL-6) nos diferentes grupos experimentais e períodos. Letras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os tempos, considerando cada grupo isoladamente, segundo o teste de Mann Whitney, $p \leq 0,05$. Símbolos mostram diferença estatística entre os grupos experimentais, segundo o teste Mann-Whitney, $p \leq 0,05$: * Não houve diferença estatística entre os grupos considerando cada tempo isoladamente, segundo o teste de Mann Whitney, $p > 0,05$.	
----------	---	--

Lista de Abreviaturas e Siglas

DP- Doença Periodontal

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa.

IL-1- interleucina 1.

RANKL- Receptor ativador de NF-Kappa B ligante.

OPG - Osteoprotegerina.

IL-6 – Interleucina 6.

IL-10- Interleucina 10.

5-FU- 5-Fluorouracil.

SRP- Scaling and Root Planing.

EP- Experimental Periodontitis.

MTX- metotrexato.

RNA- Ácido ribonucleico.

DNA- Ácido desoxiribonucleico.

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

LLLT- Terapia com laser em baixa intensidade.

J/cm² - Joules por centímetro quadrado.

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

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

IL-1 β - Interleucina 1 β .

ATP- Trifosfato de adenosina.

RAR – Raspagem e Alisamento Radicular.

aPDT- Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

RANK - Receptor ativador de NF-Kappa B.

PE – Periodontite Experimental.

InGaAlP- Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo.

μ L- Microlitro - Unidade de volume equivalente à milionésima parte de um litro

μ m - Micrômetro ou Micrómetro - uma unidade de medida (a milionésima parte do metro).

HE- Hematoxilina e Eosina.

TRAP- Fosfatase Ácida Tartarato Resistente.

PCNA- Antígeno Nuclear de Proliferação Celular.

CASPASE- Cysteine-Aspartic-Acid-Proteases.

PCR- Reação de Polimerase em cadeia.

Pg - Porphyromonas gingivalis.

Aa - Aggregatibacter actinomycetemcomitans.

Pn- Prevotella nigrescens.

Pi- Prevotella intermédia.

Fn - Fusobacterium nucleatum.

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético.

TBE- Tris-ácido bórico e EDTA.

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

PGE₂- prostaglandina E₂.

PO- Perda Óssea.

AM- Azul de Metileno.

Lista de Anexos

Anexo A	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)	156
Anexo B	Normas de publicação segundo o Periódico “Journal of Supportive Care in Cancer”	157
Anexo C	Normas de publicação segundo o Periódico “Antimicrobial Agents and Chemotherapy”	166

Sumário

1 Introdução Geral	41
2 Capítulo 1 - Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) como coadjuvante no tratamento da periodontite induzida em ratos submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil.	61
2.1 Resumo.....	62
2.2 Abstract.....	64
2.3 Introdução.....	66
2.4 Materiais e Métodos.....	69
2.5 Resultados.....	78
2.6 Discussão.....	84
2.7 Referências.....	90
3 Capítulo 2 - Efeito de repetidos episódios de terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento da periodontite experimental em ratos submetidos à quimioterapia com 5-Fluorouracil.	107
3.1 Resumo.....	108
3.2 Abstract.....	110
3.3 Introdução.....	112
3.4 Materiais e Métodos.....	116
3.5 Resultados.....	125
3.6 Discussão.....	132
3.7 Referências.....	138
Anexos	156

1 Introdução Geral¹

A periodontite é uma doença inflamatória de etiologia multifatorial que se desenvolve em resposta a presença de bactérias específicas (FRANCO et al. 2014), conduz a destruição dos tecidos periodontais, pode surgir a partir de interações dinâmicas entre fatores microbiológicos e resposta imune do hospedeiro (MERCHANT et al. 2005). A bolsa periodontal pode conter até 400 espécies de bactérias que são organizadas em biofilmes (PASTER 2000; DEWHIRST 2009), e os colonizadores iniciais predominantes da placa bacteriana subgingival são *Actinomyces sp.* e estreptococos (XIMENEZ-FYVIE et al. 2000), seguidos pelo *Fusobacterium nucleatum (Fn)* e *Porphyromonas gingivalis (Pg)*. (KOLENBRANDER et al. 2002). A infecção bacteriana aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina (IL-1), e estimula a produção de mediadores secundários como quimiocinas e prostaglandinas (OKADA et al. 1998). Estes mediadores estão associados com a migração de células inflamatórias e progressão de osteoclastogênese (GRAVES 2008; BLOEMEN et al. 2011), podendo aumentar a expressão de RANKL (Receptor ativador de NF-Kappa B ligante), enquanto diminui a produção de OPG (Osteoprotegerina) em osteoblastos (NAKASHIMA et al. 2000), causando destruição nos tecidos periodontais, incluindo o osso alveolar (GARLET et al. 2010).

O TNF- α aumenta a atividade dos osteoclastos através do sistema de RANKL ou diretamente estimula pré-osteoclastos a se diferenciarem em osteoclastos maduros (BOYCE et al. 2005), enquanto a interleucina (IL-6) indiretamente aumenta a

¹ Texto escrito de acordo com as Normas da ABNT

reabsorção osteoclástica do osso por meio da expressão de RANKL e IL-1 por osteoblastos (PALMQVIST et al. 2002). Inversamente vias reguladoras mediadas por citocinas anti-inflamatórias tais como IL-10 podem proteger os tecidos periodontais (PIMENTEL et al. 2012). A RANKL é expressa por osteoblastos em uma proteína ligada à membrana (MIZUNO et al. 2002), e também pode ser expressa por outros tipos de células, incluindo fibroblastos, linfócitos T e B. RANKL é expressa em níveis baixos em fibroblastos, no entanto, a sua expressão é induzida em resposta a toxina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) (LERNER 2006). Além disto, fatores ambientais e sistêmicos são considerados um dos possíveis fatores etiológicos da periodontite (NISHIMURA et al. 2007).

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo. Sua origem se dá por condições multifatoriais. Esses fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o câncer (carcinogênese). De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês International Agency for Research on Cancer), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer. No Brasil, a estimativa para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema no país.

A ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia sozinhas ou em combinação, são os tratamentos mais comuns utilizados para o câncer (HONG et al. 2010). A

radioterapia e quimioterapia frequentemente causam danos diretos às estruturas orais (tecido duro e mole), e danos indiretos podem surgir de uma toxicidade sistêmica (HONG et al. 2010). Nos tecidos orais, o efeito citotóxico e o estado de imunossupressão conduzem o paciente à mucosite oral, hemorragias, hipofunção da glândula salivar e infecção oral (SONIS et al. 2004; JENSEN et al. 2003; HOFER et al. 2004; EPSTEIN et al. 2002). A mucosite oral é uma lesão ulcerativa dolorosa, resulta na destruição da mucosa oral como uma barreira anatômica, resultando no aumento de risco à infecção, principalmente durante a imunossupressão (ZEGARELLI et al. 1993).

A utilização dos antibióticos tenta suprimir patógenos na microflora oral e intestinal, diminuindo o risco de infecção nos pacientes tratados com quimioterapia (MEISENBERG et al. 1996). Porém estes pacientes podem desenvolver resistência bacteriana geralmente por bactérias gram-negativas (YOSHIOKA et al. 1982). Estudos experimentais em ratos tem demonstrado que drogas tais como metotrexato (MTX), cisplatina, doxorubicina, etoposídeo, ciclofosfamida, e 5-fluorouracil (5-FU), podem causar uma redução no crescimento ósseo, e massa óssea (XIAN et al. 2007; XIAN et al. 2007; XIAN et al. 2004). O 5-FU é um antimetabolito específico da fase do ciclo celular (LOKICH 1998), classificado como um análogo da base pirimidina que adiciona um átomo de flúor na posição 5, substituindo um átomo de hidrogênio e danificando células malignas de duas formas: por inibir o timidilato sintase e por ligação de RNA (MAZZEO et al. 2009). Devido a sua estrutura, o 5-FU pode interferir com o metabolismo de nucleotídeo e pode ser incorporado dentro do RNA e DNA, conduzindo a citotoxicidade e morte celular (NOORDHUIS et al. 2004).

Vários estudos tem demonstrado que o 5-FU causa apoptose nos tecidos, como epitélio intestinal (IJIRI et al. 1983; PRITCHARD et al. 1999) e em linhas de células epiteliais (TONG et al. 2000), além disto, causa imunossupressão sistêmica e danifica a

integridade epitelial da cavidade oral (VON BÜLTZINGSLÖWEN et al. 1999). Estudo recente comprovou em animais que a quimioterapia com 5-FU promove maior perda óssea alveolar, promovendo necroses ósseas extensas, danifica o epitélio juncional na doença periodontal (DP) induzida em ratos e, além disto, a raspagem e alisamento radicular (RAR) apenas não são eficientes para controlar estas alterações (Garcia et al. 2014).

O tratamento não cirúrgico das DP consiste na RAR (BETSY et al. 2014), que remove o biofilme e cálculo. No entanto, esta remoção pode ser prejudicada em áreas com difícil acesso a instrumentação mecânica como, lesões de furca, bolsas profundas e concavidades (SOUZA et al. 2013). O tratamento convencional inclui a combinação da terapia mecânica e administração de antibióticos sistêmicos (DEAS & MEALEY 2010). Uma alternativa aos antibióticos sistêmicos é a administração de agentes antimicrobianos diretamente na bolsa periodontal (BETSY et al. 2014). Estas terapias convencionais resultam na cicatrização dos tecidos periodontais já inflamados que dependem em grande parte dos eventos celulares e moleculares associados com a cicatrização de feridas (AUKHIL 2000). Portanto, a tentativa de controlar os efeitos destrutivos das DP e regenerar a perda dos tecidos a certo grau, exige a restauração da junção dento-gengival (MARTU et al. 2012).

Os lasers têm sido utilizados no tratamento da periodontite, no entanto, a variedade de efeitos biológicos da radiação laser no tecido bucal ainda não é totalmente compreendida (CALDERÍN et al. 2013). A terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) foi introduzida como uma modalidade terapêutica em 1968 (HOURELD & ABRAHAMSE 2008). A LLLT inclui comprimentos de onda entre 500 e 1100 nm e tipicamente envolvem doses de 1 a 4 J/cm², com potência de saída de 10-90 mW

(OBRADOVIĆ et al. 2013), demonstrando uma ampla gama de efeitos a nível molecular, celular e tecidual (FUJIMOTO et al. 2010).

Para a LLLT ser efetiva, os parâmetros de irradiação necessitam ser padronizados dentro dos limites, e inclui comprimento de onda, energia, intensidade de potência e tempo de exposição (CARROLL et al. 2014). Esta terapia tem estimulado a cicatrização de feridas, pela indução do aumento na atividade mitótica, número de fibroblastos, síntese de colágeno, e neovascularização (USUMEZ et al. 2013). Apresenta propriedades de bioestimulação e biomodulação, modificando o comportamento do tecido (POSTEN et al. 2005), através de sua ação sobre os canais de cálcio (ALEXANDRATOU et al. 2002), iniciando no aumento do metabolismo e taxa de proliferação celular (KHADRA et al. 2005). Alguns estudos mostraram estímulo sobre a proliferação celular (FUJIHARA et al. 2006), síntese de proteína (MARQUES et al. 2004) e vasodilatação (MAEGAWA et al. 2000).

A LLLT tem demonstrado reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β (GAVISH et al. 2006). Lopes et al. 2010, demonstraram que o laser em baixa intensidade conduziu a uma redução de infiltrado de neutrófilos, demonstrando um efeito anti-inflamatório no tratamento de mucosites, em animais tratado com 5-FU.

A interação da radiação laser a nível molecular pode ocorrer por diferentes mecanismos de ação. As reações fotobiológicas envolvem a absorção de um comprimento de onda específico de luz pelo funcionamento da molécula fotoceptora (KARU 1989). A natureza fotobiológica dos efeitos da LLLT significa que a molécula (fotoceptora) deve primeiro absorver a luz utilizada na irradiação. Após a promoção do estado eletronicamente excitado, processos moleculares primárias desses estados podem conduzir a um efeito biológico mensurável ao nível da célula (KARU 1989). O efeito biológico inclui a alteração do metabolismo celular, aumento da respiração

mitocondrial, síntese de trifosfato de adenosina (ATP), proliferação celular, aumento da síntese de colágeno e aumenta a resistência a tração da ferida (STADLER et al. 2001; CARNEVALLI et al. 2003).

Por outro lado, existem poucos estudos *in vivo* que avaliaram a LLLT como coadjuvante ao tratamento convencional da periodontite experimental (PE) em condições sistêmicas desfavoráveis tais como diabetes (ALMEIDA et al., 2008), uso de drogas imunossupressoras (FERNANDES et al., 2009), ação da nicotina (GARCIA et al., 2011) ou por supressão de estrógeno (GARCIA et al., 2013). Além disso, poucos estudos clínicos em humanos avaliaram os efeitos da LLLT como coadjuvante ao tratamento periodontal (QADRI et al. 2005; LUI et al. 2011; AYKOL et al. 2011).

Mais recentemente, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) começou a ser incorporada como tratamento periodontal com características antimicrobiana específica (FRANCO et al. 2014), proposta como uma abordagem alternativa para inativação de bactérias do biofilme (SCHNEIDER et al. 2012; SONG et al. 2013). A aPDT é uma terapia que utiliza uma luz (laser ou LED) em um comprimento de onda apropriado, na presença de oxigênio, para ativar um fotossensibilizador específico, que é ativado pela luz dentro da janela terapêutica (630nm-830nm) (BETSY et al. 2014), Os fotossensibilizadores interagem com as células bacterianas que reage com o oxigênio molecular, resultando na formação de espécies de oxigênio reativo, que danifica os componentes das células bacterianas causando a lise celular (JORI et al. 2006). Um dos fatores importantes que determinam a eficácia da aPDT é o fotossensibilizador (SORKHDINI et al. 2013).

Além do efeito bactericida da aPDT, a aplicação do laser demonstra benefícios adicionais na aceleração do processo de cicatrização periodontal devido ao seu efeito bioestimulatório (PRATES et al. 2011). Braham et al. 2009, demonstraram que o

mecanismo de ação da aPDT não está limitado apenas nas propriedades bactericidas, mas podem contribuir no processo de cicatrização por inativar citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α . Assim, a aPDT pode contribuir para restaurar a homeostase periodontal e promover um rápido reparo após o tratamento (SOUZA et al. 2013). Analisando a literatura, alguns estudos recentes, apresentam resultados satisfatórios na utilização da aPDT, no tratamento da PE em animais (KOMERICK et al. 2003; SIGUSCH et al. 2005; ALMEIDA et al. 2007a; ALMEIDA et al. 2008a; ALMEIDA et al. 2008b; FERNANDES et al. 2009; GARCIA et al. 2013; GARCIA et al. 2013) e em humanos (YILMAZ et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2007; ANDERSEN et al. 2007; THEODORO et al. 2012; MOREIRA et al. 2014; ARWEILER et al. 2014; FRANCO et al. 2014). No entanto, outros estudos em humanos, não têm demonstrado vantagens do uso deste tratamento quando comparado ao tratamento convencional (CHRISTODOULIDES et al. 2008; POLANSKY et al. 2009; CHONDROS et al. 2009).

Lulic et al. (2009) demonstraram que múltiplas aplicações de aPDT coadjuvante à RAR (5 vezes) promoveram melhora clínica em bolsas residuais de pacientes em manutenção periodontal com melhores efeitos observados após 6 meses de avaliação. Neste mesmo contexto Garcia et al. 2013, demonstraram que 4 aplicações de aPDT, com intervalos de 24 horas, apresentou-se como terapia efetiva no controle da PO alveolar em animais. Outro estudo clínico em humanos demonstrou que 3 aplicações de aPDT nos períodos de 1, 3 e 7 dias, após o debridamento mecânico resultou em uma maior redução de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Tannerella forsythia* (*Tf*), e *Treponema denticola* (*Td*) em bolsas médias e *Td* em bolsas profundas comparado com o debridamento sozinho (PETELIN et al. 2014). No entanto, embora o 5-FU seja um quimioterápico muito empregado atualmente no tratamento do câncer,

nenhum estudo avaliou os efeitos da LLLT e da aPDT como terapia coadjuvante ou alternativa, no tratamento da PE em animais submetidos à quimioterapia com 5-FU.

Dessa forma, nos propusemos no capítulo 1 avaliar os efeitos de uma e de várias sessões da LLLT, como coadjuvante ao tratamento mecânico da RAR, no tratamento da PE em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU e no capítulo 2 deste trabalho avaliar os efeitos de uma e de múltiplas aplicações de aPDT, como terapia coadjuvante ou alternativa ao tratamento mecânico da RAR, no tratamento da PE em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU.

Referências da Introdução Geral

1. ALEXANDRATOU E, YOVA D, HANDRIS P, KLETSAS D, LOUKAS S. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. **Photochem Photobiol Sci**, v.1, p.547-5, 2002.
2. ALMEIDA, J.M., THEODORO, L.H., BOSCO, A.F., NAGATA, M.J. H., OSHIWA, M., GARCIA, V.G. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 78, p. 566-575, 2007a.
3. ALMEIDA, J.M., THEODORO, L.H., BOSCO, A.F., NAGATA, M.J., OSCHIIWA, M., GARCIA, V.G. In Vivo Effect of Photodynamic Therapy on Periodontal Bone Loss in Dental Furcations. **J Periodontol**, v. 79, p. 1081-1088, 2008a.
4. 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**, v.79, p.2156-2165, 2008.
5. 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, p. 2156-2165, 2008b.
6. ANDERSEN R, LOEBEL N, HAMMOND D, WILSON M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. **J Clin Dent**, v. 18, p. 34-38, 2007.
7. ARWEILER NB, PIETRUSKA M, PIETRUSKI J, SKURSKA A, DOLIŃSKA E, HEUMANN C, AUSCHILL TM, SCULEAN A. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial

- photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. **Clin Oral Investig**, v.18, p. 2129-35, 2014.
8. AUKHIL I. Biology of wound healing. **Periodontol 2000**, v.22, p. 44-50, 2000.
 9. AYKOL G, BASER U, MADEN I et al. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. **J Periodontol**, v.82, p.481–488, 2011.
 10. BETSY J, PRASANTH CS, BAIJU KV, PRASANTHILA J, SUBHASH N. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v.41, p. 573-81, 2014.
 11. BRAHAM P, HERRON C, STREET C, DARVEAU R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. **J Periodontol**, v.80, p. 1790-8, 2009.
 12. BLOEMEN V, SCHOENMAKER T, DE VRIES TJ, EVERTS V. IL-1 β favors osteoclastogenesis via supporting human periodontal ligament fibroblasts. **J Cell Biochem**, v.112, p.1890-7, 2011.
 13. BOYCE BF, LI P, YAO Z, ZHANG Q, BADELL IR, SCHWARZ EM, O'KEEFE RJ, XING L. TNF-alpha and pathologic bone resorption. **Keio J Med**, v.54, p.127-31, 2005. Review.
 14. BÜLTZINGSLÖWEN I, JONTELL M. Macrophages, dendritic cells and T lymphocytes in rat buccal mucosa and dental pulp following 5-fluorouracil treatment. **Eur J Oral Sci**, v.107, p.194-201, 1999.
 15. CALDERÍN S, GARCIA-NÚÑEZ JÁ, GÓMEZ C. Short-term clinical and osteoimmunological effects of scaling and root planning complement by simple

- or repeated laser phototherapy in chronic periodontitis. **Lasers Med Sci**, v.28, p.157-66, 2013.
16. CARNEVALLI CM, SOARES CP, ZÂNGARO RA, PINHEIRO AL, SILVA NS. Laser light prevents apoptosis in Cho K-1 cell line. **J Clin Laser Med Surg**, v. 21, p. 193–196, 2003.
 17. CARROLL JD, MILWARD MR, COOPER PR, HADIS M, PALIN WM. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. **Dent Mater**, v.30, p.465-75, 2014.
 18. CHONDROS P, NIKOLIDAKIS D, CHRISTODOULIDES N, RÖSSLER R, GUTKNECHT N, SCULEAN A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. **Lasers Med Sci**, v. 24, p. 681-688, 2009.
 19. CHRISTODOULIDES, N., NIKOLIDAKIS, D., CHONDROS, P., BECKER, J., SCHWARZ, F., RÖSSLER, R., SCULEAN, A. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 79, p. 1638-1644, 2008.
 20. DEAS DE, MEALEY BL. Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. **Periodontol 2000**, v. 53, p.154–166, 2010.
 21. EPSTEIN JB, TSANG AH, WARKENTIN D, SHIP JA. The role of salivary function in modulating chemotherapy-induced oropharyngeal mucositis: a review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.94, p. 39–44, 2002.
 22. FERNANDES LA, ALMEIDA JM, THEODORO LH, BOSCO AF, NAGATA MJH, MARTINS TM, OKAMOTO T, GARCIA VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. **J Clin Periodontol**, v. 36, p. 219-228, 2009.

23. FRANCO EJ, POGUE RE, SAKAMOTO LH, CAVALCANTE LL, CARVALHO DR, DE ANDRADE RV. Increased expression of genes after periodontal treatment with photodynamic therapy. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v.11,p.41-7, 2014.
24. FUJIHARA NA, HIRAKI KRN, AND MARQUES MM. Irradiation at 780nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. **Lasers Surg Med**, v. 38, p.332–336, 2006.
25. FUJIMOTO K, KIYOSAKI T, MITSUI N, MAYAHARA K, OMASA S, SUZUKI N, SHIMIZU N. Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. **Lasers Surg Med**, v.42:519-26, 2010.
26. GARCIA VG, FERNANDES LA, MACARINI VC, DE ALMEIDA JM, MARTINS TM, BOSCO AF, NAGATA MJH, CIRELLI JA, THEODORO LH. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. **J Clin Periodontol**, v.38, p. 1106–1114, 2011.
27. GARCIA VG, GUALBERTO JÚNIOR EC, FERNANDES LA, BOSCO AF, HITOMI NAGATA MJ, CASATTI CA, ERVOLINO E, THEODORO LH. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. **J Periodontol**, v.84, p.556-565, 2013.
28. 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**, v. 28, p.143-50, 2013.
29. GARCIA VG, NOVAES VC, DE ALMEIDA JM, LONGO M, ERVOLINO E, BOMFIM SR, THEODORO LH. Evaluation of the progression and treatment of

- experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. **Support Care Cancer**, 2014 Dec 18. [Epub ahead of print].
30. GAVISH L, PEREZ L, GERTZ SD. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. **Lasers Surg Med**, v.38, p.779–786, 2006.
31. GARLET GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **J Dent Res**, v. 89, p. 1349-63, 2010.
32. GRAVES D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v.79, p.1585-91, 2008.
33. HOFER E, JENSEN SB, PEDERSEN AML, BARDOW A, NAUNTOFTE B. Oral microflora in patients with salivary gland hypofunction. **Oral Biosci Med**,v.1, p.93–108, 2004.
34. HONG CH, Napeñas JJ, HODGSON BD, STOKMAN MA, MATHERS-STAUFFER V, ELTING LS, SPIJKERVET FK, BRENNAN MT, DENTAL DISEASE SECTION, ORAL CARE STUDY GROUP, MULTI-NATIONAL ASSOCIATION OF SUPPORTIVE CARE IN CANCER (MASCC)/INTERNATIONAL SOCIETY OF ORAL ONCOLOGY (ISOO). A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. **Support Care Cancer**, v.18, p.1007-21, 2010.
35. HOURELD NN, ABRAHAMSE H. Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. **Lasers Med Sci**, v. 23, p.11–18, 2008.
36. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA): <http://www.inca.org.br>.

37. IJIRIC K, POTTEN CS. Response of intestinal cells of differing topographical and hierarchical status to ten cytotoxic drugs and five sources of radiation. **Br J Cancer**, v. 47, p.175-85, 1983.
38. JENSEN SB, PEDERSEN AM, REIBEL J, NAUNTOFTE B. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. **Support Care Cancer**, v.11, p.207–25, 2003.
39. JORI G, FABRIS C, SONCIN M, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. **Lasers Surg Med**, v.38, p. 468-481, 2006.
40. KARU T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, v. 56, p.691–704, 1989.
41. KHADRA M, KASEM N, LYGSTADAAS SP, HAANAES HR, MUSTAFA K. Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behaviour of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. A scanning electron microscope and histomorphometric analysis. **Clin Oral Implants Res**, v.16, p. 168–175, 2005.
42. KOLENBRANDER PE, ANDERSEN RN, BLEHERT DS, EGLAND PG, FOSTER JS, PALMER RJ JR. Communication among oral bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.66, 486-505, 2002.
43. KÖMERIK N, NAKANISHI H, MACROBERT AJ, HENDERSON B, SPEIGHT P, WILSON M. In vitro killing of Porphyromonas gingivalis by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 932-940, 2003.
44. LERNER UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of postmenopausal osteoporosis. **J Dent Res**, v.85, p.596-607, 2006.

45. LOKICH J. Infusional 5-FU: historical evolution, rationale, and clinical experience. **Oncology (Williston Park)**, v.12, p.19–22, 1998.
46. LUI J, CORBET EF, JIN L. Combined photodynamic and low level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 46, p. 89–96, 2011.
47. LULIC M, LEIGGENER GÖRÖG I, SALVI GE, RAMSEIER CA, MATTHEOS N, LANG NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 36, p. 661-666, 2009.
48. MÂRȚU S, AMĂLINEI C, TATARCIUC M, ROTARU M, POTĂRNICHIE O, LILIAN L, CĂRUNTU ID. Healing process and laser therapy in the superficial periodontium: a histological study. **Rom J Morphol Embryol**, v.53, p. 111-6, 2012.
49. MAZZEO MA, LINARES JA, CAMPOS ML, BUSAMIA BE, DUBERSARSKY C, LAVARDA M, JARCHUM G, FINKELBERG AB. Oral signs of intravenous chemotherapy with 5-Fluorouracil and Leucovorin calcium in colon cancer treatment. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.1, p.108-13, 2009.
50. MEISENBERG B, GOLLARD R, BREHM T, MCMILLAN R, MILLER W. Prophylactic antibiotics eliminate bacteremia and allow safe outpatient management following high-dose chemotherapy and autologous stem cell rescue. **Support Care Cancer**, v.4, p. 364–369, 1996.
51. MERCHANT AT, ORANBANDID S, JETHWANI M, CHOI Y-H, MORRATO EH, PITIPHAT W, et al. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 76, p.1406-1419, 2005.

52. MIZUNO A, KANNO T, HOSHI M, et al. Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor (sODF) exhibit severe osteoporosis. **J Bone Miner Metab**, v.20, p.337-344, 2002.
53. MOREIRA AL, NOVAES AB JR, GRISI MF, TABA M JR, SOUZA SL, PALIOTO DB, DE OLIVEIRA PG, CASATI MZ, CASARIN RC, MESSORA MR. Antimicrobial Photodynamic Therapy as an Adjunct to Nonsurgical Treatment of Aggressive Periodontitis: a Split-mouth Randomized Controlled Trial. **J Periodontol**. 2014 Nov 21:1-17.
54. NAKASHIMA T, KOBAYASHI Y, YAMASAKI S, et al. Protein expression and functional difference of membranebound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. **Biochem Biophys Res Commun**, v.275, p.768-775, 2000.
55. NISHIMURA F, IWAMOTO Y, SOGA Y. The periodontal host response with diabetes. **Periodontol 2000**, v.43, p.245–253, 2007.
56. NOORDHUIS, P.; HOLWERDA, U.; VAN DER WILT, C. L.; VAN GROENINGEN, C. J.; SMID, K.; MEIJER, S.; PINEDO, H. M.; PETERS, G. J. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Ann Oncol**, v. 15, p.1025-1032, 2004.
57. OBRADOVIC R, KESIC L, MIHAILOVIC D, ANTIC S, JOVANOVIC G, PETROVIC A, PESEVSKA S. A histological evaluation of a low-level laser therapy as an adjuvant to periodontal therapy in patients with diabetes mellitus. **Lasers Med Sci**, v.28, p.19-24, 2013.
58. OKADA H, MURAKAMI S. Cytokine expression in periodontal health and disease. **Crit Rev Oral Bio Med**, v.9, p.248-66, 1998.
59. OLIVEIRA RR, SCHWARTZ-FILHO HO, NOVAES AB Jr, TABA M Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive

- periodontitis: A preliminary randomized controlled clinical study. **J Periodontol**, v. 78, p. 965-973, 2007.
60. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS): <http://www.who.org>
61. PALMQVIST P, PERSSON E, CONAWAY HH, LERNER UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. **J Immunol**, v.169, p.3353-62, 2002.
62. PASTER BJ (2000) DEWHIRST FE (2009). Molecular microbial diagnosis. **Periodontol**, v.51, p.38-442.
63. PETELIN M, PERKIC K, SEME K, GASPIRC B. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. **Lasers Med Sci**, 2014 Jul 24.
64. PIMENTEL SP, BARRELLA GE, CASARIN RC, CASATI MZ, FOGGIO MA, FIGUEIRA GM, RIBEIRO FV. Portective effect of topical *Cordia verbenácea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. **BMC Complement Altern Med**, v.21, p.12:224, 2012.
65. POLANSKY, R., HAAS, M., HESCHL, A., WIMMER, G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 36, p. 575-580, 2009.
66. POSTEN W, WRONE DA, DOVER JS, ARNDT KA, SILAPUNT S, ALAM M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatol Surg**, v.31, p.334–340, 2005.
67. PRATES RA, YAMADA AM, SUZUKI LC, FRANÇA CM, CAI S, MAYER MP, RIBEIRO AC, RIBEIRO MS. Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis:

- a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. **Photomed Laser Surg**, v. 29, p.835–844, 2011.
68. PRITCHARD DM, POTTEN CS, KORSMEYER SJ, ROBERTS S, HICKMAN JA. Damage-induced apoptosis in intestinal epithelia from bcl-2-null and bax-null mice: investigations of the mechanistic determinants of epithelial apoptosis in vivo. **Oncogene**, v.18:7287-93, 1999.
69. QADRI T, MIRANDA L, TUNER J, GUSTAFSSON A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. **J Clin Periodontol**, v.32, p.714–719, 2005.
70. SCHNEIDER, M., KIRFEL, G., BERTHOLD, M., FRENTZEN, M., KRAUSE, F. & BRAUN, A. The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. **Lasers Med Sci**, v.27, p.615–620, 2012.
71. SIGUSCH BW, PFITZER A, ALBRECHT V, GLOCKMAN E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. **J Periodontol**, v. 76, p. 1100-1105, 2005.
72. SONIS ST, ELTING LS, KEEFE D, PETERSON DE, SCHUBERT M, HAUERJENSEN M, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, v.100, p. 1995–2025, 2004.
73. SONG HH, LEE JK, UM HS, CHANG BS, LEE SY & LEE MK. Phototoxic effect of blue light on the planktonic and biofilm state of anaerobic periodontal pathogens. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 43,p.72–78, 2013.
74. SORKHDINI P, MOSLEMI N, JAMSHIDI S, JAMALI R, AMIRZARGAR AA, FEKRAZAD R. Mediated antimicrobial photodynamic therapy on clinical

- parameters and cytokines profile in ligature-induced periodontitis in dogs. **J Periodontol**, v.84, p.793-800, 2013.
75. SOUZA SL, ANDRADE PF, SILVA JS, TRISTÃO FS, ROCHA FA, PALIOTO DB, GRISI MF, TABA M JR, NOVAES AB JR. Effects of antimicrobial photodynamic therapy on transforming growth factor- β 1 levels in the gingival crevicular fluid. **Photomed Laser Surg**, v.31, p.65-71, 2013.
76. STADLER I, EVANS R, NARAYAN V, BUEHNER N, NAIM JO, LANZAFAME RJ. 830 nm irradiation increases wound tensile strength in a diabetic murine model. **Lasers Surg Med**, v. 28, p. 220–226, 2001.
77. THEODORO LH, SILVA SP, PIRES JR, SOARES GHG, PONTES AEF, ZUZA EP, SPOLIDÓRIO DMP, TOLEDO BEC, GARCIA VG. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. **Lasers Med Sci**, v. 27, p.687-93, 2012.
78. TONG D, POOT M, HU D, ODA D. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in cultured oral cancer cells. **Oral Oncol**, v.36, p.236-241, 2000.
79. USUMEZ A, CENGIZ B, OZTUZCU S, DEMIR T, ARAS MH, GUTKNECHT N. Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064nm) on mucosistis in an animal model of wound healing. **Lasers Med Sci**, v.29, p.1807-13, 2014.
80. YILMAZ S, KURU B, KURU L, NOYAN U, ARGUN D, KADIR T. Effect of Galium Arsenide Diode Laser on human periodontal disease: a microbial and clinical study. **Lasers Surg Med**, v. 30, p. 60-66, 2002.
81. YOSHIOKA H, FUJITA K, MARUYAMA S, OKA R. Changes in aerobic pharyngeal flora related to antibiotic use and the emergence of gramnegative bacilli. **Clin Pediatr (Phila)**, v.21, p. 460–462, 1982.

82. ZEGARELLI DJ. Fungal infections of the oral cavity. **Otolaryngologic clinics of North Am**, v.26, p.1069–1089, 1993.
83. XIAN CJ, HOWARTH GS, COOL JC, FOSTER BK. Effects of acute 5-fluorouracil chemotherapy and insulin-like growth factor-I pretreatment on growth plate cartilage and metaphyseal bone in rats. **Bone**, v.35, p.739–749, 2004.
84. XIAN CJ, COOL JC, SCHERER MA, MACSAI CE, FAN C, COVINO M, FOSTER BK. Cellular mechanisms for methotrexate chemotherapy-induced bone growth defects. **Bone**, v.41, p. 842–850, 2007.
85. XIAN CJ, COOL JC, VAN GANGELEN J, FOSTER BK, Howarth GS. Effects of etoposide and cyclophosphamide acute chemotherapy on growth plate and metaphyseal bone in rats. **Cancer Biol Ther**, v. 6, p.170–177, 2007.
86. XIMÉNEZ-FYVIE LA, HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 27, p. 648-57, 2000.

Capítulo 1²

Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) como coadjuvante no tratamento da periodontite induzida em ratos submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil.

Effect of low level laser therapy (LLLT) as adjuvant therapy in the treatment of induced periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil.

² Artigo a ser enviado para o "Journal of Supportive Care in Cancer" e suas normas de publicação encontram-se disponíveis no anexo B.

2.1 Resumo

OBJETIVO; Este estudo avaliou a influência de múltiplas sessões da Terapia com Laser em Baixa Intensidade (LLLT) coadjuvante à raspagem e alisamento radicular (RAR) no tratamento da periodontite experimental (PE), em ratos submetidos a quimioterapia com 5- Fluorouracil.

MATERIAIS E MÉTODOS; Cento e vinte animais foram submetidos à indução da PE por meio de ligadura no primeiro molar inferior direito e esquerdo. Após 7 dias a ligadura foi removida e os animais separados aleatoriamente em 5 grupos: PE - sem tratamento; 5FU-PE – tratados sistemicamente com 5-FU (60mg/kg e 40mg/kg); 5FU-PE-RAR – tratados sistemicamente com 5-FU e com RAR; 5FU-PE-1LLLT- tratados sistemicamente com 5-FU, com RAR e LLLT (única sessão); 5FU-PE-4LLLT- tratados sistemicamente com 5-FU, com RAR e LLLT (0, 24, 48 e 72h). O laser utilizado foi InGaAlP (660nm; 0,035 W; 4,2 J, 120 segundos). Oito animais de cada grupo foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após tratamento local. A área de perda óssea (PO) na região de furca foi analisada histometricamente, histologicamente e análise dos padrões de imunomarcção para TRAP, PCNA, RANKL, OPG e CASP-3-AT foram realizadas. A quantificação da citocina PGE₂ foi avaliada pelo método de ELISA e TNF- α e IL-6 foram avaliadas pelo Multiplex. A prevalência de periodontopatógenos, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella nigrescens* (Pn), *Prevotella intermedia* (Pi) e *Fusobacterium nucleatum* (Fn) foram avaliadas pela técnica da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Os dados foram submetidos à análise estatística ($\alpha = 5\%$).

RESULTADOS; Nos grupos 5FU-PE, 5FU-PE-RAR e 5FU-PE-1LLLT houve maior PO comparada aos animais do grupo PE ($p \leq 0,05$) e menor PO no grupo 5FU-PE-4LLLT, quando comparado ao grupo 5FU-PE aos 7 dias ($p \leq 0,05$) com uma redução de células TRAP-positivas, diminuição da imunomarcagem para RANKL e maior número de células PCNA-positivas. Houve redução significativa de TNF- α e IL-6 no grupo 5FU-PE-4LLLT aos 30 dias ($p \leq 0,05$) e redução significativa de *Pn* aos 7 e 30 dias no grupo 5FU-PE-1LLLT e aos 30 dias no grupo 5FU-PE-4LLLT ($p \leq 0,05$).

CONCLUSÃO; Conclui-se que o 5-FU agravou a PE, e que múltiplas sessões de LLLT coadjuvante à RAR foram efetivas no tratamento da PE, comprovadas pela redução da PO alveolar e da expressão de citocinas pró-inflamatórias, e pela regulação do metabolismo ósseo, em áreas com PE em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU.

Palavras chaves: Periodontite; Quimioterapia; Lasers

2.2 Abstract

AIM; This study evaluated the influence of multiple sessions of Low Level Laser Therapy (LLLT) adjuvant to the scaling and root planing (SRP) in the treatment of experimental periodontitis (EP) in rats treated with chemotherapy 5- fluorouracil (5-FU).

MATERIALS AND METHODS; One hundred and twenty animals were subjected to induction of EP by ligature in mandibular first molar right and left. 7 days after the ligature was removed, the animals were randomly divided into 5 groups: EP - no treatment; 5FU-EP - systemically treated with 5-FU (60mg/kg and 40mg/kg); 5FU-EP-SRP - systemically treated with 5-FU, with SRP; 5FU-EP-SRP-1LLLT - systemically treated with 5-FU, with SRP, followed by LLLT (0h); 5FU-EP-SRP-4LLLT - systemically treated with 5-FU, with SRP followed by LLLT (0, 24, 48 and 72h). The laser used was InGaAlP (660 nm; 0.035 W; 4.2 J; 120 seconds; 1.23 W/cm²). Eight animals in each group were euthanized at 7, 15 and 30 days after local treatment. The bone loss area (BL) in the furcation region was analyzed histometrically, histologically and analysis of immunostaining patterns for RANKL, OPG, TRAP, PCNA and CASP-3-AT were performed. . PGE₂ was measured by ELISA and TNF- α and IL-6 were assessed by kits multiplex assays. The prevalence of periodontopathogens *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella nigrescens* (Pn), *Prevotella intermedia* (Pi) and *Fusobacterium nucleatum* (Fn) were evaluated by Polymerase Chain Reaction (PCR). Data were subjected to statistical analysis ($\alpha = 5\%$).

RESULTS; In 5FU-EP, 5FU-EP-SRP and 5FU-EP-SRP-1LLLT groups there was higher BL alveolar compared to animals of the EP group ($p \leq 0.05$) and lower BL in 5FU-EP-4LLLT group, when compared to 5FU-EP group at 7 days ($p \leq 0.05$); in 5FU-EP-4LLLT there was a decrease of TRAP-positive cells and decreased immunostaining for RANKL and increased number of PCNA-positive cells. There was a significant reduction of TNF- α and IL-6 in the 5FU-EP-SRP-4LLLT group at 30 days ($p \leq 0.05$) and significant reduction of *Pn* at 7 and 30 days in the 5FU-EP-1LLLT group and in the 5FU-EP-4LLLT group at 30 days.

CONCLUSION; It was concluded that 5-FU aggravated EP, and multiple session of LLLT adjuvant the SRP were effective in the treatment of EP, which was proved by the reduction in alveolar BL, the expression of pro-inflammatory cytokines, and the regulation of bone metabolism in areas with EP in rats subjected to chemotherapy with 5-FU.

Keywords: Periodontitis; Chemotherapy; Lasers.

2.3 Introdução

A doença periodontal (DP) é caracterizada por uma condição infecciosa que leva a destruição dos tecidos de suporte, mediada pela produção local de marcadores imunoinflamatórios em resposta aos patógenos e seus produtos [1]. Incluem algumas bactérias anaeróbias gram-negativas [2], tais como *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forsythia* (Tf), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Treponema denticola* (Td) [3,4]. Além disto, inúmeros mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios têm sido identificados no tecido gengival ou no fluido crevicular na periodontite [5-7]. A reabsorção e formação óssea são reguladas pela concentração do receptor ativador de NF-Kappa B ligante (RANKL), bem como o receptor RANK-RANKL (Receptor ativador de NF-Kappa B/ Receptor ativador de NF-Kappa B ligante) em células precursoras de osteoclastos e do receptor osteoprotegerina (OPG) [8]. Quando a expressão de RANKL aumenta em relação à OPG, RANKL fica disponível para se ligar a RANK em precursores de osteoclastos, favorecendo a ativação da formação de osteoclastos e reabsorção óssea. A OPG impede a ligação de RANKL a RANK levando à formação reduzida de osteoclastos e a apoptose de osteoclastos preexistentes [8].

As doenças periodontais inflamatórias estão associadas com várias condições sistêmicas [9]. A quimioterapia, um dos tratamentos indicados para tumores malignos, interfere no metabolismo celular de ambas as células malignas e de tecidos normais, com alto índice mitótico [10] promovendo graves efeitos adversos, como a mielossupressão [11,12]. Entre os efeitos adversos orais podemos citar as mucosites, desconforto, dor na boca, hemorragia, hipofunção da glândula salivar, secura da boca e perturbações do paladar. Assim, pode aumentar a suscetibilidade do hospedeiro à

infecções bacterianas, fúngicas e virais; bem como às alterações na microbiota bucal tornando-se potencialmente mais patogênica [12-14]. Estas complicações orais podem ocorrer durante e após a terapia [15], podendo ocorrer também danos indiretos como toxicidade sistêmica. Além disto, em indivíduos com periodontite pode ocorrer um aumento do índice de placa, índice de sangramento e de profundidade de sondagem [16].

Agentes quimioterápicos tais como o 5-Fluorouracil (5-FU), metotrexato (MTX), ciclofosfamida e etoposídeo causam osteopenia severa por supressão de osteoblastos e promovem o recrutamento de osteoclastos [17,18]. O 5-FU é um antimetabólito que atua essencialmente na fase específica do ciclo celular [19]. Devido a sua estrutura o 5-FU interfere com o metabolismo de nucleotídeos e pode ser incorporado dentro do RNA e DNA, conduzindo a citotoxicidade e morte celular [20], podendo provocar a apoptose de células cancerígenas por ativação da caspase-6 [21] e aumenta a destruição óssea na periodontite [22].

Terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) é uma forma de fototerapia que envolve a aplicação de uma luz de baixa intensidade, monocromática e coerente, que induz aumento na atividade mitótica, nos números de fibroblastos, e na síntese de colágeno e promove neovascularização [23], demonstrando uma ampla gama de efeitos à nível molecular, celular e tecidual [24]. Adicionado aos efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, a terapia com laser acelera o início do processo de cicatrização [25-27], alivia a inflamação no tecido periodontal, melhora a imunidade local, promove saturação mineral do tecido ósseo dos processos alveolares e normaliza a microcirculação no periodonto [28]. A LLLT tem sido utilizada para o tratamento e prevenção de mucosite induzida por quimioterapia e tem sido relatada sua eficácia na redução da severidade da mucosite oral [29-33].

Estudos clínicos e laboratoriais têm demonstrado que as alterações sistêmicas são consideradas fatores de risco e influenciam a expressão da DP, alterando os mecanismos de defesa do hospedeiro [34,35]. Alguns estudos *in vivo* avaliaram o efeito da terapia com LLLT como coadjuvante no tratamento convencional da periodontite experimental (PE) modificadas sistemicamente pela diabetes [36], pelo uso de drogas imunossupressoras [37], pela nicotina [38] ou por supressão de estrógeno [39]. Por outro lado, poucos estudos clínicos em humanos avaliaram os efeitos da LLLT como terapia coadjuvante ao tratamento periodontal [40-42] e ainda não foi avaliado o efeito da LLLT como terapia coadjuvante do tratamento periodontal em condições de imunossupressão por quimioterápicos.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar por intermédio de avaliação histomorfométrica, imunoistoquímica, imunológica e microbiológica, os efeitos de única ou múltiplas sessões de LLLT, como terapia coadjuvante, na PE em animais submetidos à quimioterapia com 5-FU.

2.4 Materiais e Métodos

Animais

Este estudo foi realizado em 120 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), machos adultos (3 meses de idade) pesando entre 200-300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com acesso a ração e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro). O protocolo experimental foi aprovado pela comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (no. 00800-2012).

Indução da Periodontite Experimental

Para todos os procedimentos os animais foram anestesiados por injeção intramuscular da associação de 70 mg/kg de cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa – EUA) e 6 mg/kg de cloridrato de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil). A PE foi induzida por meio da instalação de um fio de algodão (Corrente Algodão n°.24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores direitos e esquerdos. A ligadura foi mantida durante 7 dias em posição subgingival por meio de nós cirúrgicos [22].

Tratamento com 5-FU

O tratamento sistêmico consistiu na injeção intraperitoneal de 60mg/kg e 40 mg/kg de 5-FU (5-Fluorouracil; 50 mg/ml; Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) no dia da instalação da ligadura e 48 horas após, respectivamente [43].

Grupos Experimentais

Após 7 da sua instalação a ligadura foi removida e os animais foram separados aleatoriamente, seguindo uma tabela gerada em computador, em grupos de acordo com os seguintes tratamentos locais realizados nos primeiros molares inferiores direitos e esquerdos: PE (n=24) - nenhum tratamento sistêmico ou local; 5FU-PE (n=24) – tratados sistemicamente com 5-FU, sem tratamento local; 5FU-PE-RAR (n=24) – tratados sistemicamente com 5-FU e com raspagem e alisamento radicular (RAR); 5FU-PE-1LLLT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU, com RAR seguida de LLLT (única sessão); 5FU-PE-4LLLT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU, com RAR, e LLLT (0, 24, 48 e 72 horas).

Raspagem e alisamento radicular

A RAR foi realizada com curetas manuais mini – five 1-2 (Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, USA) através de 10 movimentos de tração disto-mesial nas faces vestibular e lingual. As áreas interproximais e de furca foram raspadas com as mesmas curetas através de movimentos de tração cérvico-oclusais [37]. Os procedimentos de RAR foram realizados por um mesmo operador experiente, treinado e cego aos grupos experimentais (ML).

Laser em baixa intensidade (LLLT)

O laser utilizado neste estudo foi o laser de Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo InGaAlP (THERA LASE®, D.M.C. Equipamentos Ltda®, São Carlos, São Paulo, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm e fibra com diâmetro de saída de 0,0283 cm². A irradiação foi realizada em cada sessão nos dois primeiros molares (esquerdo e direito) com potência de 0,035 W, durante 60 segundos no centro da face vestibular e 60

segundos no centro na face lingual 4,2 J. O dente recebeu uma densidade de energia por ponto de 74,2 J /cm² (2,1 J/ponto).

Coleta do conteúdo do líquido crevicular

Foram coletadas amostras de biofilme subgingival na região vestibular dos primeiro molar inferior do lado esquerdo de cada animal de todos os grupos experimentais (PE, 5FU-PE, 5FU-PE-RAR, 5FU-PE-1LLLT, 5FU-PE-4LLLT) no *baseline* (início), aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamento. Foram utilizados cones de papel absorventes estéreis (20 Tanari, Manacapuru, AM, Brasil) para a realização da coleta microbiológica, que foram introduzidos no sulco gengival, em direção apical até que uma leve resistência fosse sentida, permanecendo no local por 30 segundos [33,44]. Após sua remoção, os cones de papel absorventes foram armazenados em micro-tubos contendo 500µL de solução salina tamponada (PBS, pH 7.0) e congelados a 80°C negativos, para posterior análise microbiológica [33].

Períodos experimentais

Oito animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia pela injeção de dose letal de tiopental 150 mg/kg (Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) aos 7, 15 e 30 dias após a realização dos tratamentos locais da PE. As hemimandíbulas esquerdas foram dissecadas e fixadas em formaldeído 4% em solução tamponada de 0,1 M, durante 48 horas, para realização das análises histológica, histométrica e imunoistoquímica. O tecido gengival marginal ao redor do primeiro molar direito foi dissecado, congelado em nitrogênio líquido, e em seguida transferido para o freezer a -80°C, para análise imunoenzimática [6].

Processamento histológico e imunoistoquímico

Os espécimes foram desmineralizados em ácido etilenoaminotetracético (EDTA) a 10% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) Cortes semi seriados (4 µm) foram obtidos no sentido méso distal. Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca foi evidente, cinco cortes equidistantes de cada espécime foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina (HE), para análise histológica e para análise histométrica. Outros seis cortes foram submetidos à técnica imunoistoquímica. Esta seleção foi realizada por um examinador experiente, treinado e cego aos tratamentos efetuados (ML). Foi utilizada a técnica de imunoperoxidase indireta empregando-se os seguintes anticorpos primários: anti-TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) (SC 30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) (VP-P980, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), anti-RANKL (Receptor ativador de NF-Kappa B ligante) (SC 7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-OPG (Osteoprotegerina) (SC 7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), e anti-CASPASE (Cysteine-Aspartic-Acid-Proteases) (9664, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, CA, EUA). O processamento imunoistoquímico seguiu o protocolo descrito por Garcia et al. [39].

Processamento microbiológico por meio da técnica da Reação de Polimerase em cadeia (PCR)

O processamento microbiológico foi realizado utilizando a técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR) descrita por SAIKI et al. [45,46], pesquisando a presença de *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Prevotella nigrescens* (Pn), *Prevotella intermedia* (Pi), *Fusobacterium nucleatum* (Fn).

Amostras de biofilme do sulco gengival obtidas dos animais foram submetidas à extração do DNA bacteriano, utilizando um protocolo para extração do DNA adaptado de Doyle [47], utilizando centrífuga refrigerada (MIKRO 200, Hettich Lab Technology, Germany). As condições de ciclagem utilizando termociclador (Prime Thermal Cycler, Staffordshire, OSA, UK) para amplificação foram as seguintes para os primers específico: *Pg* – Desnaturação inicial à 95° C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos à 95° C por 30s, 60° C por 30 segundos e 72° por 1 minuto; *Aa* - Desnaturação Inicial à 95° C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação à 95° C por 30s, 60° C por 1 minuto e 72° por 1 minuto; *Pn* - Desnaturação Inicial à 95° C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação à 95° C por 30s, 65° C por 1 minuto e 72° por 1 minuto; *Pi* - Desnaturação Inicial à 95° C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação à 95° C por 30s, 60° C por 1 minuto, 72° por 1 minuto e 72° por 2 minutos; *Fn* - Desnaturação Inicial à 95° C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação à 95° C por 30s, 65° C por 30s, 72° por 30s e 72° por 5 minutos.

Para confirmar a especificidade ou universalidade dos primers, as amostras foram analisados em gel de agarose (1,5%) que foi corado com *Syber Safe DNA gel stain* (Invitrogen, São Paulo, Brasil, S33102) em uma cuba para corrida eletroforética horizontal (Major Science, Hoefer, Inc Richmond, CA 94804 USA) conectada a uma fonte de eletroforese (Fonte Smart Rosa, Major Science, 50-60 Hz, 144 VA Hoefer, Inc San Francisco, CA 94107, USA) a 96V por 40 minutos e submerso em solução tamponante TBE (Tris-ácido bórico e EDTA). Após o término de cada corrida as bandas do gel foram observadas imediatamente em um transluminador de luz ultravioleta e fotografadas à seguir, utilizando um sistema de fotodocumentação digital (UVP, mod. GelDoc-It B 2310, Upland, CA, USA).

Determinação da quantificação de PGE₂, TNF- α e IL-6

As proteínas totais foram extraídas a partir das amostras dos tecidos gengivais usando um tampão de extração (Proteína de tecido Reagente de Extração [T-PER], Pierce Biotechnology; Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, EUA) contendo um cocktail inibidor de protease (Proteína Cocktail de estabilização; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante (Pierce Biotechnology, Rockford, EUA). As amostras de tecido foram maceradas em tampão (50 μ L/MG de tecido), centrifugadas durante 5 minutos a 16.000 g em 4 °C, e o sobrenadante foi removido [6].

A quantificação das proteínas extraídas dos tecidos gengivais foi realizada pelo método de Lowry, e as proteínas das amostras foram analisadas nos testes ELISA para determinar a concentração de prostaglandina E₂ (PGE₂) (ELISA Kit for Prostaglandin E₂, CEA538Ge, Life Science Inc., USCNK, Cologne, Germany). Estes ensaios foram realizados de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e os resultados da leitura com o espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer Model EONC, 110V/60Hz) foram normalizados para o total de concentração de proteínas nas amostras. Para determinação da interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) foram utilizados Kits Multiplex (Rat Cytokine/Chemokine MAGNETIC Bead Panel - 2Plex [IL-6/TNF- α], Millipore, RCYTOMAG-80K-02, Billerica, Massachusetts 01821 U.S.A.) e a análise foi realizada em equipamento Luminex II xMap 100/200 (Millipore, LX10009314401, Austin, Texas- U.S.A.).

Análise histológica

Um histologista certificado (EE) e cego aos tratamentos efetuados realizou a análise histopatológica. Os seguintes parâmetros foram avaliados: natureza e grau de inflamação; extensão do processo inflamatório; presença e extensão de necrose tecidual; presença, extensão e natureza de reabsorção de osso, de cimento e de dentina; estado da vasculatura; padrão de estruturação da matriz extracelular dos tecidos periodontais e padrão de celularidade dos tecidos periodontais.

Análise histométrica

Um examinador calibrado e cego aos tratamentos efetuados realizou a análise histométrica (ML). Foi utilizado um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Alemanha) para se mensurar a área de Perda Óssea (PO) em mm². Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca era evidente, cinco cortes eqüidistantes de cada espécime foram selecionados para análise histométrica. Esta seleção foi realizada por um examinador treinado e cego ao tratamento efetuado (EE). A PO de cada espécime foi mensurada três vezes pelo mesmo examinador (ML), em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados. As três medidas obtidas foram analisadas estatisticamente para análise de concordância com nível de 5% de significância (Teste Kappa).

Análise Imunoistoquímica

Um examinador treinado e cego aos tratamentos (ML) selecionou uma secção histológica de cada um dos biomarcadores (TRAP, PCNA, RANKL, OPG, e CASP-3-AT) de cada espécime. Um histologista certificado (EE) e cego aos tratamentos realizou as análises imunoistoquímicas. A imunomarcação foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no compartimento citosólico das células positivas. A

imunomarcção para TRAP e PCNA foi realizada pela contagem de células TRAP-positivas e PCNA-positivas localizadas no centro do septo interradicular do primeiro molar inferior esquerdo de uma área de $1000\mu\text{m} \times 1000\mu\text{m}$, com um aumento de 200x [22,39] em três cortes histológicos equidistante. O limite coronário desta área foi a crista óssea alveolar, a partir da qual se estendia apicalmente por uma distância de $1000\mu\text{m}$.

Uma análise semiquantitativa da imunomarcção para RANKL e OPG foi efetuada na área de furca com um aumento de 400x. O estabelecimento dos escores da imunomarcção foi baseado em Garcia et al. [39]: Escore 0 – ausência de imunomarcção (ausência total de células-imunorreativas -IR); Escore 1 - baixo padrão de imunomarcção ($\cong 1/4$ das células-IR); Escore 2 - moderado padrão de imunomarcção ($\cong 1/2$ das células-IR) e Escore 3 - alto padrão de imunomarcção ($\cong 3/4$ das células-IR). Os escores de RANKL e OPG foram individualmente analisados em cada grupo experimental.

Para análise da CASP-3-AT uma linha foi traçada do ápice da raiz mesial ao ápice da raiz distal do primeiro molar inferior. Em seguida foi delineada a superfície do osso alveolar contida nesta região para o cálculo da área de osso remanescente. Nesta área foi mensurada a quantidade de osteócitos CAS-3-AT-positivos, os quais foram expressos por milímetro quadrado.

Reprodutibilidade intra-examinador

Previamente a realização das análises histométrica e imunoistoquímica o examinador foi treinado através da dupla mensuração de 24 espécimes, com o intervalo de 1 semana. O teste-*t* pareado foi calculado e não foi observado diferença significativa entre os valores obtidos nos dois momentos de mensuração ($p \leq 0,05$). Adicionalmente, o

coeficiente de correlação de Pearson mostrou um alto grau de correlação (0,95) entre os dois momentos de mensuração para ambas as análises.

Análise Estatística

Os resultados dos cálculos para o tamanho da amostra $n(\text{mínimo})=6$, demonstraram um poder de estudo de 80% ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas com o software Bioestat (Bioestat, Instituto Mamirauá, Manaus, Brasil), versão 5.3. A normalidade dos dados histométricos (PO) e imunoistoquímicos (TRAP, PCNA e CASP-3-AT) foi analisada usando o teste de Shapiro Wilk. As análises intra e inter grupo foram feitas com análise de variância (ANOVA) ($p \leq 0,05$). Quando o ANOVA detectou uma diferença estatisticamente significativa, foram feitas comparações múltiplas usando o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para avaliar os dados dos escores de RANKL, OPG dos grupos avaliados. Este teste foi seguido pelo teste não paramétrico Student-Newman-Keuls, quando o teste Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Utilizou-se o teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) para avaliar os valores obtidos para os biomarcadores pró-inflamatórios (PGE₂, TNF- α e IL-6) ($p \leq 0,05$). Utilizou-se para avaliação intra-grupo da prevalência (%) dos periodontopatógenos o teste de Qui-Quadrado ($p \leq 0,05$), e para avaliação inter-grupo utilizou-se o teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

2.5 Resultados

Análise histológica

No grupo PE aos 7 dias, um intenso infiltrado inflamatório composto predominantemente de neutrófilos estava presente em todo o tecido conjuntivo da região de furca. Todos os espécimes deste grupo apresentavam espículas de osso necrosado envoltas por células inflamatórias na região de furca. O septo interradicular se mostrou com um contorno bastante irregular e com trabéculas ósseas bastante delgadas, em cuja superfície se observava grande quantidade de osteoclastos ativos. Aos 15 e 30 dias a inflamação ainda era intensa, no entanto, comparativamente houve uma redução no volume ocupado pelo infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e linfócitos. O tecido conjuntivo nas imediações do septo interradicular mostrou uma discreta redução na inflamação. O septo interradicular se apresentou com trabéculas ósseas delgadas, de contorno externo irregular e com osteoclastos ativos.

No grupo 5FU-PE aos 7, 15 e 30 dias prevaleceu a destruição e desestruturação de todos os tecidos periodontais. O tecido conjuntivo da área de furca apresentava-se totalmente desestruturado e com intenso infiltrado inflamatório que atingia a margem do tecido ósseo alveolar do septo interradicular. Em todos os espécimes grandes espículas de osso necrosado, envoltas por grande quantidade de células inflamatórias, estavam presentes. Em alguns espécimes, especialmente aos 30 dias, o nível de reabsorção óssea foi tão acentuado que eliminou por completo o septo interradicular e atingiu o osso basal da mandíbula, denotando um aumento da severidade da doença periodontal ao longo do tempo. O tecido ósseo do septo interradicular se mostrou composto por trabéculas ósseas muito irregulares, extremamente delgadas, com amplos espaços medulares, alguns dos quais com presença de moderada quantidade de células

inflamatórias. O contorno externo do septo interradicular se apresentou muito irregular, repleto de lacunas de reabsorção e muitos osteoclastos ativos (Fig.1a Fig.1e; Fig.1i; Fig.1m).

No grupo 5FU-PE-RAR aos 7 dias havia severa desestruturação tecidual e intenso infiltrado inflamatório que ocupava o tecido conjuntivo da área de furca e margeava o tecido ósseo do septo interradicular. Espículas de osso necrosado estavam presentes em alguns espécimes. O contorno do septo interradicular se mostrou bastante irregular, repleto de osteoclastos ativos e com as trabéculas ósseas muito delgadas (Fig. 1b; Fig. 1f). Aos 15 e 30 dias o volume ocupado pelo infiltrado inflamatório sofreu uma progressiva redução. O tecido conjuntivo nas imediações do septo interradicular mostrou um discreto sinal de reparação, especialmente aos 30 dias, no entanto, a desestruturação tecidual ainda prevalecia. Havia neste tecido uma pequena quantidade de fibras colágenas, muitos fibroblastos, grande número de vasos sanguíneos e uma moderada quantidade de células inflamatórias. As trabéculas ósseas se mostraram com uma espessura moderada, com grande irregularidade na superfície e com osteoclastos em franca atividade (Fig.1j; Fig.1n).

Com relação a magnitude da resposta inflamatória local, esta se mostrou intensa aos 7 dias, moderada aos 15 dias e discreta aos 30 dias tanto em 5FU-PE-1LLLTT quanto em 5FU-PE-4LLLTT. Aos 7 dias ambos os grupos exibiam severa desestruturação tecidual, com grande comprometimento da estrutura do osso alveolar, supostamente reflexo do trauma ocasionado pela SRP, todavia o progresso do processo de reparo teve um curso mais favorável em 5FU-PE-1LLLTT e muito mais favorável em 5FU-PE-4LLLTT. No grupo 5FU-PE-1LLLTT, aos 15 dias observou-se no tecido conjuntivo da região de furca, que embora ainda se apresentasse um grau de inflamação, uma nítida reestruturação tecidual. Neste local constatou-se uma moderada quantidade tanto de

fibroblastos como de fibras colágenas, as quais aumentaram consideravelmente aos 30 dias, um reflexo do avanço do processo de reparação (Fig.1c; Fig.1g; Fig.1k; Fig.1o). No grupo 5FU-PE-4LLLT tanto aos 15 dias quanto aos 30 dias o tecido conjuntivo da região de furca, embora ainda apresentasse células inflamatórias, mostrava-se composto por grande quantidade de fibras colágenas orientadas em várias direções e moderada quantidade de fibroblastos, características condizentes com uma aceleração no processo de reparação tecidual. Em ambos os grupos, aos 15 e 30 dias, o osso do septo interradicular exibiu trabéculas ósseas de contorno superficial externo mais regular e com menos áreas de reabsorção óssea ativa e poucos osteoclastos (Fig.1d; Fig.1h; Fig.1l; Fig.1p).

Análise histométrica

Os resultados estão apresentados na Figura 2. Na análise intergrupo, ao se comparar os diferentes tratamentos realizados, observou-se aos 7 dias que os animais do grupo 5FU-PE ($2,37 \pm 0,53$), 5FU-PE-RAR ($2,30 \pm 0,29$) e 5FU-PE-1LLLT ($2,17 \pm 0,20$) apresentaram uma maior PO comparada aos animais do grupo PE ($1,32 \pm 0,49$) ($p \leq 0,05$). Os animais do grupo 5FU-PE-4LLLT ($1,55 \pm 0,32$) apresentaram uma menor PO quando comparado ao grupo 5FU-PE ($2,37 \pm 0,53$) e 5FU-PE-RAR ($2,3 \pm 0,29$) aos 7 dias ($p \leq 0,05$).

Aos 15 dias, os animais do grupo 5FU-PE ($2,41 \pm 0,14$) e 5FU-PE-RAR ($2,38 \pm 0,45$) apresentaram maior PO quando comparado ao grupo PE ($1,32 \pm 0,49$) ($p \leq 0,05$). Aos 30 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Análise imunoistoquímica

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de RANKL, OPG, TRAP, PCNA e CASP-3-AT mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a

qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação imunohistoquímica. As células imunorreativas apresentaram uma coloração acastanhada confinada ao compartimento citossólico. As células TRAP-positivas apresentavam mais de três núcleos, e foram localizadas na superfície do osso alveolar do septo interdicular com imunomarcação predominantemente em osteoclastos. O maior número de células TRAP-positivas foi detectado aos 7 dias nos animais do grupo 5FU-PE-RAR, quando comparado com os animais do grupo 5FU-PE-4LLLT ($p \leq 0,05$) (Fig.3a; Fig.3b; Fig.3c; Fig.3d; Fig.3e).

A imunomarcação para PCNA foi expressa predominantemente em células conjuntivas e da superfície do osso. Os animais do grupo 5FU-PE-1LLLT e 5FU-PE-4LLLT mostraram maior número de células PCNA-positivas aos 7 e 15 dias comparados aos animais do grupo PE ($p \leq 0,05$). Aos 30 dias os animais do grupo 5FU-PE-1LLLT mostraram maior número de células PCNA-positivas comparados aos animais do grupo PE e 5FU-PE ($p \leq 0,05$; Fig.3f; Fig.3g; Fig.3h; Fig.3i; Fig.3j).

A imunomarcação para RANKL e OPG foi predominantemente expressa em osteoblastos e, em alguns fibroblastos no osso e tecido conjuntivo na região de furca. Na comparação intra-grupo houve uma redução significativa de imunomarcação para RANKL no 5FU-PE-RAR-4LLLT aos 15 dias ($p=0,0339$) e 30 dias ($p=0,0339$) quando comparado aos 7 dias. Na comparação inter-grupo houve uma redução significativa de imunomarcação para RANKL aos 7 dias no 5FU-PE-RAR-1LLLT ($p=0,0317$) e 5FU-PE-RAR-4LLLT ($p=0,0072$) quando comparado com 5FU-PE e 5FU-PE-RAR ($p=0,0317$; $p=0,0072$). Aos 15 dias houve uma redução significativa de imunomarcação para RANKL no 5FU-PE-RAR-1LLLT e 5FU-PE-RAR-4LLLT quando comparado com PE ($p=0,0334$; $p=0,0143$), 5FU-PE ($p=0,0120$; $p=0,0046$) e 5FU-PE-RAR ($p=0,0334$; $p=0,0143$). Aos 30 dias houve uma redução significativa de imunomarcação para

RANKL no 5FU-PE-RAR-1LLLT e 5FU-PE-RAR-4LLLT quando comparado com 5FU-PE ($p=0,0082$; $p=0,0026$) e no 5-FU-PE-RAR-4LLLT quando comparado com PE ($p=0,0255$) e 5FU-PE-RAR ($p=0,0255$) (Fig.4a; Fig.4c; Fig.4d; Fig.4e; Fig.4f). Para a imunomarcção de OPG não houve diferença estatisticamente significativa na comparação intra-grupo e inter-grupo (Fig.4b; Fig.4g; Fig.4h; Fig.4i; Fig.4j).

Para CASP-3-AT em nenhum grupo experimental a quantidade média de osteócitos CAS-3-AT-positivos por mm^2 ultrapassou o valor de uma célula e não houve diferença estatisticamente significativa intra-grupo e inter-grupo em todos os períodos analisados (Fig.4k; Fig.4l; Fig.4m).

Análise imunológica

Os resultados estão apresentados na Tabela 1. A análise da presença dos biomarcadores pró-inflamatórios PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 não demonstraram diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$).

Nos grupos 5FU-PE e 5FU-PE-4LLLT houve uma menor concentração de $\text{TNF-}\alpha$ aos 30 dias quando comparados aos 7 dias. No grupo 5FU-PE-4LLLT houve uma menor concentração de $\text{TNF-}\alpha$ aos 30 dias quando comparado ao período de 15 dias ($p\leq 0,05$).

Na comparação intra-grupo houve menor concentração de IL-6 no grupo 5FU-PE-1LLLT aos 15 e 30 dias quando comparado aos 7 dias, e menor concentração aos 30 dias quando comparado aos 15 dias. Houve menor concentração de IL-6 no grupo 5FU-PE-4LLLT aos 30 dias quando comparado aos 7 e 15 dias ($p\leq 0,05$).

Análise Microbiológica

Os dados estão apresentados na Figura 5. Na comparação intra-grupo houve uma redução significativa de Pn aos 7, 15 e 30 dias no grupo PE quando comparado com o

baseline, havendo uma detecção negativa nestes períodos. Para *Fn* houve uma redução significativa aos 7 dias quando comparado com o *baseline*, aos 30 dias quando comparado aos 15 dias, e aos 30 dias quando comparado com o *baseline* ($p \leq 0,05$), havendo uma detecção negativa aos 7 e 30 dias.

No grupo 5FU-PE-RAR houve uma redução significativa de *Aa* aos 30 dias quando comparado com *baseline*, 7 e 15 dias. Para *Fn* houve uma redução significativa aos 15 e 30 dias quando comparado com *baseline* e 7 dias ($p \leq 0,05$).

No grupo 5FU-PE-1LLLT houve uma redução significativa de *Pn* aos 7 e 30 dias quando comparado com *baseline*, e uma redução significativa aos 30 dias quando comparado com 7 dias ($p \leq 0,05$).

No grupo 5FU-PE-4LLLT houve uma redução significativa de *Pn* aos 30 dias quando comparado com *baseline*, 7 e 15 dias, havendo uma detecção negativa aos 30 dias ($p \leq 0,05$).

Na comparação inter-grupo houve uma redução significativa de *Pn* aos 15 dias no PE quando comparado com 5FU-PE, e houve uma redução significativa de *Fn* aos 7 dias no PE quando comparado com 5FU-PE e 5FU-PE-RAR. Houve uma redução significativa de *Pg* no 5FU-PE aos 7 dias quando comparado com 5FU-PE-RAR-1LLLT ($p \leq 0,05$).

2.6 Discussão

No presente estudo foi avaliado os efeitos de única ou múltiplas sessões de LLLT, como terapia coadjuvante, na PE em animais tratados com 5-FU. A quimioterapia com 5-FU promove leucopenia [43,48,49] sendo que a diminuição no número de neutrófilos aumenta a vulnerabilidade do hospedeiro e conseqüentemente a severidade da DP [50].

A PE nos animais tratados com o quimioterápico 5-FU apresentou-se mais severa do que nos animais que não foram tratados com o 5-FU, prevalecendo a destruição e desestruturação de todos os tecidos periodontais, presença de grandes espículas de osso necrosado e com intenso infiltrado inflamatório, e um aumento significativo de PO alveolar na região de furca. Estes resultados demonstram que o 5-FU agravou a severidade da periodontite, e estão de acordo com os estudos anteriores, que demonstraram destruição severa do osso alveolar em ratos com periodontite induzida por ligadura, que foram submetidos à quimioterapia com ciclofosfamida [51,52] e com 5-FU, onde se observou uma menor porcentagem de osso, com grandes áreas de osso necrótico envolvendo praticamente a totalidade do osso na região da furca [49].

O 5-FU promove desorganização das células basais do epitélio [53] e reduz significativamente o número de osteoblastos da superfície trabecular [54]. Nadhanan et al. [55], demonstraram que o quimioterápico 5-FU induziu uma condição inflamatória no osso, pela alta regulação de citocinas pró-inflamatórias e fatores reguladores de osteoclastos, sugerindo que o 5-FU aumenta a presença de osteoclastos, e promove aumento da atividade de reabsorção óssea.

Nos animais do grupo 5FU-RAR-4LLLT houve uma diminuição na PO na área de furca em relação aos animais do grupo 5FU-PE e 5FU-RAR aos 7 dias demonstrando

menos áreas de reabsorção óssea ativa, poucos osteoclastos, grande quantidade de fibras colágenas e moderada quantidade de fibroblastos. Estes resultados demonstram que múltiplas sessões com LLLT (4 sessões) favoreceu o processo de reparo, acelerando a reparação tecidual nestes animais, e estão de acordo com os resultados de estudos anteriores, que demonstram redução do número de células inflamatórias [56] e redução de PO [36,39] após tratamento com laser em baixa intensidade. Com relação ao número de sessões da LLLT, os resultados deste estudo também são corroborados por outro que demonstrou um considerável efeito anti-inflamatório, após várias sessões com LLLT (5 sessões) associadas com terapia periodontal convencional [57]. Múltiplas irradiações do tecido com laser são mais efetivas do que uma única irradiação, sendo um fator importante na formação óssea e na proliferação de fibroblatos [58]. Assim os efeitos da LLLT na reparação óssea dependem não só da dose total de radiação, mas também do tempo de irradiação e do modo de irradiação [59].

O efeito bioestimulatório que o laser produz nas células do tecido durante a terapia pode acelerar a reparação de tecidos e cicatrização de feridas, o que pode não ocorrer durante o tratamento mecânico convencional [60], principalmente nos animais submetidos à quimioterapia com 5-FU [49]. O laser pode acelerar este processo de cicatrização, aumentando a motilidade dos queratinócitos (com uma consequente epitelização mais rápida), promovendo aumento da proliferação dos fibroblastos (com consequente síntese da matriz extracelular) e da angiogênese [61], minimizando os efeitos deletéricos da quimioterapia que afeta a proliferação de células com atividade mitótica acentuada [62,63], como é o caso do epitélio juncional longo [64], que se constitui na primeira barreira mecânica de defesa inata dos tecidos periodontais. A análise do PCNA foi realizada para elucidar os efeitos da irradiação laser em osteoblastos e fibroblastos. Os animais que foram tratados com LLLT mostraram maior

número de células PCNA-positivas aos 7 e 15 dias, demonstrando uma maior proliferação celular, o que também foi demonstrado em estudo prévio [39]. Tais fatos podem também justificar o melhor reparo observado nos animais tratados com laser neste estudo.

Os resultados imunológicos obtidos do tecido gengival dos ratos demonstraram que os níveis de TNF- α nos animais do grupo 5FU-PE apresentou uma redução significativa apenas aos 30 dias quando comparado ao período de 7 dias, após a remoção da ligadura apenas. Outro fato observado foi nos animais que foram tratados com múltiplas sessões de LLLT, onde houve uma redução significativa nos níveis de TNF- α aos 30 dias, quando comparado aos 7 e 15 dias, evidenciando uma redução destes biomarcadores pró-inflamatórios à longo prazo. Para IL-6 houve uma diminuição significativa nos animais do grupo 5FU-PE-RAR-1LLLT em todos os períodos, e no período de 30 dias no 5FU-PE-RAR-4LLLT, demonstrando também redução nos níveis deste biomarcador nos períodos mais tardios de avaliação.

O TNF- α é um mediador pró-inflamatório, que está envolvido na destruição do tecido conjuntivo e do tecido ósseo e os estudos tem mostrado que patógenos periodontais, tais como *Pg* e *Aa* são capazes de desencadear a produção *in vivo* de TNF- α e de outras citocinas [65]. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, desempenha um papel fundamental nas respostas imunes, inflamatórias bem como na periodontite crônica [66]. Assim a redução nos níveis destes biomarcador nos animais tratados com várias sessões de LLLT pode ter interferido na redução do processo de destruição do tecido ósseo que é agravado com a quimioterapia, pois a LLLT é capaz de reduzir a quantidade de TNF- α em tecidos de uma forma dependente da dose [67], no entanto também houve redução do grupo 5FU-PE. Corroborando os resultados deste estudo, autores demonstraram que várias irradiações com laser de baixa intensidade (630-670

nm) em conjunto com a RAR, foram capazes de reduzir o nível de TNF- α nos tecidos gengivais de pacientes com DP, indicando possivelmente uma diminuição da intensidade da resposta inflamatória [68]. Calderín et al. [60] observou um efeito anti-inflamatório, com redução nos níveis de alguns mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β e TNF- α , no tecido gengival após 5 sessões de LLLT.

Recentemente, tem sido reconhecido o papel do sistema imunológico no metabolismo ósseo e reabsorção óssea [69]. A redução dos biomarcadores pró-inflamatórios neste estudo nos animais tratados com laser pode estar relacionada com redução da expressão de RANKL em todos os períodos de avaliação, a qual se liga diretamente à RANK na superfície do pré-osteoclastos e osteoclastos, estimulando tanto a diferenciação de células progenitoras de osteoclastos como a atividade dos osteoclastos maduros, observada nestes animais em todos os períodos de avaliação, quando comparado aos outros animais, bem como a redução significativa das células TRAP-positivas, que evidenciam osteoclastos em atividade, nos animais do 5FU-PE-RAR-4LLLT, quando comparado aos do 5FU-PE-RAR.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com trabalhos anteriores, onde se demonstrou uma maior imunomarcagem para RANKL nos animais tratados com 5-FU [49] e menor número de células TRAP-positivas nos animais tratados com LLLT [39]. Calderin et al. [60], demonstraram uma redução na relação entre os níveis de RANKL e OPG no fluido crevicular gengival após várias sessões de LLLT.

O 5-FU pode provocar a apoptose de células cancerígenas através da ativação da caspase-6 [21]. A análise de osteócitos CAS-3-AT-positivos por mm² foi efetuada em nosso estudo para verificar se a severa PO alveolar e a presença de muitas áreas de osso necrosado, observadas em estudos anteriores [49] não era resultante do aumento no índice de apoptose em tais células, o que geraria maior reabsorção óssea, e

consequentemente, maior PO alveolar. Entretanto, não foi observada tal relação e nenhum tratamento interferiu na presença deste marcador.

Os principais microrganismos causadores de DP são gram-negativos, principalmente *Pg*, *Aa*, *Pi* e *Fn* [70,71]. No presente estudo avaliou-se também o efeito da LLLT na redução dos periodontopatógenos nos animais com PE. Neste estudo pode-se comprovar que após 7 dias da instalação da ligadura há a presença das seguintes bactérias *Aa*, *Pg*, *Pn* e *Fn* no fluido crevicular dos ratos, o que pode justificar o desenvolvimento da PE observada na análise histomorfométrica. A ausência de detecção de *Pi* pela técnica do PCR é corroborada por outro estudo de indução de ligadura em ratos [72].

Os resultados do presente estudo demonstraram que nos animais não tratados com 5-FU e que não receberam nenhum tratamento local, houve uma redução significativa da detecção de *Pn* e *Fn* até os 30 dias, enquanto que não houve redução significativa de nenhuma das bactérias avaliadas nos animais do grupo 5FU-PE demonstrando que a reação de depleção da resposta do hospedeiro pode desequilibrar a microbiota do fluido crevicular, e torna-lá mais agressiva, justificando o agravamento da PE nos animais tratados com 5-FU.

Com relação aos efeitos dos tratamentos, houve no grupo 5FU-PE-RAR redução significativa de *Aa* aos 30 dias quando comparado aos outros períodos e redução significativa de *Pn* nos grupos 5FU-PE-RAR-1LLLT aos 7 e 30 dias e no 5FU-PE-RAR-4LLLT aos 30 dias. Na comparação inter-grupo observou-se uma menor prevalência de *Fn* no grupo PE quando comparado aos 5FU-PE e 5FU-PE-RAR. Observou-se também uma alta prevalência de *Aa*, apesar de não significativa, nos 5FU-PE, 5FU-PE-RAR, 5FU-PE-RAR-1LLLT e 5FU-PE-RAR-4LLLT. A ação da LLLT isolada não se mostra eficiente na redução de microrganismos bacterianos (73,74), com

os parâmetros de irradiação utilizado, no entanto neste estudo houve maior redução de *Pn* após única e múltiplas sessões de LLLT associada a RAR e de *Aa* após RAR isolada.

Diante do exposto pode-se observar que os resultados obtidos, com a associação de múltiplas sessões da LLLT com o tratamento mecânico convencional, na melhora da inflamação e da redução da destruição dos tecidos periodontais, agravadas pela quimioterapia, permitem inferir que a LLLT se constitui em uma terapia coadjuvante promissora, que poderá auxiliar os profissionais da área odontológica no tratamento de pacientes portadores de DP, submetidos à sessões de quimioterapia com 5-FU. No entanto, estudos clínicos em humanos devem ser realizados para avaliar e recomendar os parâmetros de irradiação adequados para serem utilizados nesta abordagem clínica.

Assim pode-se concluir que o 5-FU agravou o desenvolvimento e progressão da PE, e que múltiplas sessões de LLLT coadjuvante à RAR foram efetivas para minimizar os efeitos deletérios do 5-FU.

Agradecimentos

À Disciplina de Periodontia e ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade de São Paulo – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão de bolsa e do Auxílio para o desenvolvimento desta pesquisa (Processo FAPESP 2012/05864-0; 2012/08649-3).

2.7. Referências

1. Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG, Working Group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology (2011) Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions-consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*, 38 Suppl 11:44-8.
2. Champagne CME, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S (2003) Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 31:167–180
3. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguilon JC, et al. (2008) Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *Journal of Clinical Periodontology*, 35 (3):206–214
4. Vitkov L, Hannig M, Krautgartner WD, Fuchs K (2002) Bacterial adhesion to sulcular epithelium in periodontitis. *FEMS Microbiology Letters*, 211(2):239–246
5. Reinhardt RA, Stoner JA, Golub LM, Lee HM, Nummikosko PV, Sorsa T, Payne JB (2010) Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *J Periodontol*, 81(2):251-9.
6. Guimarães MR, Coimbra LS, De aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr (2011) Potent anti-inflammatory effects of systemically

- administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodont Res* 46(2):269–279
7. Ribeiro FV, de Mendonça AC, Santos VR, Bastos MF, Figueiredo LC, Duarte PM (2011) Cytokines and bone-related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol*, 82(8):1187-96
 8. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423 (6937):337-342
 9. Özçaka Ö, Becerik S, Biçakci N, Kyak AH (2014) Periodontal disease and systemic diseases in an older population. *Arch Gerontol Geriatr* 59(2):474-9.
 10. de Jonge ME, Huitema AD, Rodenhuis S, Beijnen JH (2005) Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet* 44 (11):1135-64
 11. Zhang J, Tian Q, Yung CS, Chuen LS, Zhou S, Duan W, et al. (2005) Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. *Drug Metab Rev* 37 (4):611-703
 12. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, HauerJensen M, et al. (2004) Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 100 (9 Suppl):1995–2025
 13. Jensen SB, Pedersen AM, Reibel J, Nauntofte B (2003) Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support Care Cancer* 11 (4):207–25

14. Hofer E, Jensen SB, Pedersen AML, Bardow A, Nauntofte B (2004) Oral microflora in patients with salivary gland hypofunction. *Oral Biosci Med* 1:93–108
15. Hong CH, Napeñas JJ, Hodgson BD, Stokman MA, Mathers-Stauffer V, Elting LS, Spijkervet FK, Brennan MT; Dental Disease Section, Oral Care Study Group, Multi-national Association of Supportive Care in Cancer (MASCC)/International Society of Oral Oncology (ISOO) (2010) A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. *Support Care Cancer* 18 (8):1007-21
16. Jensen SB, Mouridsen HT, Reibel J, Brünner N, Nauntofte B (2008) Adjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces temporary salivary gland hypofunction. *Oral Oncol* 44(2):162-73
17. Xian CJ, Cool JC, Scherer MA, Macsai CE, Fan C, Covino M, Foster BK (2007) Cellular mechanisms for methotrexate chemotherapy-induced bone growth defects. *Bone* 41 (5): 842–850
18. Xian CJ, Cool JC, van Gangelen J, Foster BK, Howarth GS (2007) Effects of etoposide and cyclophosphamide acute chemotherapy on growth plate and metaphyseal bone in rats. *Cancer Biol Ther* 6 (2):170–177
19. Lokich J (1998) Infusional 5-FU: historical evolution, rationale, and clinical experience. *Oncology (Williston Park)* 12 (10 Suppl 7):19–22
20. Noordhuis P, Holwerda U, Van der Wilt C L, Van Groeningen CJ, Smid K, Meijer S, Pinedo HM, Peters GJ (2004) 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann. Oncol* 15 (7): 1025-1032

21. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS (2008) 5-fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules* 13(8):1551-69. Review
22. Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, Theodoro LH (2014) 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* 49(5): 584-94
23. Usumez A, Cengiz B, Oztuzcu S, Demir T, Aras MH, Gutknecht N (2014) Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci* 29 (6):1807-13
24. Fujimoto K, Kiyosaki T, Mitsui N, Mayahara K, Omasa S, Suzuki N, Shimizu N (2010) Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. *Lasers Surg Med* 42:519-26.
25. Weber JB, Pinheiro AL, de Oliveira MG, Oliveira FA, Ramalho LM (2006) Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomed Laser Surg* 24(1):38–44
26. Pinheiro AL, Gerbi ME (2006) Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg* 24(2):169–178
27. Freddo AL, Rodrigo SM, Massotti FP, Etges A, de Oliveira MG (2009) Effect of low-level laser therapy after implantation of poly-L-lactic/polyglycolic acid in the femurs of rats. *Lasers Med Sci* 24(5):721–728
28. Ross G, Ross A (2008) Low level lasers in dentistry. *Gen Dent* 56:629–634
29. Antunes HS, Azevedo AM, Bouzas LFS, Adão CAE, Pinheiro CT, Mayte R, Pinheiro LH, Azevedo R, Matos VD, Rodrigues PC, Small IA, Zangaro RA,

- Ferreira CG (2007) Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. *Blood* 109(5):2250–2255
30. Abramoff MMF, Lopes NNF, Almeida-Lopes L, Dib LL, Lee ML, Delboni A, Caran EM, Petrill AS (2008) Low level laser therapy (685 nm) in the prevention and treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in young patients. *Photomed Laser Surg* 26(4):393–400
31. França CM, França CM, Núñez SC, Prates RA, Noborikawa E, Faria MR, Ribeiro MS (2009) Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *J Photochem Photobiol B*, 94(1):25-31.
32. Lopes NN, Plapler H, Chavantes MC, Lalla RV, Yoshimura EM, AlvesMT (2009) Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters:evaluation of two low-intensity laser protocols. *Support Care Cancer* 17(11):1409–1415
33. Lopes NN, Plapler H, Lalla RV, Chavantes MC, Yoshimura EM, Silva MA, Alves MT (2010) Effects of low-level laser therapy on collagen expression and neutrophil infiltrate in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Lasers Surg Med* 42(6):546-552
34. Mealey BL, Ocampo GL (2007) Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000 44:127–153
35. Zee KY (2009) Smoking and periodontal disease. *Aust Dent J* 54(Suppl. 1): S44–S50
36. De Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG (2008) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* 79(11):2156–2165

37. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Martins TM, Okamoto T, Garcia VG (2009) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* 36(3):219–228
38. Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, de Almeida JM, Martins TM, Bosco AF, Nagata MJH, Cirelli JA, Theodoro LH (2011) Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontal* 38(12):1106–1114
39. Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casatti CA, Ervolino E, Theodoro LH (2013) Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol* 84 (4):556-65
40. Qadri T, Miranda L, Tuner J, Gustafsson A (2005) The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* 32(7):714–719
41. Lui J, Corbet EF, Jin L (2011) Combined photodynamic and low level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 46(1):89–96
42. Aykol G, Baser U, Maden I et al (2011) The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. *J Periodontol* 82(3):481–488
43. Medeiros CACX, Leitão RFC, MAcedo RN, Barbosa DRMM, Gomes AS, Nogueira NAP, Alencar NMN, Ribeiro RA, Brito GAC (2010) Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol* 67(5):1085-1100

44. Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GHG, Pontes AEF, Zuza EP, SPolidório D M P, Toledo BEC, Garcia VG (2012) Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci* 27(4):687-93
45. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Biotechnology* 24:476-480
46. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffelsw et al (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
47. Doyle JJT, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: p.13-18
48. Lima V, Brito GA, Cunha FQ, Rebouças CG, Falcão BA, Augusto RF, Souza ML, Leitão BT, Ribeiro RA (2005) Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. *Eur J Oral Sci*, 113(3):210-7
49. Garcia VG, Novaes VC, de Almeida JM, Longo M, Ervolino E, Bomfim SR, Theodoro LH (2014) Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Support Care Cancer*. Dec 18. [Epub ahead of print]
50. Nualart Grollmus ZC, Morales Chávez MC, Silvestre Donat FJ (2007) Periodontal disease associated to systemic genetic disorders. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 12(3):E211–E215

51. Sallay K, Sanavi F, Ring I, Pham P, Behling UH, Nowotny A (1982) Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodontal Res* 17(3):263–274
52. Samejima Y, Ebisu S, Okada H (1990) Effect of infection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 25(5):308–315
53. von Bültzingslöwen I, Jontell M, Hurst P, Nannmark U, Kardos T. 5-Fluorouracil induces autophagic degeneration in rat oral keratinocytes. *Oral Oncol.* 2001 Sep;37(6):537-44.
54. Xian CJ, Cool JC, Pyragius T, Foster BK (2006) Damage and recovery of the bone growth mechanism in young rats following 5-fluorouracil acute chemotherapy. *J Cell Biochem*, 99(6):1688-704
55. Raghu Nadhanan R, Abimosleh SM, Su YW, Scherer MA, Howarth GS, Xian CJ (2012) Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(11):E1440-9
56. Pejčić A, Zivković V (2007) Histological examination of gingiva treated with low-level laser therapy in periodontal therapy. *J Oral Laser Appl*, 71(1):37-43
57. Pejčić A, Kojović D, Kesic L, Obradović R (2010) The effects of low level laser irradiation on gingival inflammation. *Photomed Laser Surg*, 28(1):69-74
58. AboElsaad, N.S., Soory, M., Gadalla, L.M., et al (2009) Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of bone defects (an experimental study). *Lasers Med Sci*, 24: 527–533

59. Pinheiro AL, Gerbi ME (2006) Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg*, 24(2):169-78
60. Calderín S, García-Núñez JA, Gómez C (2013) Short-term clinical and osteoimmunological effects of scaling and root planing complemented by simple or repeated laser phototherapy in chronic periodontitis. *Lasers Med Sci* 28(1):157-66
61. Donos N, D'Aiuto F, Retzepi M, Tonetti M (2005) Evaluation of gingival blood flow by the use of laser Doppler flowmetry following periodontal surgery. A pilot study. *J Periodontal Res*, 40(2):129-37
62. Arias JL (2008) Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules* 13(10):2340–2369
63. Guchelaar HJ, Vermes I, Koopmans RP, Reutelingsperger CP, Haanen C (1998) Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. *Cancer Chemother Pharmacol* 42(1):77–83
64. Tsukamoto Y, Usui M, Yamamoto G, Takagi Y, Tachikawa T, Yamamoto M, Nakamura M (2012) Role of the junctional epithelium in periodontal innate defense and homeostasis. *J Periodontal Res* 47(6):750–757
65. Kesavalu L, Chandrasekar B, Ebersole JL (2002) In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol*, 17(3):177-80
66. Hanai Y, Sugita N, Wang Y, Yoshihara A, Iwasaki M, Miyazaki H, Nakamura K, Yoshie H (2014) Relationships between IL-6 gene

- polymorphism low BMD and periodontitis in post menopausal women. Arch Oral Biol, 60(4):533-539.
67. Pesevska S, Nakova M, Gjorgoski I, Angelov N, Ivanovski K, Nares S, Andreana S (2012) Effect of laser on TNF-alpha expression in inflamed human gingival tissue. Lasers Med Sci, 27(2):377-81
68. Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT, Castro-Faria-Neto HC, Leonardo PS, Iversen VV, Lopes-Martins RA, Bjordal JM (2006) Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. Photomed Laser Surg, 24(1):33-7
69. Takayanagi H (2005) Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. J Mol Med (Berl), 83(3):170-9
70. Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M (2003) In vitro killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. Antimicrob Agents Chemother 47(3):932-940
71. Sigusch BW, Pfitzer A, Albrecht V, Glockman E (2005) Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. J Periodontol 76(7): 1100-1105
72. Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF (2010) Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. Arch Oral Biol 55(2):142-7.
73. Qin Y, Luan X, Bi L, He G, Bai X, Zhou C, Zhang Z (2008) Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. Lasers Med Sci, 23(1):49-54.

74. Moslemi N, Soleiman-Zadeh Azar P, Bahador A, Rouzmeh N, Chiniforush N, Paknejad M, Fekrazad R (2015) Inactivation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by two different modalities of photodynamic therapy using Toluidine blue O or Radachlorin as photosensitizers: an in vitro study. *Lasers Med Sci*, 30(1):89-94.

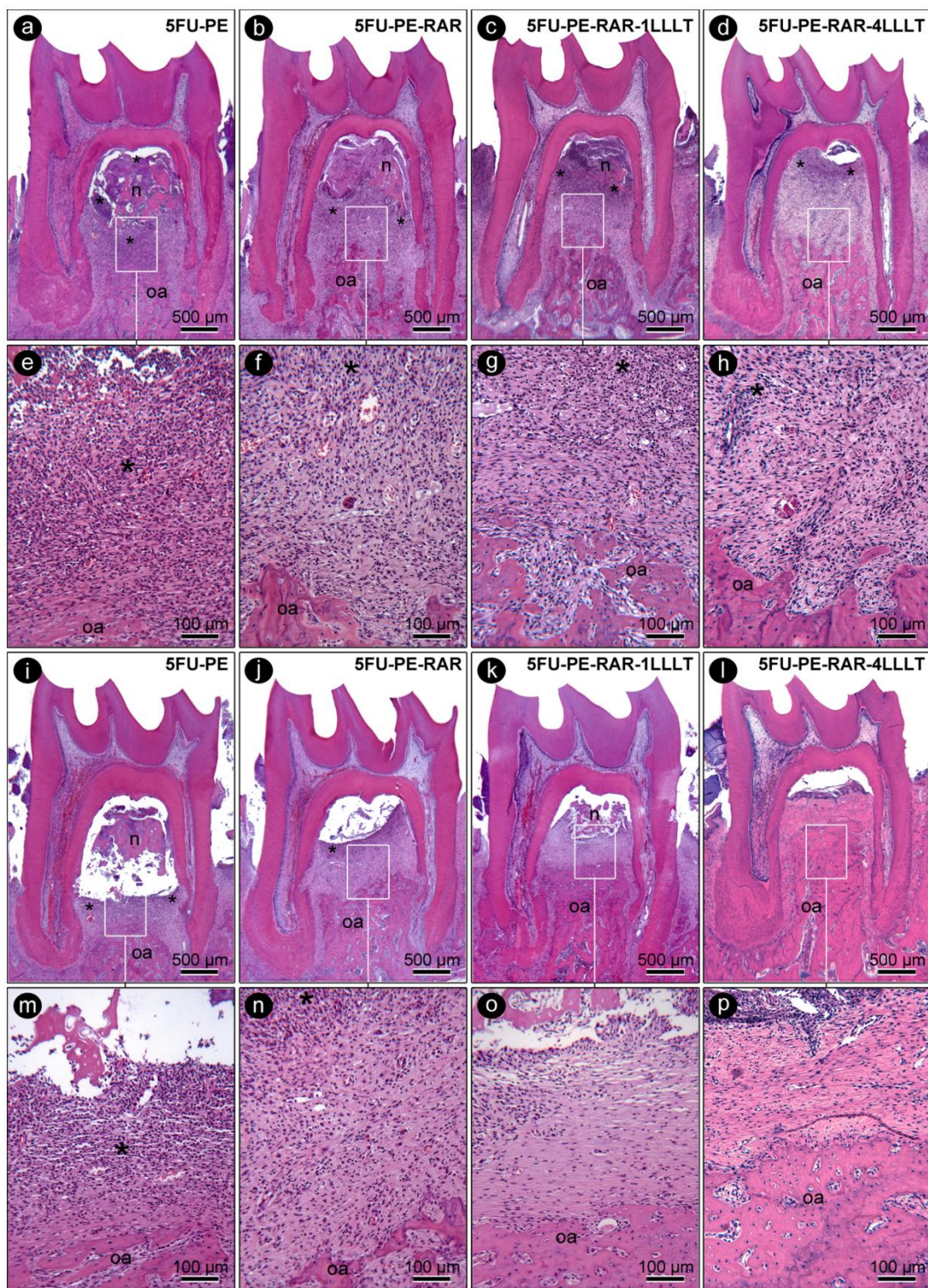


Figura 1: Fotomicrografias do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando a magnitude da resposta inflamatória local, o nível de perda óssea alveolar e o processo de reparo periodontal nos grupos 5FU-PE (a, e, i, m), 5FU-PE-RAR (b, f, j, n), 5FU-PE-RAR-1LLL (c, g, k, o) e 5FU-PE-RAR-4LLL (d, h, l, p) aos 7 (a-h) e aos 30 (i-p) dias. Notar que os grupos 5FU-PE-RAR-1LLL e 5FU-PE-RAR-4LLL apresentam, aos 7 dias, uma menor magnitude na inflamação local (c, d, g, h) e, aos 30 dias, um curso mais favorável no processo de reparação periodontal (k, l, o, p). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; n, restos de osso necrosado. Aumento original: (a-d) e (i-l): 40x; (e-h) e (m-p): 250x. Barras de escala: (a-d) e (i-l): 500 μm ; (e-h) e (m-p): 100 μm . Coloração: hematoxilina e eosina (H&E).

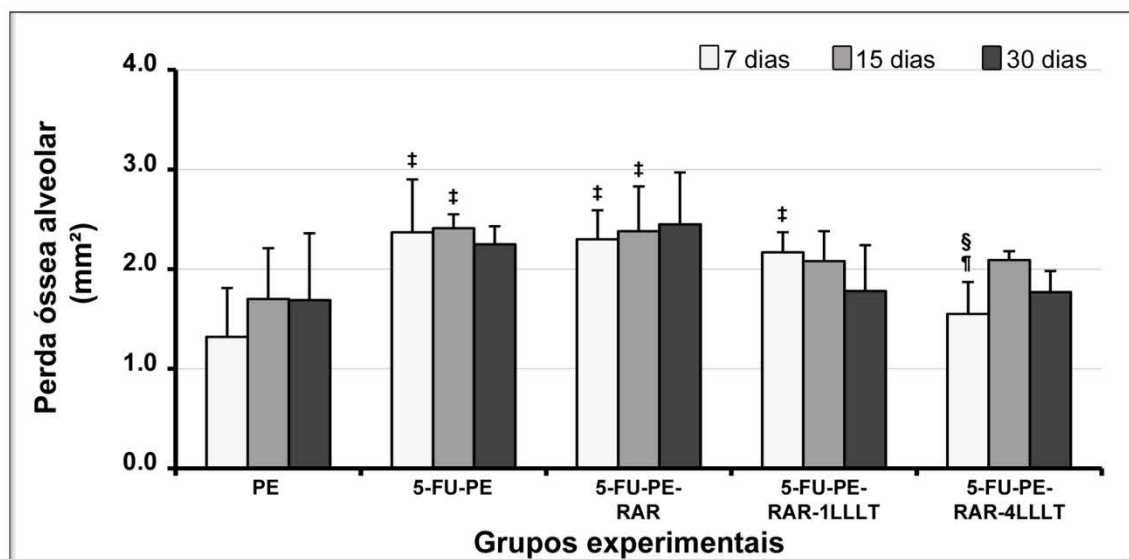


Figura 2: Gráfico mostrando média e desvio-padrão da área de perda óssea alveolar (mm²) na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais e períodos. Abreviações e símbolos: ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PE no mesmo período; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR no mesmo período; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE no mesmo período.

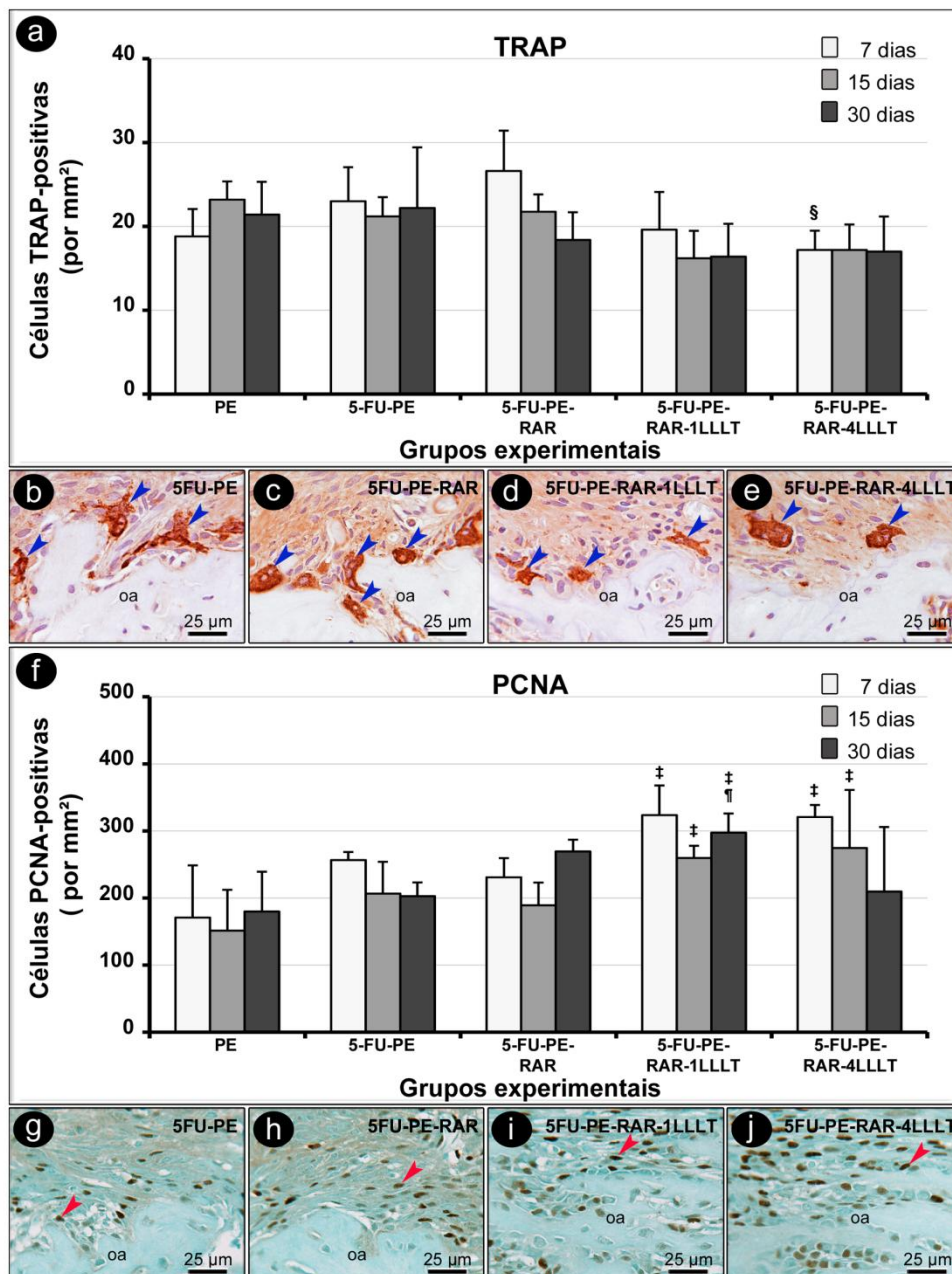


Figura 3: Imunomarcacão para TRAP e PCNA na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando média e desvio-padrão da quantidade de células TRAP-positivas por mm² nos diferentes grupos experimentais e períodos. (b-e) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para TRAP (setas azuis) nos grupos 5FU-PE (b), 5FU-PE-RAR (c), 5FU-PE-RAR-1LLL (d) e 5FU-PE-RAR-4LLL (e) aos 7 dias. (f) Gráfico mostrando média e desvio-padrão da quantidade de células PCNA-positivas por mm² nos diferentes grupos experimentais e períodos. (g-j) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para PCNA (seta vermelha) nos grupos 5FU-PE (g), 5FU-PE-RAR (h), 5FU-PE-RAR-1LLL (i) e 5FU-PE-RAR-4LLL (j) aos 7 dias. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR no mesmo período; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PE no mesmo período; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE no mesmo período. Aumento original: (b-e) e (g-j): 1000x. Barras de escala: (b-e) e (g-j): 25 µm. Contra-coloração: (b-e): Hematoxilina de Harris; (g-j): fast green.

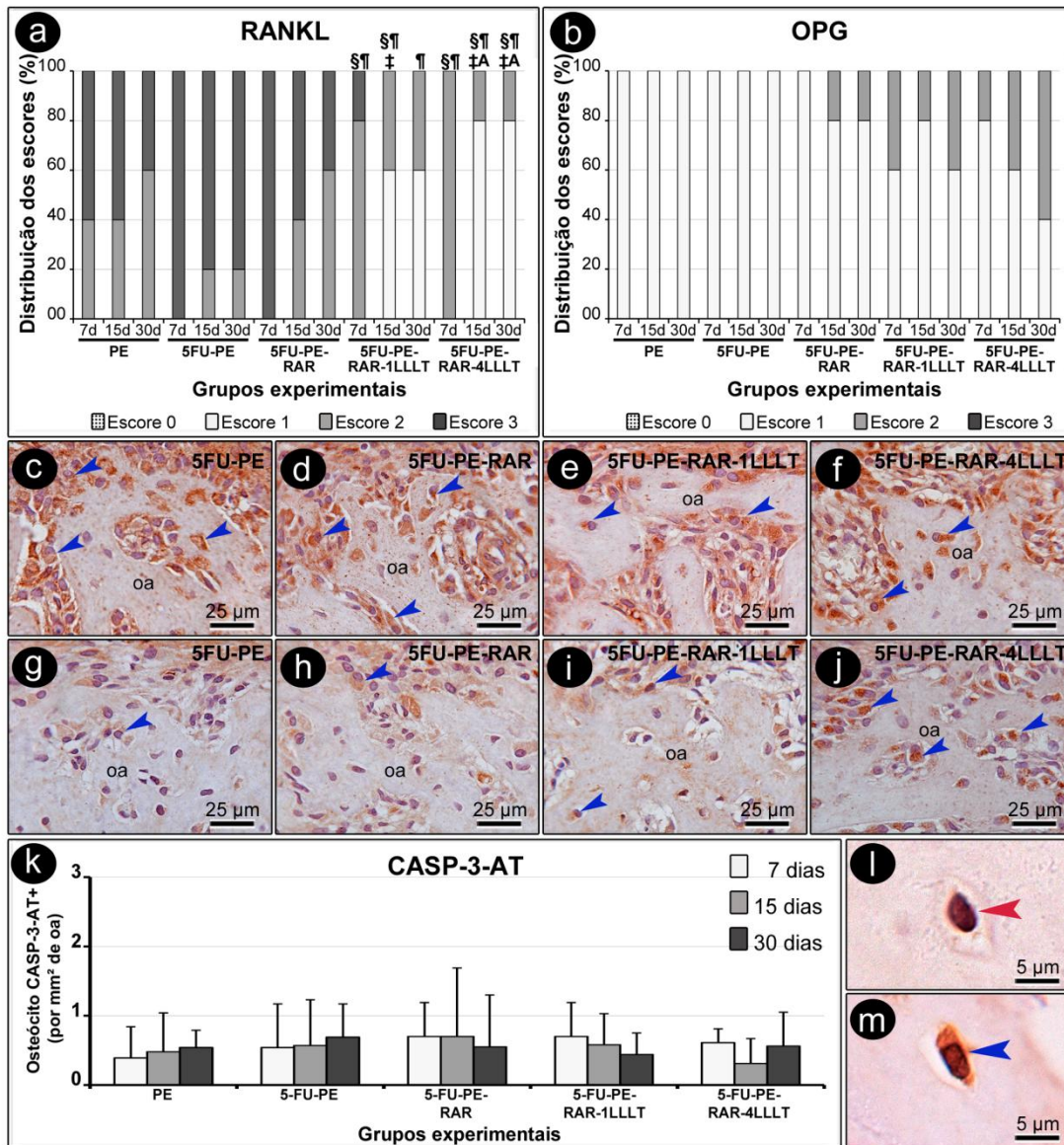


Figura 4: Imunomarcção para RANKL, OPG e CASP-3-AT na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a-b) Gráfico mostrando a distribuição dos escores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcção para RANKL (a) e OPG (b). (c-f) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para RANKL (setas azuis) nos grupos 5FU-PE (c), 5FU-PE-RAR (d), 5FU-PE-RAR-1LLL (e) e 5FU-PE-RAR-4LLL (f) aos 7 dias. (g-j) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OPG (setas azuis) nos grupos 5FU-PE (g), 5FU-PE-RAR (h), 5FU-PE-RAR-1LLL (i) e 5FU-PE-RAR-4LLL (j) aos 15 dias. (k) Gráfico mostrando média e desvio-padrão da quantidade de osteócitos CASP-3-AT-positivos por mm² de osso alveolar nos diferentes grupos experimentais e períodos. (l-m) Fotomicrografias evidenciando um osteócito CASP-3-AT-negativo (l) e osteócito CASP-3-AT-positivo (m) no osso alveolar. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; A, diferença estatisticamente significativa entre os períodos em relação aos 7 dias, considerando cada grupo isoladamente. §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR no mesmo período; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PE no mesmo período; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE no mesmo período. Aumento original: (c-j): 1000x; (l-m): 5000x. Barras de escala: (c-j): 25 µm; (m-l): 5 µm. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.

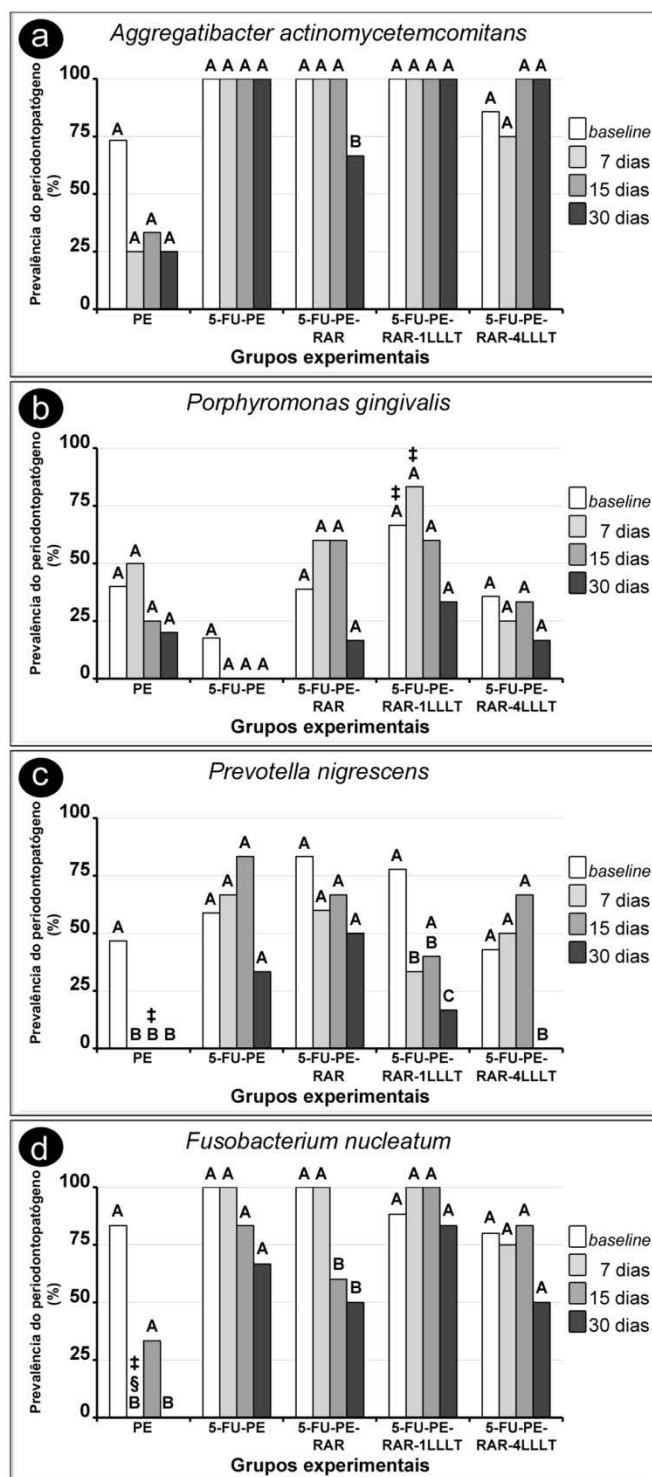


Figura 5. Gráficos evidenciando a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* (a), *P. gingivalis* (b), *P. nigrescens* (c) e *F. nucleatum* (d) nos diferentes grupos experimentais e períodos. Letras maiúsculas diferentes (A, B e C) representam diferença estatisticamente significativa entre os períodos, considerando cada grupo isoladamente. Símbolos: ‡: diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE no mesmo período. §: Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR no mesmo período.

Tabela 1. Média/Mediana (mínimo-máximo) dos valores obtidos para os biomarcadores proinflamatórios (PGE₂, TNF- α e IL-6) nos diferentes grupos experimentais e períodos. Letras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os tempos, considerando cada grupo isoladamente, segundo o teste de Mann Whitney, $p \leq 0,05$. Símbolos mostram diferença estatística entre os grupos experimentais, segundo o teste Mann-Whitney, $p \leq 0,05$: * Não houve diferença estatística entre os grupos considerando cada tempo isoladamente, segundo o teste de Mann Whitney, $p > 0,05$.

		7d	15d	30d
PGE ₂	PE	1063,92/1063,92 ^{A*} (0,84-2127,00)	2291,46/2291,46 ^A (0,93-4582,00)	2798,00/2798,00 ^A (2712,00-2884,00)
	5FU-PE	1787,00/1930,00 ^A (1468,00-1963,00)	1758,66/1256,00 ^A (1078,00-2942,00)	1904,00/1563,00 ^A (1103,00-3046,00)
	5FU-PE-RAR	2367,66/1618,00 ^A (1379,00-4106,00)	767,32/1030,00 ^A (0,98-1271,00)	1188,33/1180,00 ^A (1083,00-1302,00)
	5FU-PE-RAR-1LLLT	3999,33/4320,00 ^A (2397,00-5281,00)	2864,33/3380,00 ^A (1812,00-3401,00)	865,94/865,94 ^A (0,88-1731,00)
	5-FU-PE-RAR-4LLLT	2038,00/2122,00 ^A (1124,00-2868,00)	1672,00/1148,00 ^A (1016,00-2852,00)	1311,33/1126,00 ^A (1033,00-1775,00)
TNF- α	PE	4,90/4,90 ^A (4,24-5,57)	2,30/2,30 ^A (2,04-2,57)	2,49/2,49 ^A (2,04-2,94)
	5FU-PE	7,75/8,36 ^A (3,49-11,41)	5,74/3,31 ^{A,B} (1,21-12,72)	1,76/2,04 ^B (1,21-2,04)
	5-FU-PE-RAR	14,11/11,77 ^A (7,62-22,94)	8,18/8,91 ^A (3,87-11,77)	4,50/1,69 ^A (0,76-11,06)
	5FU-PE-RAR-1LLLT	34,76/29,75 ^A (26,66-47,88)	45,55/52,35 ^A (13,83-70,49)	37,97/2,57 ^A (0,76-110,60)
	5FU-PE-RAR-4LLLT	16,80/11,06 ^A (3,68-35,67)	7,97/2,94 ^A (2,57-18,41)	1,48/1,69 ^B (0,90-1,86)
IL-6	PE	983,50/983,50 ^A (893,00-1074,00)	10,56/10,56 ^A (10,56-10,56)	5,99/5,99 ^A (5,99-5,99)
	5FU-PE	653,12/132,00 ^A (64,36-1763,00)	259,45/64,36 ^A (5,99-708,00)	5,99/5,99 ^A (5,99-5,99)
	5FU-PE-RAR	4584,00/3963,00 ^A (3391,00-6398,00)	1428,95/1388,00 ^A (85,85-2813,00)	39,99/5,99 ^A (5,99-108,00)
	5FU-PE-RAR-1LLLT	6597,33/4970,00 ^A (4824,00-9998,00)	566,33/468,00 ^B (132,00-1099,00)	5,99/5,99 ^C (5,99-5,99)
	5FU-PE-RAR-4LLLT	2786,33/2224,00 ^A (335,00-5800,00)	1209,13/85,85 ^A (10,56-3531,00)	7,51/5,99 ^B (5,99-10,56)

Capítulo 2³

Efeito de repetidos episódios de terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento da periodontite experimental em ratos submetidos à quimioterapia com 5-Fluorouracil

Effect of repeated episodes of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of experimentally induced periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil

³ Artigo a ser enviado para “Antimicrobial Agents and Chemotherapy” e suas normas de publicação encontram-se disponíveis no anexo C.

3.1 Resumo

Este estudo avaliou a influência de múltiplos episódios da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), no tratamento da periodontite experimental (PE) em ratos tratados com o quimioterápico 5-Fluorouracil. Cento e sessenta e oito animais foram submetidos à indução da PE por meio de ligadura no primeiro molar inferior direito e esquerdo. Após 7 dias a ligadura foi removida e os animais separados aleatoriamente em 7 grupos: PE (n=24) - sem tratamento; 5FU-PE (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU (60mg/kg e 40mg/kg); 5FU-PE-RAR (n = 24) - tratados sistemicamente com 5-FU e com RAR; 5FU-PE-RAR-1aPDT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU, com RAR, seguido de aPDT (azul de metileno 100µg/ml e laser de baixa potência) (660 nm; 0,035 W; 4,2 J, 120 segundos); 5FU-PE-RAR-4aPDT (n = 24) - tratados sistemicamente com 5-FU, com RAR seguido de aPDT (0, 24, 48 e 72 horas); 5FU-PE-1aPDT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU seguido de aPDT (aplicação única); 5FU-PE-4aPDT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU, seguido da aPDT (0, 24, 48, 72 horas). Oito animais de cada grupo foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias após tratamento local. A área de perda óssea (PO) na região de furca foi analisada histometricamente, histologicamente e foi realizada análise dos padrões de imunomarcacão para TRAP, PCNA, RANKL, OPG e CASP-3-AT. A quantificacão da citocina PGE₂ foi avaliada pelo teste ELISA e TNF- α e IL-6 foram avaliadas pelo Kits de ensaio Multiplex. A prevalência de periodontopatógenos, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella nigrescens* (Pn), *Prevotella intermedia* (Pi) e *Fusobacterium nucleatum* (Fn) foram avaliados pela técnica da Reacão de Polimerase em Cadeia (PCR). Os dados foram submetidos à análise estatística ($\alpha = 5\%$). Nos animais do grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT houve menor PO comparado aos animais do

grupo 5FU-PE, 5FU-PE-RAR, 5FU-PE-RAR-1aPDT e 5FU-PE-1aPDT aos 7 dias. Aos 30 dias nos grupos 5FU-PE-RAR-4aPDT e 5FU-PE-4aPDT houve menor PO comparados ao 5FU-PE-RAR, demonstrando no grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT menor quantidade de células TRAP-positivas aos 7 dias. Os grupos tratados com a aPDT apresentaram maior número de células PCNA-positivas com redução de imunomarcção de RANKL. Houve menor concentração de PGE₂ no grupo 5FU-PE-RAR-1aPDT e 5FU-PE-RAR-4aPDT, e menor concentração de TNF- α e IL-6 nos grupos tratados com a aPDT. No grupo 5FU-PE-1aPDT e 5FU-PE-4aPDT houve redução significativa de detecção de *Aa* aos 30 dias, e no grupo 5FU-PE-4aPDT houve uma redução da detecção de *Pn* aos 15 dias quando comparado com 5FU-PE. Conclui-se que episódios repetidos de aPDT como terapia coadjuvante ou alternativa foram eficazes para reduzir a PO alveolar e expressão de citocinas pró-inflamatórias, para regulação do metabolismo ósseo, e na redução *Pn* em áreas com PE em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU.

Palavras chaves: Periodontite; Fotoquimioterapia; Quimioterapia

3.2 Abstract

This study evaluated the influence of multiple episodes of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of experimental periodontitis (EP) in rats treated with chemotherapy 5- fluorouracil (5-FU). One hundred and sixty-eight animals were subjected to induction of EP by ligature in mandibular first molar right and left. 7 days after the ligature was removed, animals were randomly separated into 7 groups: EP (n=24) - no treatment; 5FU-EP (n=24) - systemically treated with 5-FU (60mg/kg and 40mg/kg); 5FU-EP-SRP (n=24) - systemically treated with 5-FU, with SRP; 5FU-EP-SRP-1aPDT (n=24) - animals treated systemically with 5-FU, with SRP followed by methylene blue (MB) and low level laser therapy (660 nm, 0.035 W; 4,2 J, 120 seconds; 1.23 W/cm²); 5FU-EP-SRP-4aPDT (n=24) - animals treated systemically with 5-FU with SRP, followed by treatment with aPDT (0, 24, 48 and 72 hours); 5FU-EP-1aPDT (n=24) - systemically treated with 5-FU followed by treatment with aPDT; 5FU-EP-4aPDT (n=24) - treated systemically with 5-FU, followed by treatment with aPDT (0, 24, 48, 72 hours). Eight animals in each group were euthanized at 7, 15 and 30 days after local treatment. The bone loss area (BL) in the furcation region was analyzed histometrically, histologically and analysis of immunostaining patterns for RANKL, OPG, TRAP, PCNA and CASP-3-AT was performed. PGE₂ was measured by ELISA and TNF- α and IL-6 were assessed by kits multiplex assays. The prevalence of periodontopathogens *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Prevotella nigrescens* (*Pn*), *Prevotella intermedia* (*Pi*) and *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) were evaluated by the Polymerase Chain Reaction (PCR). Data were subjected to statistical analysis ($\alpha=5\%$). In 5FU-EP-SRP-

4aPDT group there was lower BL compared to 5FU-EP group, 5FU-EP-SRP, 5FU-EP-SRP-1aPDT and 5FU-EP-1aPDT at 7 days. At 30 days in 5FU-EP-SRP-4aPDT and 5FU-EP-4aPDT groups there was lower BL, compared to the 5FU-EP-SRP, showing in the 5FU-EP-SRP-4aPDT group minor amount of TRAP-positive cells at 7 days. In the groups treated with aPDT there was a higher number of PCNA-positive cells with reduced immunostaining of RANKL. There was lower expression of PGE₂ in 5FU-EP-SRP-1aPDT and 5FU-EP-SRP-4aPDT group, and lower expression of TNF- α and IL-6 in the groups treated with aPDT. In 5FU-EP-1aPDT group and 5FU-EP-4aPDT, there was a significant reduction of *Aa* at 30 days; in 5FU-EP-4aPDT group there was decreased *Pn* at 15 days, compared with 5FU-EP. We have concluded that repeated episodes of aPDT were effective in reducing alveolar BL, expression of pro-inflammatory cytokines, bone metabolism regulation as well as in the decrease of *Pn* in areas with EP in rats subjected to chemotherapy with 5-FU.

Key-words: Periodontitis; Photochemotherapy; Chemotherapy

3.3 Introdução

A periodontite é uma doença infecciosa inflamatória crônica caracterizada por danos das estruturas de suporte do dente (1,2). Algumas bactérias anaeróbias gram-negativas, tais como *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forsythia* (Tf), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Treponema denticola* (Td) (3,4) liberam uma série de substâncias com potencial de virulência, estimulando a resposta imune do hospedeiro (5,6) a liberar mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, proteinases, e prostaglandinas (7). A destruição óssea causada pela periodontite é regulada através do equilíbrio entre os níveis de RANKL (Receptor ativador de NF-Kappa B ligante) e OPG (osteoprogesterina) (8). A RANKL é uma proteína celular ligada à membrana responsável por estimular a diferenciação de osteoclastos e a reabsorção óssea (8,9). É expressa por uma variedade de células, incluindo osteoblastos, fibroblastos e células T. A ligação de RANKL ao seu receptor RANK (Receptor ativador de NF-Kappa B) na superfície de pré-osteoclastos estimula sua diferenciação dentro de osteoclastos maduros, causando a reabsorção óssea (9). A OPG é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral, uma molécula semelhante ao receptor e impede a ligação de RANKL a RANK e assim inibe a osteoclastogênese.

As doenças periodontais podem estar associadas com várias condições sistêmicas, que podem interferir na resposta inflamatória do hospedeiro (10,11), e alterar a cicatrização após a terapia periodontal (12-14). A quimioterapia e radioterapia, além das cirurgias ressectivas são as intervenções mais utilizadas para o tratamento de câncer (15) e é comum produzirem alterações na cavidade bucal, como as mucosites, ulcerações, sangramento gengival (16), inibição nos queratinócitos do epitélio oral (17), alterações no tecido conjuntivo e no ambiente microbiano bucal (18), além do aumento

da destruição dos tecidos periodontais (19). Estas alterações resultam na destruição da mucosa oral como uma barreira anatômica, tornando-se a boca um portal de entrada para bactérias entéricas, vírus e fungos. Assim a ulceração na cavidade bucal resulta em um risco aumentado de infecção, particularmente durante a imunossupressão (20), podendo resultar na destruição periodontal com a formação de defeitos anatômicos permanentes (19,21).

O 5-fluorouracil (5-FU) é uma droga muito utilizada no tratamento dos carcinomas, que causa imunossupressão sistêmica e danifica a integridade epitelial da cavidade bucal (22). O 5-FU é um análogo da pirimidina uracila e é convertido intracelularmente a nucleotídeos ativos que interferem com a síntese de RNA e DNA. Vários estudos tem demonstrado que o 5-FU causa morte celular por apoptose em tecidos, como em linhas de células epiteliais (23) e a mucosite oral é uma das complicações mais comuns. O provável mecanismo da mucosite oral causada pela quimioterapia envolve eventos biológicos complexos mediados por várias citocinas inflamatórias tais como, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL-1 e IL-6). A quimioterapia também tem efeito direto sobre o epitélio basal, tecido conjuntivo, microbiota bucal (18) e na progressão da periodontite (19).

Abordagens terapêuticas para suprimir patógenos potenciais na microflora oral pelo uso de antibióticos, para diminuição do risco à infecções em pacientes com quimioterapia tem sido propostas. Estas abordagens por vezes têm sido bem sucedidas (24), mas pode promover aumento da resistência bacteriana (25).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é baseada na inativação de células alvos, microrganismos, ou moléculas pelo uso de um fotossensibilizador e uma fonte de luz (laser ou LED), que podem formar oxigênio singlete citotóxico e radicais livres, que são prejudiciais aos componentes das células e microrganismos (26-29),

podendo danificar proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, e outros componentes celulares, tais como mitocôndria, lisossomos, núcleo e membrana celular (30, 31). A aPDT pode reduzir periodontopatógenos tais como, *Pg*, *Fusobacterium nucleatum (Fn)* e *Pseudomonas aeruginosa* (32-34). Recentemente, um estudo *in vitro*, demonstrou que o mecanismo de ação da aPDT não limita-se apenas as propriedades bactericidas, podendo contribuir no processo de cicatrização periodontal por meio da inativação de citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α , através de um mecanismo independente da lise bacteriana (35), restaurando a homeostase periodontal e provendo um rápido reparo após o tratamento (36).

Prévios estudos em animais tem demonstrado o efeito bactericida da aPDT contra um grande número de microrganismos (32,37). A aPDT como monoterapia também pode ser considerada uma abordagem não invasiva quando comparada aos métodos de tratamentos convencionais (38). Estudos prévios (27,39,40) tem avaliado os efeitos da aPDT como monoterapia no tratamento da periodontite e outros estudos recentes têm apresentado resultados satisfatórios com a utilização da aPDT na PE em animais (10,11,32,37,41-46) e em humanos (39,47-52). No entanto alguns estudos, em humanos, não têm demonstrado vantagens do uso deste tratamento quando comparado ao tratamento convencional (53-55). Alguns estudos clínicos em humanos tem demonstrado que vários episódios de aPDT associada ao tratamento de raspagem convencional (5 vezes) têm promovido melhora clínica em bolsas residuais (56), e 3 episódios de aPDT após o debridamento mecânico resultou em redução de *Aa*, *Tf* e *Td* (57). Por outro lado um estudo em animal demonstrou que 4 aplicações de aPDT é efetiva no controle da PO alveolar (45).

Apesar do 5-FU ser um quimioterápico muito empregado atualmente no tratamento do câncer, nenhum estudo avaliou os efeitos da aPDT como terapia

coadjuvante ou alternativa no tratamento da periodontite experimental (PE) em animais submetidos à quimioterapia com esta droga. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar por intermédio de avaliação histomorfométrica, imunoistoquímica, imunológica e microbiológica, os efeitos de múltiplos episódios da aPDT, como terapia coadjuvante ou alternativa no tratamento da PE, em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU.

3.4 Materiais e Métodos

Animais

Este estudo foi realizado em 168 ratos Wistar machos adultos (3 meses de idade) pesando entre 200-300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com acesso a ração e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro). O protocolo experimental foi aprovado pela comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (no. 00800-2012).

Indução da Periodontite Experimental

Para todos os procedimentos os animais foram anestesiados por injeção intramuscular da associação de 70 mg/kg de cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa – EUA) e 6 mg/kg de cloridrato de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil). A PE foi induzida por meio da instalação de um fio de algodão (Corrente Algodão n°.24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores direitos e esquerdos. A ligadura foi mantida durante 7 dias em posição subgingival por meio de nós cirúrgicos (46).

Tratamento com 5-FU

O tratamento sistêmico consistiu na injeção intraperitoneal de 60mg/kg e 40 mg/kg de 5-FU (5-Fluorouracil; 50 mg/ml, Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) no dia da instalação da ligadura e 48 horas após, respectivamente (58).

Grupos Experimentais

Após 7 dias da sua instalação a ligadura foi removida e os animais foram separados aleatoriamente, seguindo uma tabela gerada em computador, em grupos de acordo com os seguintes tratamentos locais realizados nos primeiros molares inferiores direitos e esquerdos: PE (n=24) - nenhum tratamento sistêmico ou local; 5FU-PE (n=24) – tratados sistemicamente com 5-FU, sem tratamento local; 5FU-PE-RAR (n=24) – tratados sistemicamente com 5-FU e com raspagem e alisamento radicular (RAR); 5FU-PE-RAR-1aPDT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU, com RAR seguida da aPDT (episódio único); 5FU-PE-RAR-4aPDT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU, com RAR seguida da aPDT (0, 24, 48, 72 horas); 5FU-PE-1aPDT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU, seguida da aPDT (episódio único); 5FU-PE-4aPDT (n=24) - tratados sistemicamente com 5-FU, seguida da aPDT (0, 24, 48, 72 horas).

Raspagem e alisamento radicular

A RAR foi realizada com curetas manuais mini – five 1-2 (Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, USA) por meio de 10 movimentos de tração disto-mesial nas faces vestibular e lingual. As áreas interproximais e de furca foram raspadas com as mesmas curetas através de movimentos de tração cérvico-oclusais (43). Os procedimentos de RAR foram realizados por um mesmo operador experiente, treinado e cego aos grupos experimentais (ML).

Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

O laser utilizado neste estudo foi o laser de Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo InGaAlP (THERA LASE®, D.M.C. Equipamentos Ltda®, São Carlos, São Paulo, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm e fibra com diâmetro de saída de 0,0283

cm². A irradiação foi realizada em cada sessão nos dois primeiros molares (esquerdo e direito) com potência de 0,035 W, durante 60 segundos no centro da face vestibular e 60 segundos no centro na face lingual (4,2 J). O dente recebeu uma densidade de energia por ponto de 74,2 J/cm²/ponto.

Foi utilizado como agente fotossensibilizador o azul de metileno (AM) na concentração de 100 microgramas/mililitro (100 µg/ml ou 320µM). Por meio de uma seringa de insulina, 1 ml da droga fotossensibilizadora foi depositada na área dento-gengival, no primeiro molar inferior direito e esquerdo, tomando o cuidado de depositar a droga de forma lenta e deixando a ponta ativa da agulha no espaço dente/tecido gengival (46). Sessenta segundos após a deposição da droga foi realizada a irradiação do tecido com laser, realizando desta forma a técnica de aPDT nos grupos 5FU-PE-RAR-1aPDT, 5FU-PE-RAR-4aPDT, 5FU-PE-1aPDT e 5FU-PE-4aPDT.

Coleta do conteúdo do líquido crevicular

Foram coletadas amostras de biofilme subgengival na região vestibular dos primeiro molar inferior do lado esquerdo de cada animal de todos os grupos experimentais no *baseline*, aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamento. Foram utilizados cones de papel absorventes estéreis (20 Tanari, Manacapuru, AM, Brasil) para a realização da coleta microbiológica, que foram introduzidos no sulco gengival, em direção apical até que uma leve resistência fosse sentida, permanecendo no local por 30 segundos (49,59). Após sua remoção, os cones de papel absorventes foram armazenados em micro-tubos contendo 500µL de solução salina tamponada (PBS, pH 7.0) e congelados a 80°C negativos, para posterior análise microbiológica (59).

Períodos experimentais

Oito animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia pela injeção de dose letal de tiopental (Cristalia, Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) (150 mg/kg) aos 7, 15 e 30 dias após a realização dos tratamentos locais da periodontite. As hemimandíbulas esquerdas foram dissecadas e fixadas em formaldeído 4% em solução tamponada de 0,1 M, durante 48 horas, para realização das análises histológica, histométrica e imunoistoquímica. O tecido gengival marginal ao redor do primeiro molar direito foi dissecado, congelado em nitrogênio líquido, e em seguida transferido para o freezer a -80°C, para análise imunoenzimática (60).

Processamento histológico e imunoistoquímico

Os espécimes foram desmineralizados em ácido etilenoaminotetracético (EDTA) 10% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Cortes semi seriados (4 µm) foram obtidos no sentido mésio distal. Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca foi evidente, cinco cortes equidistantes de cada espécime foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina (HE), para análise histológica e para análise histométrica. Outros seis cortes foram submetidos à técnica imunoistoquímica. Esta seleção foi realizada por um examinador experiente, treinado e cego aos tratamentos efetuados (ML). Foi utilizada a técnica de imunoperoxidase indireta empregando-se os seguintes anticorpos primários: anti-TRAP (SC 30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-PCNA (VP-P980, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), anti-RANKL (SC 7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-OPG (SC 7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), e anti-CASPASE (9664, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, CA, EUA). O processamento imunoistoquímico seguiu o protocolo descrito por Garcia et al. (44).

Processamento microbiológico por meio da técnica da Reação de Polimerase em cadeia (PCR)

O processamento microbiológico foi realizado utilizando a técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR) descrita por SAIKI et al. (61,62) pesquisando a presença de *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Prevotella nigrescens* (*Pn*), *Prevotella intermedia* (*Pi*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*). Amostras de biofilme do sulco gengival obtidas dos animais foram submetidas à extração do DNA bacteriano, utilizando um protocolo para extração do DNA adaptado de Doyle (63), utilizando centrífuga refrigerada (MIKRO 200, Hettich Lab Technology, Germany). As condições de ciclagem utilizando termociclador (Prime Thermal Cycler, Staffordshire, OSA, UK) para amplificação foram as seguintes para os primers específico: *Pg* – Desnaturação inicial à 95° C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos à 95° C por 30s, 60° C por 30 segundos e 72° por 1 minuto; *Aa* - Desnaturação Inicial à 95° C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação à 95° C por 30s, 60° C por 1 minuto e 72° por 1 minuto; *Pn* - Desnaturação Inicial à 95° C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação à 95° C por 30s, 65° C por 1 minuto e 72° por 1 minuto; *Pi* - Desnaturação Inicial à 95° C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação à 95° C por 30s, 60° C por 1 minuto, 72° por 1 minuto e 72° por 2 minutos; *Fn* - Desnaturação Inicial à 95° C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação à 95° C por 30s, 65° C por 30s, 72° por 30s e 72° por 5 minutos.

Para confirmar a especificidade ou universalidade dos primers, as amostras foram analisados em gel de agarose 1,5% que foi corado com *Syber Safe DNA gel stain* (Invitrogen, São Paulo, Brasil, S33102) em uma cuba para corrida eletroforética horizontal (Major Science, Hoefer, Inc Richmond, CA 94804 USA) conectada a uma fonte de eletroforese (Fonte Smart Rosa, Major Science, 50-60 Hz, 144 VA Hoefer, Inc

San Francisco, CA 94107, USA) a 96V por 40 minutos e submerso em solução tamponante TBE (Tris-ácido bórico e EDTA). Após o término de cada corrida as bandas do gel foram observadas imediatamente em um transluminador de luz ultravioleta e fotografadas a seguir utilizando um sistema de fotodocumentação digital (UVP, mod. GelDoc-It B 2310, Upland, CA, USA).

Determinação da quantificação de PGE₂, TNF- α e IL-6

As proteínas totais foram extraídas a partir das amostras dos tecidos gengivais usando um tampão de extração (Proteína de tecido Reagente de Extração [T-PER] (Pierce Biotechnology; Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, EUA) contendo um cocktail inibidor de protease (Proteína Cocktail de estabilização; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante (Pierce Biotechnology, Rockford, EUA). As amostras de tecido foram maceradas em tampão (50 μ L/MG de tecido), centrifugadas durante 5 minutos a 16.000 g a 4 °C, e o sobrenadante foi removido (60).

A quantificação das proteínas extraídas dos tecidos gengivais foi realizada pelo método de Lowry, e as proteínas das amostras foram analisadas nos testes ELISA para determinar a concentração de prostaglandina E₂ (PGE₂) (ELISA Kit for Prostaglandin E₂, CEA538Ge, Life Science Inc., USCNK, Cologne, Germany). Estes ensaios foram realizados de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e os resultados da leitura com o espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer Model EONC, 110V/60Hz) foram normalizados para o total de concentração de proteínas nas amostras. Para determinação da interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram utilizados Kits Multiplex (Rat Cytokine/Chemokine MAGNETIC Bead Panel - 2Plex [IL-6/TNF- α], Millipore,

RCYTOMAG-80K-02, Billerica, Massachusetts 01821 U.S.A.) e a análise foi realizada em equipamento Luminex II xMap 100/200 (Millipore, LX10009314401, Austin, Texas- U.S.A).

Análise histológica

Um histologista certificado (EE) e cego aos tratamentos efetuados realizou a análise histológica. Os seguintes parâmetros foram avaliados: natureza e grau de inflamação; extensão do processo inflamatório; presença e extensão de necrose tecidual; presença, extensão e natureza de reabsorção de osso, de cimento e de dentina; estado da vasculatura; padrão de estruturação da matriz extracelular dos tecidos periodontais e; padrão de celularidade dos tecidos periodontais.

Análise histométrica

Um examinador calibrado e cego aos tratamentos efetuados realizou a análise histométrica (ML). Foi utilizado um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Alemanha) para se mensurar a área de Perda Óssea (PO) em mm². Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca foi evidente, cinco cortes equidistantes de cada espécime foram selecionados para análise histométrica. Esta seleção foi realizada por um examinador treinado e cego ao tratamento efetuado. Outro examinador calibrado e cego ao tratamento efetuado realizou a análise histométrica. A PO de cada espécime foi mensurada três vezes pelo mesmo examinador (ML), em dias diferentes, com o propósito de reduzir a variação nos dados.

Análise Imunoistoquímica

Um examinador treinado e cego aos tratamentos (ML) selecionou uma secção histológica de cada um dos biomarcadores (TRAP, PCNA, RANKL, OPG, e CASP-3-

AT) de cada espécime. Um histologista certificado (EE) e cego aos tratamentos realizou as análises imunoistoquímicas. A imunomarcação foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no compartimento citosólico das células positivas. A imunomarcação para TRAP e PCNA foi realizada pela contagem de células TRAP-positiva e PCNA-positivas localizadas no centro do septo interradicular do primeiro molar inferior esquerdo de uma área de 1000 μ m x 1000 μ m, com um aumento de 200x [44,46] em três cortes histológicos equidistante. O limite coronário desta área foi a crista óssea alveolar, a partir da qual se estendia apicalmente por uma distância de 1000 μ m.

Uma análise semiquantitativa da imunomarcação para RANKL e OPG foi efetuada na área de furca com um aumento de 400x. O estabelecimento dos escores da imunomarcação foi baseado em Garcia et al. (44): Escore 0 – ausência de imunomarcação (ausência total de células-imunorreativas -IR); Escore 1 - baixo padrão de imunomarcação (\cong 1/4 das células-IR); Escore 2 - moderado padrão de imunomarcação (\cong 1/2 das células-IR) e Escore 3 - alto padrão de imunomarcação (\cong 3/4 das células-IR). Os escores de RANKL e OPG foram individualmente analisados em cada grupo experimental.

Para análise da CASP-3-AT uma linha foi traçada do ápice da raiz mesial ao ápice da raiz distal do primeiro molar inferior. Em seguida foi delineada a superfície do osso alveolar contido nesta região para o cálculo da área de osso remanescente. Nesta área foi mensurada a quantidade de osteócitos CAS-3-AT-positivos, os quais foram expressos por milímetro quadrado.

Reprodutibilidade intra-examinador

Previamente a realização das análises histométrica e imunoistoquímica o examinador foi treinado através da dupla mensuração de 24 espécimes, com o intervalo de 1 semana. O teste-*t* pareado foi calculado e não foi observado diferença significativa entre os valores obtidos nos dois momentos de mensuração ($p \leq 0,05$). Adicionalmente, o coeficiente de correlação de Pearson mostrou um alto grau de correlação (0,95) entre os dois momentos de mensuração para ambas análises.

Análise Estatística

Os resultados dos cálculos para o tamanho da amostra $n(\text{mínimo})=6$, demonstraram um poder de estudo de 75% ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas com o software Bioestat (Bioestat, Instituto Mamirauá, Manaus, Brasil), versão 5.3. A normalidade dos dados histométricos (PO) e imunoistoquímicos (TRAP, PCNA e CASPASE) foi analisada usando o teste de Shapiro Wilk. As análise intra e inter grupo foram feitas com análise de variância (ANOVA) ($p \leq 0,05$). Quando o ANOVA detectou uma diferença significativa, foram feitas comparações múltiplas usando o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para avaliar os dados dos escores de RANKL e OPG dos grupos avaliados. Este teste foi seguido pelo teste não paramétrico Student-Newman-Keuls, quando o teste Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Utilizou-se o teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) para avaliar os valores obtidos para os biomarcadores pró-inflamatórios (PGE₂, TNF- α e IL-6) ($p \leq 0,05$). Utilizou-se para avaliação intra-grupo da prevalência (%) dos periodontopatógenos avaliados o teste de Qui-Quadrado, ($p \leq 0,05$) e para avaliação inter-grupo utilizou-se o teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

3.5 Resultados

Análise Histológica

No grupo PE aos 7 dias, um intenso infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos estava presente em todo o tecido conjuntivo da região de furca. Todos os espécimes deste grupo apresentavam espículas de osso necrosado envoltas por células inflamatórias na região de furca. O septo interradicular se mostrou com um contorno bastante irregular e com trabéculas ósseas bastante delgadas, em cuja superfície se observava grande quantidade de osteoclastos ativos. Aos 15 e 30 dias a inflamação ainda era intensa, no entanto, comparativamente houve uma redução no volume ocupado pelo infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e linfócitos. O tecido conjuntivo nas imediações do septo interradicular mostrou uma discreta redução na inflamação. O septo interradicular se apresentou com trabéculas ósseas delgadas, de contorno externo irregular e com osteoclastos ativos. Áreas de reabsorção radicular externa foram observadas em todos os períodos experimentais.

No 5FU-PE aos 7, 15 e 30 dias prevaleceu a destruição e desestruturação de todos os tecidos periodontais. O tecido conjuntivo da área de furca apresentava-se totalmente desestruturado e com intenso infiltrado inflamatório que atingia a margem do tecido ósseo alveolar do septo interradicular. Em todos os espécimes grandes espículas de osso necrosado, envoltas por grande quantidade de células inflamatórias, estavam presentes (Fig.1a; Fig.1e) Em alguns espécimes, especialmente aos 30 dias, o nível de reabsorção óssea foi tão acentuado que eliminou por completo o septo interradicular e atingiu o osso basal da mandíbula, denotando um aumento da severidade da doença periodontal ao longo do tempo. O tecido ósseo do septo interradicular se mostrou composto por trabéculas ósseas muito irregulares, extremamente delgadas, com amplos

espaços medulares, alguns dos quais com presença de moderada quantidade de células inflamatórias. O contorno externo do septo interradicular se apresentou muito irregular, repleto de lacunas de reabsorção e muitos osteoclastos ativos. Em todos os períodos constatou-se que a superfície radicular apresentava muitas áreas de reabsorção cementária e dentinária (Fig. 1i; Fig. 1m).

No 5FU-PE-RAR aos 7 dias havia severa desestruturação tecidual e intenso infiltrado inflamatório que ocupava o tecido conjuntivo da área de furca e margeava o tecido ósseo do septo interradicular. Espículas de osso necrosado estavam presentes em alguns espécimes. O contorno do septo interradicular se mostrou bastante irregular, repleto de osteoclastos ativos e com as trabéculas ósseas muito delgadas. Aos 15 e 30 dias o volume ocupado pelo infiltrado inflamatório sofreu uma progressiva redução. O tecido conjuntivo nas imediações do septo interradicular mostrou um discreto sinal de reparação, especialmente aos 30 dias, no entanto, a desestruturação tecidual ainda prevalecia. Havia neste tecido uma pequena quantidade de fibras colágenas, muitos fibroblastos, grande número de vasos sanguíneos e uma moderada quantidade de células inflamatórias. As trabéculas ósseas se mostraram com uma espessura moderada, com grande irregularidade na superfície e com osteoclastos em franca atividade. Em todos os períodos foram observadas áreas de reabsorção radicular externa.

Nos 5FU-PE-RAR-1aPDT e 5FU-PE-1aPDT a magnitude da resposta inflamatória local e o padrão de estruturação tecidual apresentaram grande similaridade. Aos 7 dias a resposta inflamatória e a desestruturação tecidual foram mais severas em 5FU-PE-RAR-1aPDT quando comparado com 5FU-PE-1aPDT. No entanto, o progresso do processo de reparo observado aos 15 e 30 dias teve um curso semelhante em ambos grupos. Aos 15 e 30 dias observou-se no tecido conjuntivo da região de furca, que embora ainda se apresentava com um grau de inflamação, uma nítida

reestruturação tecidual. Neste local constatou-se uma moderada quantidade tanto de fibroblastos como de fibras colágenas. Em ambos grupos, aos 15 e 30 dias, o osso do septo interradicular exibiu trabéculas ósseas de contorno externo irregular, apresentando em sua superfície osteoblastos ativos, áreas de reabsorção óssea ativa com alguns osteoclastos. Constatou-se poucas áreas de reabsorção radicular externa (Fig.1b; Fig.1f; Fig.1j; Fig.1n).

Os grupos 5FU-PE-RAR-4aPDT e 5FU-PE-4aPDT apresentaram aspecto histológico muito semelhante em todos os períodos experimentais. Aos 7 dias, em comparação com os demais grupos, a resposta inflamatória local se mostrou mais branda e menos extensa. O tecido conjuntivo da região de furca se mostrou constituído de moderada quantidade tanto de fibroblastos como de fibras colágenas. O septo interradicular se mostrou com contorno externo mais regular, com presença de pequena quantidade de osteoclastos, e grande quantidade de osteoblastos, alguns dos quais já em franca atividade de neoformação óssea, em especial no grupo 5FU-PE-4aPDT (Fig.1c; Fig.1g; Fig.1d; Fig.1h). Aos 15 e 30 dias o infiltrado inflamatório foi progressivamente tornando-se menos intenso e extenso. O tecido conjuntivo da região de furca foi progressivamente se tornando denso não modelado. O tecido ósseo do septo interradicular se mostrou com contorno mais regular, repleto de osteoblastos ativos e com um padrão de reabsorção óssea semelhante ao de normalidade. Poucas foram as áreas de reabsorção radicular externa observadas (Fig. 1k; Fig.1o; Fig.1l; Fig.1p).

Análise histométrica

Os resultados estão apresentados na Figura 2. Na análise intergrupo, observou-se aos 7 dias que os animais dos grupos 5FU-PE ($2,37\pm 0,53$), 5FU-PE-RAR ($2,30\pm 0,29$) e 5FU-PE-1aPDT ($2,15\pm 0,29$) apresentaram maior PO comparado ao grupo PE

(1,32±0,49); os animais do 5FU-PE-RAR-4aPDT (1,26±0,38) apresentaram uma menor PO comparado aos animais do 5FU-PE (2,37±0,53), 5FU-PE-RAR (2,30±0,29), 5FU-PE-RAR-1aPDT (2,03±0,41) e 5FU-PE-1aPDT (2,15±0,29). Aos 15 dias os animais do 5FU-PE (2,41±0,14) e 5FU-PE-RAR (2,38±0,45) apresentaram maior PO comparado ao grupo PE (1,70±0,51). Aos 30 dias os animais do 5FU-PE-RAR-4aPDT (1,40±0,58) e 5FU-PE-4aPDT (1,47±0,68) apresentaram menor PO comparado ao grupo 5FU-PE-RAR (2,45±0,52; $p \leq 0,05$).

Análise imunoistoquímica

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de TRAP, PCNA, RANKL, OPG, e CASPASE mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação imunoistoquímica. As células imunorreativas apresentaram uma coloração acastanhada confinada ao compartimento citossólico. As células TRAP-positivas apresentavam mais de três núcleos, e foram localizadas na superfície do osso alveolar do septo interdicular, com imunomarcação predominantemente em osteoclastos.

Foi observado que os animais dos grupos 5FU-PE-RAR e 5FU-PE-1aPDT apresentaram maior quantidade de células TRAP-positivas aos 7 dias quando comparados aos animais do 5FU-PE-RAR-4aPDT ($p \leq 0,05$), e os animais do grupo 5FU-PE-RAR apresentaram maior quantidade de células TRAP-positivas, quando comparado com os animais do 5FU-PE-RAR-1aPDT ($p \leq 0,05$). Aos 15 dias os animais do 5FU-PE-RAR-4aPDT apresentaram menor quantidade de células TRAP-positivas quando comparados aos animais dos grupos PE, 5FU-PE, 5FU-PE-RAR, 5FU-PE-1aPDT e 5FU-PE-4aPDT. Os animais do grupo 5FU-PE-RAR-1aPDT apresentaram menor quantidade de células TRAP-positivas, quando comparados com os animais do grupo PE ($p \leq 0,05$). Aos 30 dias os animais do 5FU-PE-RAR-4aPDT apresentaram

menor quantidade de células TRAP-positivas quando comparados aos animais dos grupos PE, 5FU-PE e 5FU-PE-RAR (Fig. 3a; Fig.3b; Fig.3c; Fig.3d; Fig.3e).

A imunomarcção para PCNA foi expressa predominantemente em células conjuntivas e da superfície do osso. Aos 7 dias os animais do 5FU-PE-RAR-1aPDT, 5FU-PE-RAR-4aPDT, 5FU-PE-1aPDT e 5FU-PE-4aPDT mostraram maior número de células PCNA-positivas, comparados aos animais do grupo PE ($p \leq 0,05$); os animais do grupo 5FU-PE-1aPDT mostraram maior número de células PCNA-positivas comparados aos grupos 5FU-PE e 5FU-PE-RAR; os animais do grupo 5FU-PE-RAR-1aPDT mostraram maior número de células PCNA-positivas comparados com os grupos do 5FU-PE-RAR ($p \leq 0,05$; Fig.3f; Fig.3g; Fig.3h; Fig.3i; Fig.3j).

A imunomarcção para RANKL e OPG foi predominantemente expressa em osteoblastos e, em alguns fibroblastos no osso e tecido conjuntivo na região de furca. Na comparação intra-grupo houve uma redução significativa de imunomarcção para RANKL no 5FU-PE-RAR-1aPDT aos 30 dias, quando comparado aos 7 dias ($p=0,0562$). No grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT houve uma redução significativa de imunomarcção para RANKL aos 15 e 30 dias, quando comparado aos 7 dias ($p=0,0339$). Na comparação inter-grupo houve uma redução significativa de imunomarcção para RANKL aos 7 dias no 5FU-PE-RAR-4aPDT, quando comparado com 5FU-PE e 5FU-PE-RAR ($p=0,0066$), e houve uma redução significativa de imunomarcção para RANKL no 5FU-PE-4aPDT, quando comparado com PE ($p=0,0483$), 5FU-PE ($p=0,0031$), 5FU-PE-RAR ($p=0,0031$), 5FU-PE-RAR-1aPDT ($p=0,00483$) e 5FU-PE-1aPDT ($p=0,0483$). Aos 15 e 30 dias houve uma redução significativa de imunomarcção para RANKL no 5FU-PE-RAR-4aPDT e 5FU-PE-1aPDT, quando comparados com PE ($p=0,0020$; $0,0047$), 5FU-PE ($p=0,0005$; $0,0004$) e 5FU-PE-RAR ($p=0,0020$; $0,0047$). Aos 30 dias houve uma redução significativa de

imunomarcação para RANKL no 5FU-PE-RAR-4aPDT, quando comparado com 5FU-PE-1aPDT e 5FU-PE-4aPDT ($p=0,0372$) (Fig.4a; Fig.4c; Fig.4d; Fig.4e; Fig.4f). Para a imunomarcação de OPG não houve diferença estatisticamente significativa na comparação intra-grupo e inter-grupo (Fig.4b; Fig.4g; Fig.4h; Fig.4i; Fig.4j).

Para CASP-3-AT em nenhum grupo experimental a quantidade média de osteócitos CAS-3-AT-positivos por mm^2 ultrapassou o valor de uma célula, e não houve diferença estatisticamente significativa intra-grupo e inter-grupo nem nenhum dos períodos avaliados (Fig.4k; Fig.4l).

Análise imunológica

Os resultados estão apresentados na Tabela 1. A análise da presença dos biomarcadores pró-inflamatórios PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 não demonstraram diferenças significativas entre os grupos.

Na comparação intra-grupo houve uma menor concentração da citocina PGE_2 no grupo 5FU-PE-RAR-1aPDT aos 15 dias, quando comparado aos 7 dias, e menor concentração da PGE_2 no grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT aos 30 dias, quando comparado aos 7 dias ($p\leq 0,05$). Houve menor concentração de $\text{TNF-}\alpha$ no grupo 5FU-PE-RAR-1aPDT aos 15 e 30 dias, quando comparado aos 7 dias; no grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT houve menor concentração aos 30 dias, quando comparado aos 7 e 15 dias; nos grupos 5FU-PE-1aPDT e 5FU-PE-4aPDT houve menor concentração aos 30 dias, quando comparados ao período de 7 dias ($p\leq 0,05$). Houve menor concentração de IL-6 no grupo 5FU-PE-RAR-1aPDT aos 15 dias, quando comparado aos 7 dias; houve menor concentração de IL-6 no 5FU-PE-RAR-4aPDT aos 30 dias, quando comparado aos 7 e 15 dias; nos grupos 5FU-PE-1aPDT e 5FU-PE-4aPDT houve menor concentração aos 30 dias, quando comparado aos 7 dias ($p\leq 0,05$).

Análise Microbiológica

Os dados estão apresentados na Figura 5. Na comparação intra-grupo, houve uma redução significativa de *Pn* aos 7, 15 e 30 dias no grupo PE quando comparado, com o *baseline*, havendo uma detecção negativa nestes períodos. No grupo PE houve uma redução significativa de *Fn* aos 7 dias, quando comparado com o *baseline*; houve uma redução significativa de *Fn* aos 30 dias, quando comparado aos 15 dias, e houve uma redução significativa de *Fn* aos 30 dias quando comparado com o *baseline* ($p \leq 0,05$), havendo uma detecção negativa aos 7 e 30 dias.

No grupo 5FU-PE-RAR houve uma redução significativa de *Aa* aos 30 dias, quando comparado ao *baseline*, 7 e 15 dias. Houve uma redução significativa de *Fn* aos 15 e 30 dias quando comparado com *baseline* e 7 dias ($p \leq 0,05$). No grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT houve uma redução significativa de *Pn* aos 7 e 30 dias, quando comparado com *baseline*. No 5FU-PE-1aPDT houve uma redução significativa de *Aa* aos 30 dias, quando comparado com *baseline* e 7 dias ($p \leq 0,05$). No 5FU-PE-4aPDT houve uma redução significativa de *Aa* aos 30 dias, quando comparado com *baseline*, 7 e 15 dias e houve uma redução significativa de *Pn* aos 15 e 30 dias, quando comparado com *baseline* e 7 dias, havendo uma detecção negativa aos 15 e 30 dias ($p \leq 0,05$).

Na comparação inter-grupo houve uma redução significativa de *Pn* aos 15 dias no PE, quando comparado com 5FU-PE; houve uma redução significativa de *Fn* aos 7 dias no PE, quando comparado com os grupos 5FU-PE e 5FU-PE-RAR. Houve uma redução significativa de *Pg* aos 30 dias no 5FU-PE, quando comparado com 5FU-PE-RAR-4aPDT. Houve uma redução significativa de *Pn* aos 15 dias no 5FU-PE-4aPDT quando comparado com 5FU-PE ($p \leq 0,05$).

3.6 Discussão

No presente estudo foi avaliado os efeitos de único ou múltiplos episódios da aPDT, como terapia coadjuvante ou alternativa no tratamento da PE em animais tratados com 5-FU. A periodontite nos animais tratados com 5-FU apresentou-se mais severa do que nos animais que não foram tratados com o 5-FU, prevalecendo a destruição e desestruturação de todos os tecidos periodontais, presença de grandes espículas de osso necrosado, envoltas por grande quantidade de células inflamatórias e um aumento significativo de PO alveolar na região de furca. Estes resultados demonstram que o 5-FU agravou a severidade da periodontite, e estão de acordo com estudo anterior, que demonstrou que o 5-FU, reduziu a porcentagem de osso na região de furca, apresentando grandes áreas de osso necrótico envolvendo praticamente a totalidade do osso na região da furca (19). Estes achados podem ser justificados pela ação do 5-FU em promover severa osteopenia, supressão de células ósseas formadoras (osteoblastos), recrutamento de osteoclastos (64-66), favorecendo o processo de reabsorção óssea (19) e por danificar as células do epitélio juncional (19) que se constitui na primeira barreira de defesa dos tecidos periodontais de sustentação (15).

Nos animais tratados com vários episódios de aPDT, coadjuvante à RAR, houve uma diminuição na PO na área de furca em relação aos animais dos grupos tratados com 5-FU aos 7 dias, demonstrando moderada quantidade de fibroblastos e de fibras colágenas e grande quantidade de osteoblastos, alguns dos quais já em franca atividade de neoformação óssea. Aos 30 dias, nos animais tratados com vários episódios de aPDT como técnica coadjuvante e alternativa, houve uma diminuição na PO na área de furca em relação aos animais que foram tratados apenas com RAR, demonstrando um tecido conjuntivo denso não modelado, tecido ósseo com contorno mais regular e repleto de osteoblastos ativos. Estes resultados demonstram que múltiplos episódios de

aPDT como terapia coadjuvante ou alternativa favorece o processo de reparo, minimizando a magnitude da resposta inflamatória local e acelerando o processo de reestruturação tecidual nestes animais. Tais achados estão de acordo com os resultados de estudos anteriores, que demonstram redução de PO na PE após tratamento coadjuvante com um episódios de aPDT (10,11,41,42,44,46). Com relação ao número de episódios de aPDT, os resultados deste estudo, também são corroborados por outros estudos em animais que demonstraram que após 4 aplicações de aPDT, houve redução de PO (45).

A análise do PCNA foi realizada para elucidar os efeitos da aPDT em osteoblastos e fibroblastos. Os animais que foram tratados com aPDT mostraram maior número de células PCNA-positivas aos 7 dias, demonstrando uma maior proliferação celular em períodos iniciais, corroborando os achados de outro estudo em ratos (44).

Além do efeito da aPDT na redução de periodontopatógenos (32-34) esta terapia também pode modular a resposta do hospedeiro, devido a sua habilidade em reduzir a estimulação de linfócitos T (67), interfere com a função imunoestimulatória das células apresentadoras de antígeno (68,69) e inativa mediadores pró-inflamatórios (70,71).

Os níveis de PGE_2 , nos animais tratados com 4 episódios de aPDT como coadjuvante, reduziram aos 30 dias. O alto nível de PGE_2 pode estar relacionado com a ocorrência e desenvolvimento do processo da DP. O aumento da secreção de PGE_2 que ocorre durante o processo de PO induzida por inflamação (72) desempenha um papel crucial para promover a expressão da atividade de $TNF-\alpha$ (73). Neste estudo esta redução ocorreu ao mesmo tempo em que houve a redução de PO alveolar.

Os resultados também demonstraram que houve uma redução significativa de $TNF-\alpha$ e IL-6 nos animais tratados com aPDT coadjuvante à RAR. Outro fato observado foi nos animais que foram tratados com aPDT apenas, onde houve uma

redução significativa de TNF- α e IL-6 aos 30 dias, evidenciando uma redução do processo de destruição tecidual confirmado na análise histológica.

A redução destes biomarcadores nos animais tratados com aPDT pode ter interferido na redução do processo de destruição do tecidos ósseo, que foi agravado com a quimioterapia. Corroborando os resultados deste estudo, autores demonstraram *in vitro* que a aPDT apresenta um potencial de inativar citocinas inflamatórias tais como IL-1 β e TNF- α (70). Outros autores demonstraram em humanos que houve uma redução de TNF- α em áreas tratadas com aPDT coadjuvante a RAR (74). Também em estudo clínico em humanos, foi demonstrado uma redução nos níveis de IL-6 aos 6 meses e IL-1 β aos 3 e 6 meses no grupo tratado com aPDT (38). Outro estudo clínico demonstrou que 4 aplicações de aPDT coadjuvante à RAR, foram capazes de reduzir IL-1 β /IL-10 em 14 e 90 dias (50).

O TNF- α é uma citocina produzida por monócitos/macrófagos que tem um efeito pró-inflamatório, mediado diretamente e indiretamente a reabsorção óssea e inibe formação óssea (75), promove proliferação e diferenciação de osteoclastos (76). RANKL e OPG são considerados importantes reguladores positivo e negativo da osteoclastogênese e reabsorção óssea (77,78).

A redução dos biomarcadores pró-inflamatórios neste estudo nos animais tratados com aPDT pode estar relacionada com redução da expressão de RANKL observado em todos os períodos de avaliação, a qual se liga diretamente à RANK na superfície dos pré-osteoclastos e osteoclastos, estimulando tanto a diferenciação de células progenitoras de osteoclastos, estimulando tanto a diferenciação de células progenitoras de osteoclastos como a atividade dos osteoclastos maduros. Tais fatos também foram confirmados com a redução significativa das células TRAP-positivas, que evidenciam osteoclastos em atividade, nos animais tratados com vários episódios de

aPDT. Estes resultados são corroborados por estudos prévios em animais, onde demonstrou-se uma maior imunomarcção para RANKL em animais tratados com 5-FU (19) e menor número de células TRAP-positivas e RANKL nos animais tratados com aPDT (44,46). Os resultados deste estudo não demonstraram altos níveis de CAS-3-AT-positivos nos animais tratados com 5-FU e nenhum efeito dos tratamentos sobre esta foi observado.

No presente estudo observou-se após 7 dias da instalação da ligadura a presença de *Aa*, *Pg*, *Pn* e *Fn*, no entanto não foi detectada *Pi*, fato corroborado por outro estudo de indução de ligadura em ratos (79). Nos animais não tratados com 5-FU e que não receberam nenhum tratamento local, houve uma redução significativa da detecção de *Pn* e *Fn* até os 30 dias, enquanto que não houve redução significativa de nenhuma das bactérias avaliadas nos animais tratados com 5-FU e que não receberam nenhum tratamento local, demonstrando a dificuldade destes animais em restabelecer o equilíbrio da microbiota do fluido crevicular o que justifica também o agravamento da PE nestes animais.

Estudos tem mostrado que pacientes tratados com quimioterapia tem um aumento do número de bastonetes gram-negativos em sua flora (80), e que o tratamento com o 5-FU aumenta o número de anaeróbios facultativos, levando a mudança na composição da microflora (81).

Vários episódios de aPDT, foram capazes de promover redução da detecção de algumas espécies periodontopatogênicas como *Aa* e *Pn* nos períodos avaliados. Outro estudo em animais confirmou a redução de *Aa* após 1 aplicação de aPDT em alvéolos contaminados previamente por DP (49).

A aPDT baseia-se no princípio de um fotossensibilizador que se liga as células alvo e é ativado pela luz de um comprimento de onda apropriado. Ao alterar o estado de

energia das moléculas no fotossensibilizador, são formados radicais livres (Reação Tipo I) e oxigênio singlete (Reação Tipo II), os quais são tóxicos para a célula pela destruição da membrana, mitocôndrias ou núcleo (56). A penetração do fotossensibilizador no tecido epitelial e conjuntivo pode atingir os microorganismos que se infiltram através da barreira epitelial (32) e inativar proteases bacteriana, reduzindo desta forma a patogenicidade de cepas bacterianas (70). A utilização do laser em baixa intensidade como fonte de luz pode também alterar o comportamento celular por afetar a cadeia respiratória da mitocôndria ou a membrana de canais de cálcio, facilitando a síntese de colágeno, angiogênese e liberação de fatores de crescimento que acelera a cicatrização (82,83). No protocolo de tratamento com uso de aPDT deve ser considerado os diferentes parâmetros do laser como: emissor (comprimento de onda) tipo do laser, potência, energia, frequência do tratamento (74), além da concentração e tipo de fotossensibilizadores (46).

Alguns estudos *in vivo* tem demonstrado a capacidade da aPDT em eliminar agentes patogênicos periodontais (49,84,85); além disto a literatura não tem relatado nenhuma resistência bacteriana contra aPDT, e por conseguinte, a sua repetida aplicação em conjunto com debridamento mecânico (86) ou como método alternativo pode ser uma possível opção.

Estudos clínicos em humanos com periodontite crônica, observou que o *Aa* foi menos frequente no grupo da aPDT aos 3 meses comparado aos 6 meses e *Pg* menos frequente na aPDT aos 3 meses (38). Petelin et al. (57), demonstraram que repetidas aplicações de aPDT diminuiu a proporção de áreas positivas para *Pi*, *Tf* e *Td* aos 3 meses, e uma redução no número de todos os 5 patógenos (*Aa*, *Pg*, *Pi*, *Tf* e *Td*).

Apesar das limitações do presente estudo, por se constituir um estudo experimental em animais, pode-se sugerir que a aPDT é uma terapia periodontal

promissora, principalmente se utilizada como uma abordagem alternativa para o tratamento periodontal de pacientes sob efeito de quimioterapia, por se tratar de uma terapia minimamente invasiva, de fácil aplicação, baixo custo, não provocar desconforto podendo ser realizada inclusive em ambiente hospitalar. No entanto, estudos clínicos em humanos devem ser realizados para avaliar a efetividade desta terapia em pacientes submetidos à quimioterapia.

Diante dos parâmetros utilizados neste estudo, pode-se concluir que episódios repetidos de aPDT coadjuvante ou como técnica alternativa à RAR promove redução de bactérias periodontopatogênicas, minimiza os efeitos deletérios do 5-FU, comprovado pela redução da PO alveolar, da expressão de citocinas pró-inflamatórias, e pela regulação do metabolismo ósseo, em áreas com PE em ratos submetidos à quimioterapia com 5-FU.

Agradecimentos

À Disciplina de Periodontia e ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade de São Paulo – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão de bolsa e pelo auxílio para o desenvolvimento desta pesquisa (Processo FAPESP 2012/05864-0; 2012/08649-3).

3.7. Referências Bibliográficas

1. **Visser MB, Ellen RP.** 2011. New insights into the emerging role of oral spirochaetes in periodontal disease. *Clin Microbiol Infect* 17:502-12.
2. **Deo V, Bhongade ML.** 2010. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response. *Dent Today* 29:60-2, 64-6; quiz 68-9. Review.
3. **Vitkov L, Hannig M, Krautgartner WD, Fuchs K.** 2002. Bacterial adhesion to sulcular epithelium in periodontitis. *FEMS Microbiology Letters* 211:239–246.
4. **Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, et al.** 2008. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *Journal of Clinical Periodontology* 35:206–214.
5. **Garlet GP.** 2010. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 89:1349-63.
6. **Liu PF, Zhu WH, Huang CM.** 2009. Vaccines and photodynamic therapies for oral microbial-related diseases. *Curr Drug Metab* 10:90-94.
7. **Sorkhdini P, Moslemi N, Jamshidi S, Jamali R, Amirzargar AA, Fekrazad R.** 2013. Effect of Hydrosoluble Chlorine–Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy on Clinical Parameters and Cytokine Profile in Ligature-Induced Periodontitis in Dogs. *J Periodontol* 84:793-800.
8. **Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR.** 2010. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontol 2000* 53:55-69.

9. **Belibasakis GN, Bostanci N.** 2012. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol* 39:239-48.
10. **Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oschiwa M, Garcia VG.** 2008a. In Vivo Effect of Photodynamic Therapy on Periodontal Bone Loss in Dental Furcations. *J Periodontol* 79:1081-1088.
11. **Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, de Almeida JM, Martins TM, Bosco AF, Nagata MJH, Cirelli JA, Theodoro LH.** 2011. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol* 38:1106–1114.
12. **Chang PC, Chung MC, Wang YP, Chien LY, Lim JC, Liang K, Chong LY, Kuo YP, Chen CH, Chiang HC.** 2012. Patterns of diabetic periodontal wound repair: a study using micro-computed tomography and immunohistochemistry. *J Periodontol* 83:644-52.
13. **Javed F, Almas K.** 2010. Osseointegration of dental implants in patients undergoing bisphosphonate treatment: a literature review. *J Periodontol* 81:479-84.
14. **Javed F, Al-Askar M, Al-Rasheed A, Babay N, Galindo-Moreno P, Al-Hezaimi K.** 2012. Comparison of sel-perceived oral health periodontal inflammatory conditions and socioeconomic status in individuals with and without prediabetes. *Am J Med Sci* 344:100-4
15. **Naidu MU, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Suman A, Roy P.** 2004. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis—complicating the treatment of cancer. *Neoplasia* 6:423–431.
16. **Dreizen S.** 1978. Stomatotoxic manifestations of cancer chemotherapy. *J Prosthet Dent* 40:650-5.

17. **von Bültzingslöwen I, Jontell M, Hurst P, Nannmark U, Kardos T.** 2001. 5-Fluorouracil induces autophagic degeneration in rat oral keratinocytes. *Oral Oncol* 37:537-44.
18. **Scully C, Sonis S, Diz PD.** 2006. Oral mucositis. *Oral Dis* 12:229-241.
19. **Garcia VG, Novaes VC, de Almeida JM, Longo M, Ervolino E, Bomfim SR, Theodoro LH.** 2014. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Support Care Cancer* De 18. [Epub ahead of print]
20. **Zegarelli DJ.** 1993. Fungal infections of the oral cavity. *Otolaryngologic clinics of North Am* 26:1069–1089.
21. **Wright WE.** 1987. Periodontium destruction associated with oncology therapy. Five case reports. *J Periodontol* 58:559-63
Bültzingslöwen I, Jontell M. Macrophages, dendritic cells and T lymphocytes in rat buccal mucosa and dental pulp following 5-fluorouracil treatment. *Eur J Oral Sci* 1999; 107:194-201.
22. **Bültzingslöwen I, Jontell M.** 1999. Macrophages, dendritic cells and T lymphocytes in rat buccal mucosa and dental pulp following 5-fluorouracil treatment. *Eur J Oral Sci* 107:194-201.
23. **Tong D, Poot M, Hu D, Oda D.** 2000. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in cultured oral cancer cells. *Oral Oncol* 36:236-41.
24. **Meisenberg B, gollard R, brehm T, mcmillan R, miller W.** 1996. Prophylactic antibiotics eliminate bacteremia and allow safe outpatient management following high-dose chemotherapy and autologous stem cell rescue. *Support Care Cancer* 4:364–369.

25. **Yoshioka H, Fujita K, Maruyama S, Oka R.** 1982. Changes in aerobic pharyngeal flora related to antibiotic use and the emergence of gram-negative bacilli. *Clin Pediatr (Phila)* 21:460–462.
26. **Pinheiro SL, Donegá JM, Seabra LMS, Adabo MD, Lopes T, do Carmo THD, Ribeiro MC, Bertolini PFR.** 2010. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci* 25:87–91
27. **Novaes AB Jr, Schwartz-Filho HO, de Oliveira RR, Feres M, Sato S, Figueiredo LC.** 2012. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers Med Sci* 27:389-95.
28. **Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Mima EG, Machado AL, Bagnato VS, Vergani CE.** 2012. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. Photodynamic disinfection of complete denture. *Lasers Med Sci* 27:161-8.
29. **Calin MA, Parasca SV.** 2009. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers Med Sci.* 24:453-60.
30. **Meisel P, Kocher T.** 2005. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B* 79:159-70. Review.
31. **Konopka K, Goslinski T.** 2007. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 86:694-707.
32. **Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M.** 2003. In vitro killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 47:932-940.

33. **Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, et al.** 2002. Polycationic photosensitizer conjugates: Effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J Antimicrob Chemother* 49:941-951.
34. **Romanos GE, Brink B.** 2010. Photodynamic therapy in periodontal therapy: microbiological observations from a private practice. *Gen Dent* 58:e68-73.
35. **Braham P, Herron C, Street C, Darveau R.** 2009. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol* 80:1790-1798.
36. **Souza SL, Andrade PF, Silva JS, Tristão FS, Rocha FA, Palioto DB, Grisi MF, Taba M Jr, Novaes AB Jr.** 2013. Effects of antimicrobial photodynamic therapy on transforming growth factor- β 1 levels in the gingival crevicular fluid. *Photomed Laser Surg* 31:65-71.
37. **Sigusch BW, Pfitzer A, Albrecht V, Glockman E.** 2005. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol* 76:1100-1105.
38. **Kolbe MF, Ribeiro FV, Luchesi VH, Casarin RC, Sallum EA, Nociti FH Jr, Ambrosano GM, Cirano FR, Pimentel SP, Casati MZ.** 2014. Photodynamic therapy during supportive periodontal care: clinical, microbiologic, immunoinflammatory, and patient-centered performance in a split-mouth randomized clinical trial. *J Periodontol* 85:e277-86.
39. **Oliveira RR, Schwartz-filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr.** 2007. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: A preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 78: 965-973.

40. **De Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba M, Scombatti de Souza SL, Ribeiro FJ.** 2009. Antimicrobial photodynamic therapy in the nonsurgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol* 80:98-105.
41. **Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, Garcia VG.** 2007a. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 78:566-575.
42. **Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG.** 200b. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* 79:2156-2165.
43. **Fernandes LA, Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Martins TM, Okamoto T, Garcia VG.** Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* 36:219-228.
44. **Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casatti CA, Ervolino E, Theodoro LH.** 2013. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol* 84:556-65.
45. **Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Gualberto EC Jr, Santinoni C dos S, Bosco AF, Nagata MJ, Theodoro LH.** 2013. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 28:143-50.
46. **Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, Theodoro LH.** 2014. 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* 49: 584-94.
47. **Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T.** 2002. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers Surg Med* 30:60–66
48. **Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M.** 2007. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent* 18:34-38.
49. **Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GHG, Pontes AEF, Zuza EP, Spolidório DMP, Toledo BEC, Garcia VG.** 2012. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci* 27:687-93.
50. **Moreira AL, Novaes AB Jr, Grisi MF, Taba M Jr, Souza SL, Palioto DB, de Oliveira PG, Casati MZ, Casarin RC, Messoria MR.** 2014. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to nonsurgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol* 21:1-17.
51. **Arweiler NB, Pietruska M, Pietruski J, Skurska A, Dolinska E, Heumann C, Ausschill TM, Sculean A.** 2014. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. *Clin Oral Investig* 18:2129-35.
52. **Franco EJ, Pogue RE, Sakamoto LH, Cavalcante LL, Carvalho DR, de Andrade RV.** 2014. Increased expression of genes after periodontal treatment with photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 11:41-7.

53. **Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, Sculean A.** 2008. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 79:1638-1644.
54. **Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G.** 2009. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* 36: 575-580.
55. **Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A.** 2009. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 24:681-688.
56. **Lulic M, Leiggner Görög I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP.** 2009. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 36:661-666.
57. **Petelin M, Perkič K, Seme K, Gašpirc B.** 2014. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci* doi 10.1007/s10103-014-1632-2.
58. **Medeiros CACX, Leitão RFC, MACedo RN, Barbosa DRMM, Gomes AS, Nogueira NAP, Alencar NMN, Ribeiro RA, Brito GAC.** 2010. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol* 67:1085-1100.
59. **Lopes NN, Plapler H, Lalla RV, Chavantes MC, Yoshimura EM, da Silva MA, Alves MT.** 2010. Effects of low-level laser therapy on collagen expression

- and neutrophil infiltrate in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Lasers Surg Med* 42:546-52.
60. **Guimarães MR, Coimbra LS, de Aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr.** 2011. Potent antiinflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res* 46:269-79.
61. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F.** 1985. Enzymatic amplification of β - globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle and anemia. *Biotechnology* 24:476-480.
62. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffelsw.** 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
63. **Doyle JJT, Doyle JL.** 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-18.
64. **Xian CJ, Cool JC, Scherer MA, Fan C, Foster BK.** 2008. Folinic acid attenuates methotrexate chemotherapy-induced damages on bone growth mechanisms and pools of bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 214:777-85.
65. **Xian CJ, Cool JC, Scherer MA, Macsai CE, Fan C, Covino M, Foster BK.** 2007. Cellular mechanisms for methotrexate chemotherapy-induced bone growth defects. *Bone* 41: 842–850.
66. **Xian CJ, Cool JC, van Gangelen J, Foster BK, Howarth GS.** 2007. Effects of etoposide and cyclophosphamide acute chemotherapy on growth plate and metaphyseal bone in rats. *Cancer Biol Ther* 6 :170–177.
67. **King DE, Jiang H, Simkin GO, Obochi MO, Levy JG, Hunt DW.** 1999. Photodynamic alteration of

- the surface receptor expression pattern of murine splenic dendritic cells. *Scand J Immunol* 49:184-92.
68. **Hunt DW, Levy JG.** 1998. Immunomodulatory aspects of photodynamic therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 7:57-64.
69. **Séguier S, Souza SL, Sverzut AC, Simioni AR, Primo FL, Bodineau A, Corrêa VM, Coulomb B, Tedesco AC.** 2010. Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. *J Photochem Photobiol B* 101:348-54.
70. **Braham P, Herron C, Street C, Darveau R.** 2009. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol* 80:1790-8.
71. **Carvalho AS, Napimoga MH, Coelho-Campos J, Silva-Filho VJ, Thedei G.** 2011. Photodynamic therapy reduces bone resorption and decreased inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *Photomed Laser Surg* 29:735-40.
72. **Lião CH, Fei W, Shen ZH, Yin MP, Lu C.** 2014. Expression and distribution of TNF- α and PGE2 of periodontal tissues in rat periodontitis model. *Asian Pac J Trop Med* 7:412-6. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60067-5.
73. **Yang N, Wang CY.** 2009. Tumor necrosis factor alpha's relationship with periodontitis. *J Chengde Med Collge* 26:198-201.
74. **Pourabbas R, Kashefimehr A, Rahmanpour N, Babaloo Z, Kishen A, Tenenbaum HC, Azarpazhooh A.** 2014. Effects of photodynamic therapy on clinical and gingival crevicular fluid inflammatory biomarkers in chronic periodontitis: a split-mouth randomized clinical trial. *J Periodontol* 85:1222-9.

75. **Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS.** 2008. 5-fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules* 13:1551-69. Review.
76. **Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL.** 2000. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANKL ligand. *J Clin Invest* 106:1481-8.
77. **Santos VR, Lima JA, Gonçalves TE, Bastos MF, Figueiredo LC, Shibli JA, Duarte PM.** 2010. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in sites of chronic periodontitis of subjects with poorly and well-controlled type 2 diabetes. *J Periodontol* 81:1455-65.
78. **Buduneli N, Biyikoğlu B, Sherrabeh S, Lappin DF.** 2008. Saliva concentrations of RANKL and osteoprotegerin in smoker versus non-smoker chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 35:846-52.
79. **Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF.** 2010. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 55:142-7.
80. **Wahlin YB, Holm AK.** 1988. Changes in the oral microflora in patients with acute leukemia and related disorders during the period of induction therapy. *Oral Surg Oral Med Pathol* 65:411-7.
81. **Von Bültzingslöwen I, Adlerberth I, Wold AE, Dahlén G, Jontell M.** 2003. Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 18:278-84.

82. **Silveira PC, Streck EL, Pinho RA.** 2007. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B* 86:279-82.
83. **Hawkins D, Abrahamse H.** 2006. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 24:705-14.
84. **Sarkar S, Wilson M.** 1993. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 28:204-10.
85. **Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E.** 2004. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 75:1343-9.
86. **Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Graziani F, Gatto R, Monaco A.** 2013. Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 40:514-26.

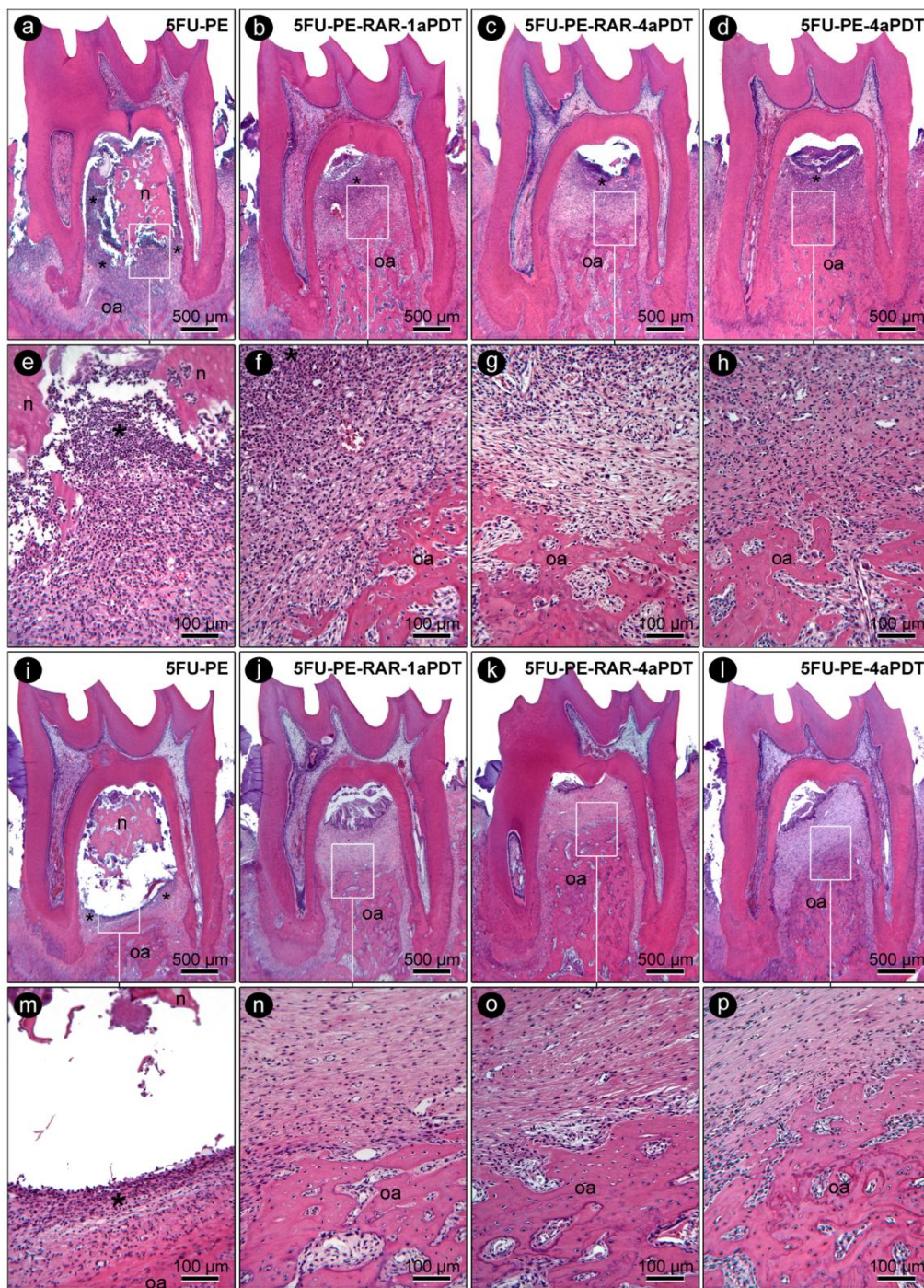


Figura 1: Fotomicrografias do primeiro molar inferior com periodontite experimental evidenciando a magnitude da resposta inflamatória local, o nível de perda óssea alveolar e o processo de reparo periodontal nos grupos nos grupos 5FU-PE (a, e, i, m), 5FU-PE-RAR-1aPDT (b, f, j, n), 5FU-PE-RAR-4aPDT (c, g, k, o) e 5FU-PE-4aPDT (d, h, l, p) aos (a-h) e aos 30 (i-p) dias. Notar que os grupos 5FU-PE-RAR-4aPDT e 5FU-PE-4aPDT apresentam, aos 7 dias, uma menor magnitude na inflamação local (c, d, g, h) e, aos 30 dias, um curso mais favorável no processo de reparação periodontal (k, l, o, p). Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; n, restos de osso necrosado. Aumento original: (a-d) e (i-l): 40x; (e-h) e (m-p): 250x. Barras de escala: (a-d) e (i-l): 500 μ m; (e-h) e (m-p): 100 μ m. Coloração: hematoxilina e eosina (H&E).

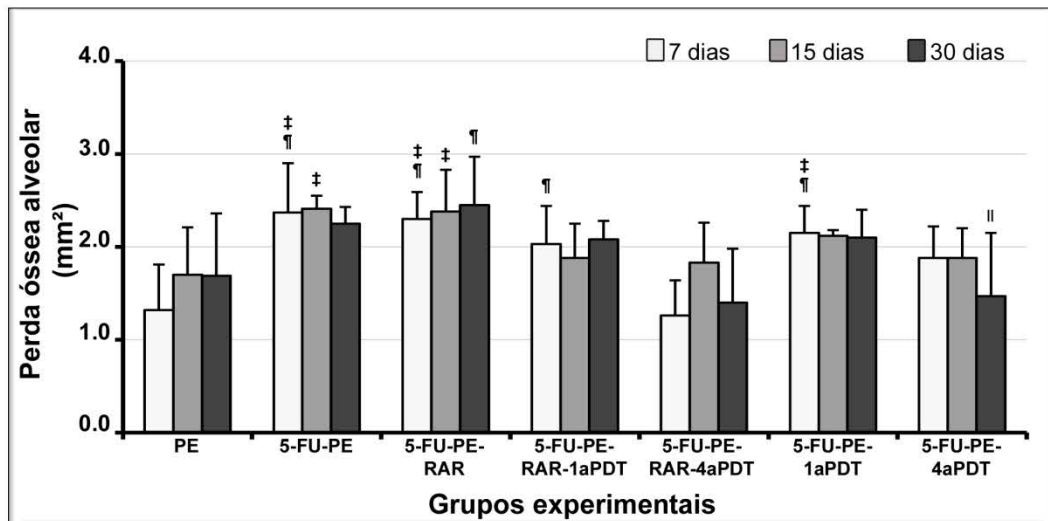


Figura 2: Gráfico mostrando média e desvio-padrão da área de perda óssea alveolar (mm²) na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais e períodos. Abreviações e símbolos: ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PE no mesmo período; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5-FU-PE-RAR-4aPDT no mesmo período; ||, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5-FU-PE-RAR no mesmo período.

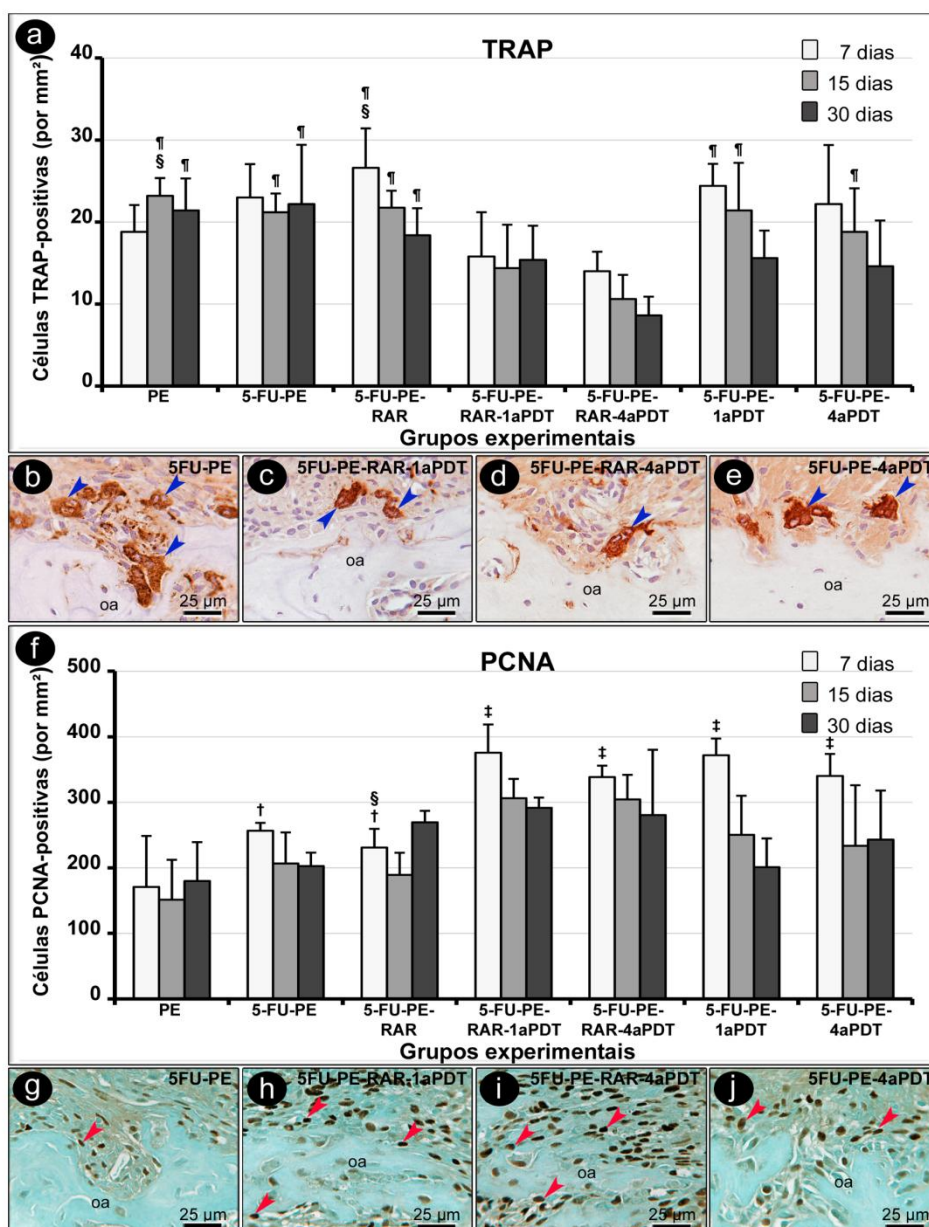


Figura 3: Imunomarcacão para TRAP e PCNA na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a) Gráfico mostrando média e desvio-padrão da quantidade de células TRAP-positivas por mm² nos diferentes grupos experimentais e períodos. (b-e) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para TRAP (setas azuis) nos grupos 5FU-PE (b), 5FU-PE-RAR-1aPDT (c), 5FU-PE-RAR-4aPDT (d) e 5FU-PE-4aPDT (e) aos 7 dias. (f) Gráfico mostrando média e desvio-padrão da quantidade de células PCNA-positivas por mm² nos diferentes grupos experimentais e períodos. (g-j) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcacão para PCNA (setas vermelhas) nos grupos 5FU-PE (g), 5FU-PE-RAR-1aPDT (h), 5FU-PE-RAR-4aPDT (i) e 5FU-PE-4aPDT (j) aos 7 dias. Abreviaoes e símbolos: ao, osso alveolar; ¶, Diferença estatisticamente significativa em relao ao grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT no mesmo período; §, Diferença estatisticamente significativa em relao ao grupo 5FU-PE-RAR-1aPDT no mesmo período; ‡, Diferença estatisticamente significativa em relao ao grupo PE no mesmo período; †, Diferença estatisticamente significativa em relao ao grupo 5FU-PE-1aPDT no mesmo período. Aumento original: (b-e) e (g-j): 1000x. Barras de escala: (b-e) e (g-j): 25 µm. Contra-colorao: (b-e): Hematoxilina de Harris; (g-j): fast green.

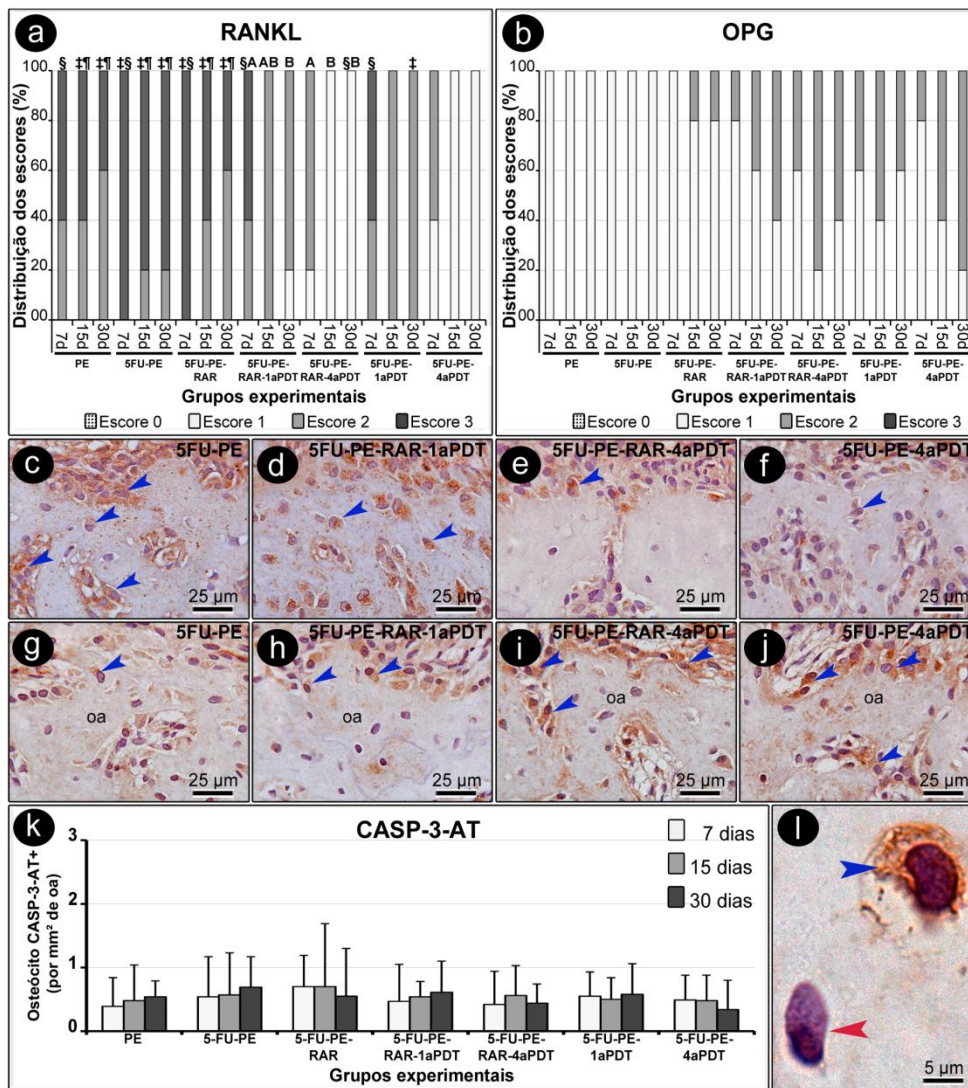


Figura 4: Imunomarcção para RANKL, OPG e CASP-3-AT na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. (a-b) Gráfico mostrando a distribuição dos escores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcção para RANKL (a) e OPG (b). (c-f) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para RANKL (setas azuis) nos grupos 5FU-PE (c), 5FU-PE-RAR-1aPDT (d), 5FU-PE-RAR-4aPDT (e) e 5FU-PE-4aPDT (f) aos 7 dias. (g-j) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OPG (setas azuis) nos grupos 5FU-PE (g), 5FU-PE-RAR-1aPDT (h), 5FU-PE-RAR-4aPDT (i) e 5FU-PE-4aPDT (j) aos 15 dias. (k) Gráfico mostrando média e desvio-padrão da quantidade de osteócitos CASP-3-AT-positivos por mm² de osso alveolar nos diferentes grupos experimentais e períodos. (l) Fotomicrografia evidenciando um osteócito CASP-3-AT-negativo (seta vermelha) e osteócito CASP-3-AT-positivo (seta azul) no osso alveolar. Abreviações e símbolos: oa, osso alveolar; A, diferença estatisticamente significativa entre os períodos em relação aos 7 dias, considerando cada grupo isoladamente; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-4aPDT no mesmo período; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT no mesmo período; ¶, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU-PE-RAR-1aPDT no mesmo período. Aumento original: (c-j): 1000x; (l-m): 5000x. Barras de escala: (c-j): 25 µm; (m-l): 5 µm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

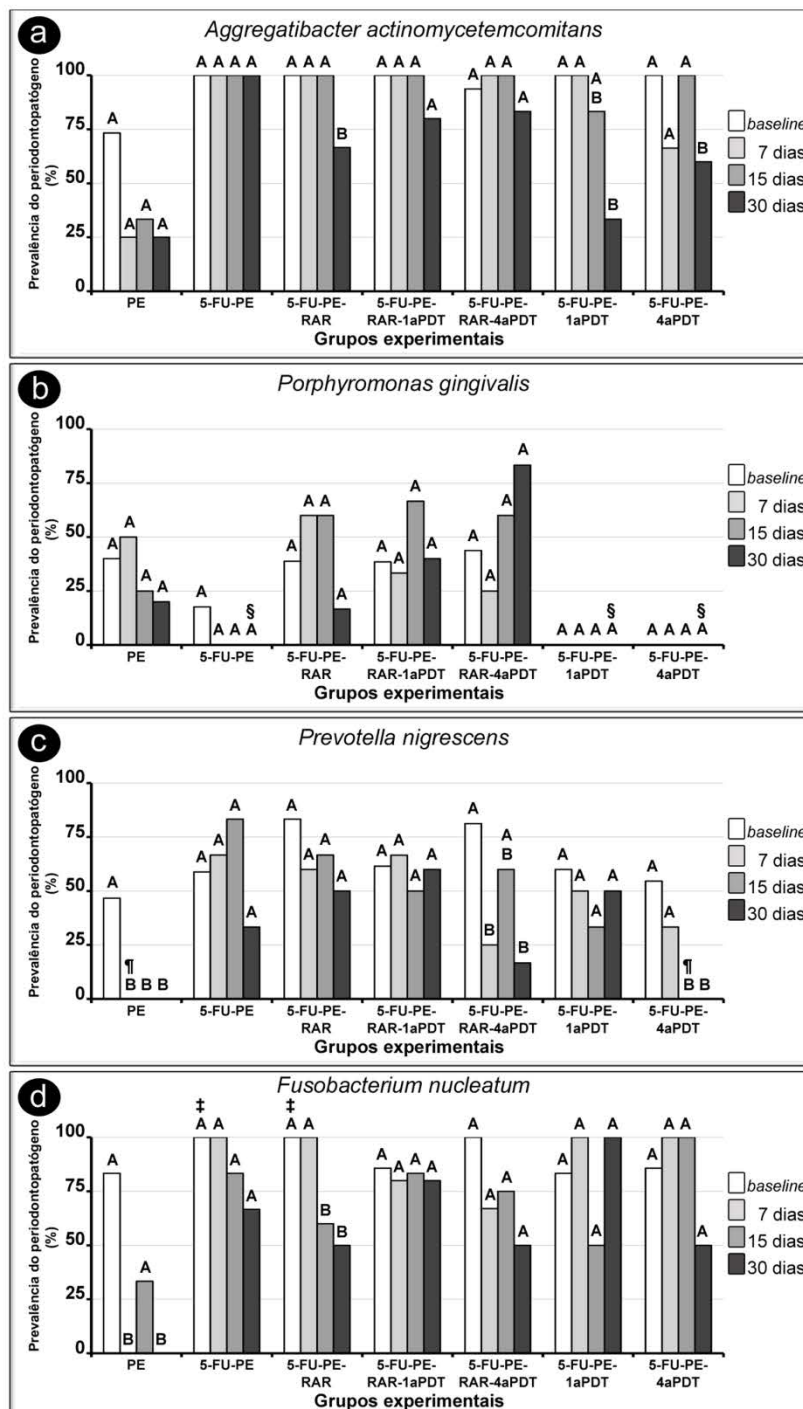


Figura 5. Gráficos evidenciando a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* (a), *P. gingivalis* (b), *P. nigrescens* (c) e *F. nucleatum* (d) nos diferentes grupos experimentais e períodos. Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatisticamente significante entre os períodos, considerando cada grupo isoladamente. Símbolos: §, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo 5FU-PE-RAR-4aPDT no mesmo período. ¶, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo 5FU-PE no mesmo período. ‡, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo PE no mesmo período.

Tabela 1. Média/Mediana (mínimo-máximo) dos valores obtidos para os biomarcadores proinflamatórios (PGE₂, TNF- α e IL-6) nos diferentes grupos experimentais e períodos. Letras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os tempos, considerando cada grupo isoladamente, segundo o teste de Mann Whitney, $p \leq 0,05$. Símbolos mostram diferença estatística entre os grupos experimentais, segundo o teste Mann-Whitney, $p \leq 0,05$: * Não houve diferença estatística entre os grupos considerando cada tempo isoladamente, segundo o teste de Mann Whitney, $p > 0,05$.

		7d	15d	30d
PGE ₂	PE	1063,92/1063,92 ^{A*} (0,84-2127,00)	2291,46/2291,46 ^A (0,93-4582,00)	2798,00/2798,00 ^A (2712,00-2884,00)
	5FU-PE	1787,00/1930,00 ^A (1468,00-1963,00)	1758,66/1256,00 ^A (1078,00-2942,00)	1904,00/1563,00 ^A (1103,00-3046,00)
	5FU-PE-RAR	2367,66/1618,00 ^A (1379,00-4106,00)	767,32/1030,00 ^A (0,98-1271,00)	1188,33/1180,00 ^A (1083,00-1302,00)
	5FU-PE-RAR-1aPDT	7457,00/7381,00 ^A (3464,00-11526,00)	1532,66/1120,00 ^B (1112,00-2366,00)	4079,00/4079,00 ^{A,B} (1420,00-6738,00)
	5FU-PE-RAR-4aPDT	2752,00/2934,00 ^A (1692,00-3630,00)	2441,66/2192,00 ^{A,B} (1626,00-3507,00)	1501,00/1471,00 ^B (1385,00-1647,00)
	5FU-PE-1aPDT	2544,00/2454,00 ^A (2342,00-2836,00)	1998,66/1371,00 ^A (1326,00-3299,00)	4810,00/5281,00 ^A (1833,00-7316,00)
	5FU-PE-4aPDT	7746,66/4995,00 ^A (3183,00-15062,00)	3109,33/2225,00 ^A (2181,00-4922,00)	3508,00/3596,00 ^A (3309,00-3619,00)
	TNF- α	PE	4,90/4,90 ^A (4,24-5,57)	2,30/2,30 ^A (2,04-2,57)
5FU-PE		7,75/8,36 ^A (3,49-11,41)	5,74/3,31 ^{A,B} (1,21-12,72)	1,76/2,04 ^B (1,21-2,04)
5FU-PE-RAR		14,11/11,77 ^A (7,62-22,94)	8,18/8,91 ^A (3,87-11,77)	4,50/1,69 ^A (0,76-11,06)
5FU-PE-RAR-1aPDT		35,41/44,41 ^A (7,72-54,10)	2,40/2,04 ^B (1,86-3,31)	1,94/1,94 ^B (0,76-3,12)
5FU-PE-RAR-4aPDT		19,80/23,31 ^A (3,68-32,41)	15,82/18,09 ^A (9,73-19,66)	3,37/2,75 ^B (2,57-4,81)
5FU-PE-1aPDT		26,27/28,98 ^A (13,32-36,52)	6,36/2,39 ^{A,B} (1,21-15,50)	2,41/2,39 ^B (1,36-3,49)
5FU-PE-4aPDT		22,48/10,17 ^A (4,24-53,05)	4,06/2,04 ^{A,B} (1,05-9,09)	1,96/2,04 ^B (0,90-2,94)
IL-6		PE	983,50/983,50 ^A (893,00-1074,00)	10,56/10,56 ^A (10,56-10,56)
	5FU-PE	653,12/132,00 ^A (64,36-1763,00)	259,45/64,36 ^A (5,99-708,00)	5,99/5,99 ^A (5,99-5,99)
	5FU-PE-RAR	4584,00/3963,00 ^A (3391,00-6398,00)	1428,95/1388,00 ^A (85,85-2813,00)	39,99/5,99 ^A (5,99-108,00)
	5FU-PE-RAR-1aPDT	3247,33/3680,00 ^A (1074,00-4988,00)	68,75/44,26 ^B (5,99-156,00)	615,99/615,99 ^{A,B} (5,99-1226,00)
	5FU-PE-RAR-4aPDT	1228,00/1301,00 ^A (958,00-1425,00)	2506,33/1798,00 ^A (997,00-4724,00)	25,43/26,04 ^B (5,99-44,26)
	5FU-PE-1aPDT	3142,66/2291,00 ^A (840,00-6297,00)	993,66/441,00 ^{A,B} (5,99-2534,00)	5,99/5,99 ^B (5,99-5,99)
	5FU-PE-4aPDT	858,28/655,00 ^A (85,85-1834,00)	231,32/5,99 ^{A,B} (5,99-682,00)	5,99/5,99 ^B (5,99-5,99)

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



Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação de diferentes protocolos de aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento da periodontite induzida em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e imunológico" sob responsabilidade da Pesquisadora LETÍCIA HELENA THEODORO e colaboração de Valdir Gouveia Garcia and Mariéllen Longo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 00800-2012.

CERTIFICATE

We certify that the research "Evaluation of different protocols of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of the induced periodontitis in rats treated with chemotherapy: a histomorphometric, immunohistochemical and immunologic study", process number 00800-2012, under responsibility of LETÍCIA HELENA THEODORO and with collaboration of Valdir Gouveia Garcia and Mariéllen Longo agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. Edilson Ervolino
CEUA Vice-Coordenador

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária - Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabianocadioli@fmva.unesp.br

Mariéllen Longo

Anexo B - Normas para Publicação do Periódico Journal of Supportive Care in Cancer

Instructions for Authors

• Original Articles – body text is limited to 3500 words. There may be 45 references and no more than six figures/tables.

Review Articles – generally solicited by the editors but unsolicited proposals containing an abstract and outline can be sent to the editors for consideration. The word limit for Review Articles is up to 4,000 words for body text (excludes figures, charts, references, abstract).

Letter to the Editor – SCC occasionally accepts letters to the editor pertaining to articles published in the Journal. These should not exceed 1000 words body text and will be passed to the authors of the article to which the comment applies to solicit a response. There may be up to 10 references.

Commentary – articles should be on innovative areas or opportunities for further research. The body text is limited to 1,000 words. There may be up to 20 references, and one figure or chart.

Review procedure

All manuscripts undergo strict peer review. Manuscripts are initially considered by the Editor-in-Chief. Any manuscript that does not meet the general certain criteria of the journal, e.g.

- relevance to the aims of the journal with the topic being of overall general interest
- sufficiently original and contributing to the advancement of the field,
- clearly written with appropriate study methods, well-supported data and conclusions which are supported by the data

will be returned to the author without review.

All other submitted manuscripts are assigned to an Associate Editor who will manage the external peer review process and editorial decision. The Journal encourages authors to recommend individuals who could be considered as reviewers, providing the editorial office with full names and contact details. Authors are also given the opportunity to request the exclusion of a specific reviewer. In this case, authors should provide justification for their request.

Each manuscript is reviewed by a minimum of two expert referees who will provide unbiased, critical and independent assessment of the submission. The (corresponding) author is notified by email of the editorial decision, which will include any applicable criticisms and comments from the reviewers and managing editor. The decision to accept with/without revision or otherwise, will be made by the Editor-in-Chief based on the critical assessments of the experts.

Manuscripts which are returned to the authors for minor or major modifications should be resubmitted online within one or three months, respectively; otherwise, they will be considered withdrawn. Normally, revised manuscripts are reassessed by the same reviewers to determine if the authors have satisfactorily addressed their criticisms and comments. Depending upon this evaluation, the manuscript may be accepted or rejected. Any questions or concerns regarding the editorial decision on a manuscript must be submitted directly to the editorial office within 3 months.

Confidentiality

All manuscripts are treated by the assigned reviewers as privileged and confidential information. Reviewers may request advice from another party, subject to the general principles of confidentiality and permission of the managing editor. Reviewers' comments are not published or made available publicly except with the prior written permission of the reviewer, author and editor. However, reviewers'

comments are shared with the other reviewers of the same paper, and reviewers will be notified of the editor's decision. The reviewers' identity remains anonymous. All reviewers are asked to disclose any potential conflict that could influence their opinions of manuscripts, prior to review of manuscript.

Manuscript preparation

We urge authors to follow the guidelines for authors to speed up the review and publication process.

All manuscripts are subject to copyediting upon acceptance, however, authors are asked to ensure that manuscripts from non-native English language speakers should have the language and grammar checked by a native speaker or a professional agency. Poorly written articles cannot be reviewed and will be returned to the authors.

- Authorship Criteria and Contributions

All listed authors should have seen and approved the final version of the manuscript.

All authors of accepted articles must sign an authorship form affirming that they have met all three of the following criteria for authorship, thereby accepting public responsibility for appropriate portions of the content:

1. substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
2. drafting the article or revising it critically for important intellectual content;
3. approval of the version to be published and all subsequent versions.

If authorship is attributed to a group (such as for multi-center trials), the group must designate one or more individuals as authors or members of a writing group who meet full authorship criteria and who accepts direct responsibility for the manuscript.

Other group members who are not authors should be listed in the Acknowledgment section of the manuscript as participating investigators.

Individuals who do not meet the criteria for authorship but who have made substantial, direct contributions to the work (e.g., purely technical help, writing assistance, general or financial or material support) should be acknowledged in the

Acknowledgments section of the manuscript, with a brief description of their contributions. Authors should obtain written permission from anyone they wish to list in the Acknowledgments section.

- Redundant, Duplicate or Fraudulent Publication

Authors must not simultaneously submit their manuscripts to another publication if that manuscript is under consideration by Supportive Care in Cancer.

Redundant or duplicate publication is a paper that overlaps substantially with one already published in print or electronic media. At the time of manuscript submission, authors must inform the editor about all submissions and previous publications that might be regarded as redundant or duplicate publication of the same or very similar work. Any such publication must be referred to and referenced in the new paper.

Copies of such material should be included with the submitted paper as a supplemental file.

Authors must not:

- Willfully and knowingly submit false data
- Submit data from source not the authors' own
- Submit previously published material (with the exception of abstracts) without correct and proper citation
- Omit reference to the works of other investigators which established a priority
- Falsely certify that the submitted work is original
- Use material previously published elsewhere without prior written approval of the copyright holder

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Structured Abstract

Authors are asked to state the relevance of their manuscript to inform research, policies and/or programs.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- **Journal article**
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
 - Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
 - Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
 - Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
 - Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California
- Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see
- [ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)
If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)
Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

- [Edanz English editing for scientists](#)

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

- [Edanz English editing for scientists](#)

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

- [理文编辑](#)

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

- [エダンズグループジャパン](#)

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

- Edanz Editing Global

Anexo C - Normas para Publicação do Periódico

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Instructions to Authors

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC) is an interdisciplinary journal devoted to the dissemination of knowledge relating to all aspects of antimicrobial and antiparasitic agents and chemotherapy. Within the circumscriptions set forth below, any report involving studies of or with antimicrobial, antiviral (including antiretroviral), antifungal, or antiparasitic agents as these relate to human disease is within the purview of AAC. Studies involving animal models, pharmacological characterization, and clinical trials are appropriate for consideration.

ASM publishes a number of different journals covering various aspects of the field of microbiology. Each journal has a prescribed scope that must be considered in determining the most appropriate journal for each manuscript. The following guidelines may be of assistance.

(i) Papers which describe the use of antimicrobial agents as tools for elucidating the basic biological processes of bacteria are considered more appropriate for the *Journal of Bacteriology*.

(ii) Manuscripts that (a) describe the use of antimicrobial or antiparasitic agents as tools in the isolation, identification, or epidemiology of microorganisms associated with disease; (b) are concerned with quality control procedures for diffusion, elution, or dilution tests for determining susceptibilities to antimicrobial agents in clinical laboratories; and (c) deal with applications of commercially prepared tests or kits to assays performed in clinical laboratories to measure the activities of established antimicrobial agents or their concentrations in body fluids are considered more appropriate for the *Journal of Clinical Microbiology*. Manuscripts concerned with the development or modification of assay methods (e.g., plasma antimicrobial concentrations and high-throughput screening techniques, etc.) and validation of their sensitivity and specificity with a sufficiently large number of determinations or compounds are considered appropriate for AAC.

(iii) Manuscripts describing new or novel methods or improvements in media and culture conditions will not be considered for publication in AAC unless these methods are applied to the study of problems related to the production or activity of antimicrobial agents. Such manuscripts are more appropriate for *Applied and Environmental Microbiology* or the *Journal of Clinical Microbiology*.

(iv) Manuscripts dealing with properties of unpurified natural products, with entities that are primarily antitumor agents, or with immunomodulatory agents that are not antimicrobial agents are not appropriate for AAC.

(v) Manuscripts dealing with novel small molecular antimicrobials must provide at least some data showing that the proposed new agents or scaffolds have the potential to become therapeutic agents. Appropriate demonstrations will vary but generally should be some combination of data on physical properties (solubility, protein binding, $\log P$ [logarithm of the ratio of the concentrations of un-ionized solute in solvents]), pharmacological properties (Caco2 predictions of bioavailability, pharmacokinetics in an animal species), or tolerability (mammalian cell toxicity, likelihood of hepatic metabolism, potential for receptor interactions, potential for human ERG liability). Initial presentations of compounds are not expected to address all these areas but rather to show an appropriate initial subset. For example, the first publication of a novel compound or compound series might address selected physical properties plus

mammalian cell toxicity. Subsequent publications are expected to add progressively to the proof of the agent's therapeutic potential.

(vi) Biochemical analyses for β -lactamases that determine kinetic parameters (e.g., K_m , k_{cat}) must be performed on purified enzyme preparations. The enzyme must be in its native form, without any leader sequences or fusions used for purification (e.g., His tag). The determination of relative rates of hydrolysis may be performed on crude extracts.

(vii) Authors of papers describing enzymological studies should review the standards of the [STRENDA Commission](#) for information required for adequate description of experimental conditions and for reporting enzyme activity data.

(viii) A manuscript limited to the nucleic acid sequence of a gene encoding an antibiotic target, receptor, or resistance mechanism may be submitted as a Short-Form paper (see "[Short-Form Papers](#)") or a New-Data Letter to the Editor (see "[Letters to the Editor](#)"), depending on its length. Formatting instructions for nucleic acid sequences are given below (see "[Presentation of Nucleic Acid Sequences](#)"). Repetition of sequences already in a database should be avoided.

Questions about these guidelines may be directed to the editor in chief of the journal being considered.

If transfer to another ASM journal is recommended by an editor, the corresponding author will be contacted.

Note that a manuscript rejected by one ASM journal on scientific grounds or on the basis of its general suitability for publication is considered rejected by all other ASM journals.

ORGANIZATION AND FORMAT

Editorial Style

The editorial style of ASM journals conforms to the *ASM Style Manual for Journals* (American Society for Microbiology, 2015, in-house document) and *How To Write and Publish a Scientific Paper*, 7th ed. (Greenwood, Santa Barbara, CA, 2011), as interpreted and modified by the editors and the ASM Journals Department.

The editors and the Journals Department reserve the privilege of editing manuscripts to conform with the stylistic conventions set forth in the aforesaid publications and in these Instructions.

On receipt at ASM, an accepted manuscript undergoes an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type. To optimize this process, manuscripts must be supplied in the correct format and with the appropriate sections and headings.

Type every portion of the manuscript double-spaced (a minimum of 6 mm between lines), including figure legends, table footnotes, and references, and number all pages in sequence, including the abstract, figure legends, and tables. Place the last two items after the References section. Manuscript pages must have continuous line numbers; manuscripts without line numbers may be editorially rejected by the editor, with a suggestion of resubmission after line numbers are added. The font size should be no smaller than 12 points. It is recommended that the following sets of characters be easily distinguishable in the manuscript: the numeral zero (0) and the letter "oh" (O); the numeral one (1), the letter "el" (l), and the letter "eye" (I); and a multiplication sign (\times) and the letter "ex." (x). Do not create symbols as graphics or use special fonts that are external to your word processing program; use the "insert symbol" function. Set the page size to 8.5 by 11 inches (ca. 21.6 by 28 cm). Italicize any words that should appear in italics, and indicate paragraph lead-ins in boldface type.

Manuscripts may be editorially rejected, without review, on the basis of poor English or lack of conformity to the standards set forth in these Instructions.

Authors who are unsure of proper English usage should have their manuscripts checked by someone proficient in the English language or engage a professional language editing service for help.

Manuscript Submission Checklist

- Double-space all text, including references and figure legends.
- Number pages.
- Number lines continuously.
- Present statistical treatment of data where appropriate.
- Format references in ASM style.
- Provide accession numbers for all newly published sequences in a dedicated paragraph, and if a sequence or sequence alignment important for evaluation of the manuscript is not yet available, provide the information as supplemental material not for publication or make the material available on a website for access by the editor and reviewers.
- Confirm that genetic and chemical nomenclature conforms to instructions.
- Include as supplemental material not for publication in-press and submitted manuscripts that are important for judgment of the present manuscript.

Full-Length Papers

Full-length papers should include the elements described in this section.

Title, running title, byline, affiliation line, and corresponding author. Each manuscript should present the results of an independent, cohesive study; thus, numbered series titles are not permitted. Exercise care in composing a title. Avoid the main title/subtitle arrangement, complete sentences, and unnecessary articles. On the title page, include the title, the running title (not to exceed 54 characters and spaces), the name of each author, all authors' affiliations at the time the work was performed, the name(s) and e-mail address(es) of the corresponding author(s), and a footnote indicating the present address of any author no longer at the institution where the work was performed. Place a number sign (#) in the byline after the name of the author to whom inquiries regarding the paper should be directed (see "**Correspondent footnote**" below). **Please review this sample title page for guidance.**

Study group in byline. A study group, surveillance team, working group, consortium, or the like (e.g., the Active Bacterial Core Surveillance Team) may be listed as a coauthor in the byline if its contributing members satisfy the requirements for authorship and accountability as described in these Instructions. The names (and institutional affiliations if desired) of the contributing members may be given as a separate paragraph in Acknowledgments.

If the contributing members of the group associated with the work do not fulfill the criteria of substantial contribution to and responsibility for the paper, the group may not be listed in the author byline. Instead, it and the names of its contributing members may be listed in the Acknowledgments section.

Correspondent footnote. The e-mail address for the corresponding author should be included on the title page of the manuscript. This information will be published in the article as a footnote to facilitate communication and will be used to notify the corresponding author of the availability of proofs and, later, of the PDF file of the published article. No more than two authors may be designated corresponding authors.

Abstract. Limit the abstract to 250 words or fewer and concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. Avoid abbreviations and references, and do not include diagrams. When it is essential to include a reference, use the format shown under "References" below (see the "**Citations in abstracts**" section). Conclude the abstract with a summary statement. Because the abstract will be published separately by abstracting services, it must be complete and understandable without reference to the text.

Introduction. The introduction should supply sufficient background information to allow the reader to understand and evaluate the results of the present study without referring to previous publications on the topic. The introduction should also provide the hypothesis that was addressed or the rationale for the study. References should be chosen carefully to provide the most salient background rather than an exhaustive review of the topic.

Materials and Methods. The Materials and Methods section should include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. When centrifugation conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: make of centrifuge, model of rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force ($\times g$ rather than revolutions per minute). For commonly used materials and methods (e.g., media and protein concentration determinations), a simple reference is sufficient. If several alternative methods are commonly used, it is helpful to identify the method briefly as well as to cite the reference. For example, it is preferable to state “cells were broken by ultrasonic treatment as previously described (9)” rather than “cells were broken as previously described (9).” This allows the reader to assess the method without constant reference to previous publications. Describe new methods completely, and give sources of unusual chemicals, equipment, or microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, include tables identifying the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, and plasmids, etc.

A method or strain, etc., used in only one of several experiments reported in the paper may be described in the Results section or very briefly (one or two sentences) in a table footnote or figure legend. It is expected that the sources from whom the strains were obtained will be identified.

Results. In the Results section, include the rationale or design of the experiments as well as the results; reserve extensive interpretation of the results for the Discussion section. Present the results as concisely as possible in one of the following: text, table(s), or figure(s). Avoid extensive use of graphs to present data that might be more concisely or more quantitatively presented in the text or tables. Limit photographs (particularly photomicrographs and electron micrographs) to those that are absolutely necessary to show the experimental findings. Number figures and tables in the order in which they are cited in the text, and be sure that all figures and tables are cited.

Discussion. The Discussion should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand and should not contain extensive repetition of the Results section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Acknowledgments. The source of any financial support received for the work being published must be indicated in the Acknowledgments section. (It will be assumed that the absence of such an acknowledgment is a statement by the authors that no support was received.) The usual format is as follows: “This work was supported by Public Health Service grant CA-01234 from the National Cancer Institute.”

Recognition of personal assistance should be given as a separate paragraph, as should any statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the paper or of a product mentioned therein.

Appendixes. Appendixes that contain additional material to aid the reader are permitted. Titles, authors, and reference sections that are distinct from those of the primary article are not allowed. If it is not feasible to list the author(s) of the appendix in the byline or the Acknowledgments section of the primary article, rewrite the appendix so that it can be considered for publication as an independent article, either full-length or Short-Form style. Equations, tables, and figures should be labeled with the letter "A" preceding the numeral to distinguish them from those cited in the main body of the text.

References

In the reference list, references are numbered in the order in which they are cited in the article (citation-sequence reference system); ASM no longer uses the citation-name system with an alphabetized reference list. In the text, references are cited parenthetically by number in sequential order. Data that are not published or not peer reviewed are simply cited parenthetically in the text (see section ii below).

(i) References listed in the References section. The following types of references must be listed in the References section:

- Journal articles (both print and online)
- Books (both print and online)
- Book chapters (book title is required)
- Patents
- Theses and dissertations
- Published conference proceedings
- Meeting abstracts (from published abstract books or journal supplements)
- Letters (to the editor)
- Company publications
- In-press journal articles, books, and book chapters (publication title is required)

Provide the names of all the authors and/or editors for each reference; names should not be abbreviated with “et al.” Since title and byline information that is downloaded from PubMed does not always show accents, italics, or special characters, authors should refer to the PDF files or hard-copy versions of the articles and incorporate the necessary corrections in the submitted manuscript. Abbreviate journal names according to the **PubMed Journals Database** (National Library of Medicine, National Institutes of Health), the primary source for ASM style (do not use periods with abbreviated words). The EndNote output style for ASM Journals’ current reference style can be found [here](#); click “Open” and then “Download and Install” to save it to your EndNote Styles folder (it should replace any earlier output styles for ASM journals [all ASM journals use the same reference style]).

Follow the styles shown in the examples below for print references.

1. **Caserta E, Haemig HAH, Manias DA, Tomsic J, Grundy FJ, Henkin TM, Dunny GM.** 2012. *In vivo* and *in vitro* analyses of regulation of the pheromone-responsive *prgQ* promoter by the PrgX pheromone receptor protein. *J Bacteriol* **194**:3386-3394.
2. **Falagas ME, Kasiakou SK.** 2006. Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2274-2275. (Letter.) {"Letter" or "Letter to the editor" is allowed but not required at the end of such an entry.}
3. **Cox CS, Brown BR, Smith JC.** *J Gen Genet*, in press.* {Article title is optional; journal title is mandatory.}
4. **da Costa MS, Nobre MF, Rainey FA.** 2001. Genus I. *Thermus* Brock and Freeze 1969, 295^{Al} emend. Nobre, Trüper and da Costa 1996b, 605, p. 404-414. *In* Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed, vol 1. Springer, New York, NY.
5. **Stratagene.** 2006. *Yeast DNA isolation system: instruction manual*. Stratagene, La Jolla, CA. {Use the company name as the author if none is provided for a company publication.}
6. **Forman MS, Valsamakis A.** 2011. Specimen collection, transport, and processing: virology, p 1276-1288. *In* Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH,

- Funke G, Landry ML, Warnock DW (ed), Manual of clinical microbiology, 10th ed, vol 2. ASM Press, Washington, DC.
7. **Fitzgerald G, Shaw D.** In A. E. Waters (ed), Clinical microbiology, in press. EFH Publishing Co, Boston, MA.* {Chapter title is optional.}
 8. **García CO, Paira S, Burgos R, Molina J, Molina JF, Calvo C, Vega L, Jara LJ, García-Kutzbach A, Cuellar ML, Espinoza LR.** 1996. Detection of *Salmonella* DNA in synovial membrane and synovial fluid from Latin American patients using the polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* **39**(Suppl 9):S185. {Meeting abstract published in journal supplement.}
 9. **Carlson E.** 2013. Selective penicillin-binding protein imaging probes reveal substructure in bacterial cell division, p 59. Final Program 113th Gen Meet Am Soc Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC. {Abstract title is optional.}
 10. **Rotimi VO, Salako NO, Mohaddas EM, Philip LP.** 2005. Abstr 45th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, abstr D-1658. {Abstract title is optional.}
 11. **Green PN, Hood D, Dow CS.** 1984. Taxonomic status of some methylotrophic bacteria, p 251-254. In Crawford RL, Hanson RS (ed), Microbial growth on C₁ compounds. Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, DC.
 12. **O'Malley DR.** 1998. Ph.D. thesis. University of California, Los Angeles, CA. {Title is optional.}
 13. **Odell JC.** April 1970. Process for batch culturing. US patent 484,363,770. {Include the name of the patented item/process if possible; the patent number is mandatory.}
 14. **Elder BL, Sharp SE.** 2003. Cumitech 39, Competency assessment in the clinical laboratory. Coordinating ed, Sharp SE. ASM Press, Washington, DC.

*A reference to an in-press ASM publication should state the control number (e.g., AAC00123-15) if it is a journal article or the name of the publication if it is a book.

Online-only references must provide essentially the same information that print references do. For online journal articles, posting or revision dates may replace the year of publication; a DOI (preferred) or URL is required for articles with nontraditional page numbers or electronic article identifiers.

1. **Bina XR, Taylor DL, Vikram A, Ante VM, Bina JE.** 2013. *Vibrio cholerae* ToxR downregulates virulence factor production in response to cyclo(Phe-Pro). *mBio* **4**(5):e00366-13. doi:10.1128/mBio.00366-13.
2. **Winnick S, Lucas DO, Hartman AL, Toll D.** 2005. How do you improve compliance? *Pediatrics* **115**:e718-e724. doi:10.1542/peds.2004-1133.
3. **Dionne MS, Schneider DS.** 2002. Screening the fruitfly immune system. *Genome Biol* **3**:reviews1010-reviews1010.2. doi:10.1186/gb-2002-3-4-reviews1010.
4. **Giegé R, Springer M.** 2012. Aminoacyl-tRNA synthetases in the bacterial world. *EcoSal Plus* doi:10.1128/ecosalplus.4.2.1.

Note: a posting or accession date is required for any online reference that is periodically updated or changed.

Citations of ASM Accepts manuscripts should look like the following example.

Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP. 15 May 2006. Persistent transactivation by Meis1 replaces Hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of Meis1-Pbx and Hox-Pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Mol Cell Biol* doi:10.1128/MCB.00586-06.

Other journals may use different styles for their publish-ahead-of-print manuscripts, but citation entries must include the following information: author name(s), posting date, title, journal title, and volume and page numbers and/or DOI. The following is an example:

Zhou FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM. 13 February 2001. Polar residues drive association of polyoleucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A* doi:10.1073/pnas.041593698.

(ii) References cited in the text. References that should be cited in the text include

- Unpublished data
- Manuscripts submitted for publication
- Unpublished conference presentations (e.g., a report or poster that has not appeared in published conference proceedings)
- Personal communications
- Patent applications and patents pending
- Computer software, databases, and websites

These references should be made parenthetically in the text as follows:

... similar results (R. B. Layton and C. C. Weathers, unpublished data).

... system was used (J. L. McInerney, A. F. Holden, and P. N. Brighton, submitted for publication).

... as described previously (M. G. Gordon and F. L. Rattner, presented at the Fourth Symposium on Food Microbiology, Overton, IL, 13 to 15 June 1989). {For nonpublished abstracts and posters, etc.}

... this new process (V. R. Smoll, 20 June 1999, Australian Patent Office). {For non-U.S. patent applications, give the date of publication of the application.}

... available in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>).

... using ABC software (version 2.2; Department of Microbiology, State University [<http://www.state.micro.edu>]).

URLs for companies that produce any of the products mentioned in your study or for products being sold may not be included in the article. However, company URLs that permit access to scientific data related to the study or to shareware used in the study are permitted.

(iii) Citations in abstracts. Because the abstract must be able to stand apart from the article, references cited in it should be clear without recourse to the References section. Use an abbreviated form of citation, omitting the article title, as follows.

(P. S. Satheshkumar, A. S. Weisberg, and B. Moss, *J Virol* 87:10700–10709, 2013, doi:10.1128/JVI.01258-13)

(J. H. Coggin, Jr., p. 93–114, in D. O. Fleming and D. L. Hunt, ed., *Biological Safety. Principles and Practices*, 4th ed., 2006)

“. . . in a recent report by D. A. Hopwood [mBio 4(5):e00612-13, 2013, doi:10.1128/mBio00612-13] . . .”

This style should also be used for Addenda in Proof.

(iv) References related to supplemental material. If references must be cited in the supplemental material, list them in a **separate** References section within the supplemental material and cite them by those numbers; do not simply include citations of numbers from the reference list of the associated article. If the same reference(s) is to be cited in both the article itself and the supplemental material, then that reference would be listed in both References sections.

Short-Form Papers

The Short-Form format is intended for the presentation of brief observations that do not warrant full-length papers. Submit Short-Form papers in the same way as full-length papers. They receive the same review, they are not published more rapidly than full-length papers, and they are not considered preliminary communications.

The title, running title (not to exceed 54 characters and spaces), byline, and correspondent footnote should be prepared as for a full-length paper. Each Short-Form paper must have an abstract of no more than 75 words. Do not use section headings in the body of the paper; combine methods, results, and discussion in a single section. Paragraph lead-ins are permissible. The text should be kept to a minimum and if possible should not exceed 1,000 words; the number of figures and tables should also be kept to a minimum. Materials and methods should be described in the text, not in figure legends or table footnotes. Present acknowledgments as in full-length papers. The References section is identical to that of full-length papers.

Minireviews, Commentaries, Author Bios

Minireviews

Minireviews are brief (limit of six printed pages exclusive of references) biographical profiles, historical perspectives, or summaries of developments in fast-moving areas of chemotherapy. They must be based on published articles; they are not outlets for unpublished data. They may address any subject within the scope of AAC. For example, subject matter may range from structure-activity correlates among a group of semisynthetic cephalosporins to the comparative efficacies of new and old drugs in the prevention or treatment of diseases of microbial origin in humans.

Minireviews may be either solicited or proffered by authors responding to a recognized need. Irrespective of origin, Minireviews are subject to review and should be submitted via the eJP online manuscript submission and peer review system. The cover letter should state whether the article was solicited and by whom.

Minireviews must have abstracts. Limit the abstract to 250 words or fewer. The body of the Minireview may have section headings and/or paragraph lead-ins.

Author Bios

At the editor's invitation, corresponding authors of minireviews may submit a short biographical sketch and photo for each author for publication with the article. Biographical information should be submitted at the modification stage.

- The text limit is 150 words for each author and should include WHO you are (your name), WHERE you received your education, WHAT positions you have

- held and at WHICH institutions, WHERE you are now (your current institution), WHY you have this interest, and HOW LONG you have been in this area.
- The photo should be a black-and-white head shot of passport size. Photos will be reduced to approximately 1.125 inches wide by 1.375 inches high. Photos must meet the production criteria for regular figures and should be checked for production quality by using Rapid Inspector, provided at the following URL: <http://rapidinspector.cadmus.com/RapidInspector/zmw/index.jsp>.
 - To submit, upload the text and photos with your modified manuscript in the submission and review system. Include the biographical text after the References section of your manuscript, in the same file. Upload the head shots in the submission system as a "Minireview Bio Photo"; **include the author's name or enough of it for identification in each photo's file name.**

Contact the [scientific editor](#) if you have questions about what to write. Contact the [production editor](#) if you have questions about submitting your files.

Commentaries

Commentaries are invited communications concerning topics relevant to the readership of AAC and are intended to engender discussion. Reviews of the literature, methods and other how-to papers, and responses targeted at a specific published paper are not appropriate. Commentaries are subject to review.

The length may not exceed four printed pages, and the format is like that of a Minireview (see above) except that the abstract is limited to 75 words.

Letters to the Editor

Two types of Letters to the Editor may be submitted. The first type (Comment Letter) is intended for comments on final, typeset articles published in the journal (not on accepted manuscripts posted online) and must cite published references to support the writer's argument. The second type (New-Data Letter) may report new, concise findings that are not appropriate for publication as full-length papers or Short-Form papers.

Letters may be **no more than 500 words long and must be typed double-spaced**. Refer to a recently published Letter for correct formatting. Note that authors and affiliations are listed below the title.

All Letters to the Editor must be submitted electronically, and the type of Letter (New Data or Comment) must be selected from the drop-down list in the submission form. For Letters commenting on published articles, the cover letter should state the volume and issue in which the article was published, the title of the article, and the last name of the first author. In the Abstract section of the submission form, put "Not Applicable." Letters to the Editor do not have abstracts. Both types of Letter must have a title, which must appear on the manuscript and on the submission form. Figures and tables should be kept to a minimum.

If the Letter is related to a published article, it will be sent to the editor who handled the article in question. If the editor believes that publication is warranted, he/she will solicit a reply from the corresponding author of the article and give approval for publication.

New-Data Letters will be assigned to an editor according to subject matter and will be reviewed by that editor and/or a reviewer.

Please note that some indexing/abstracting services do not include Letters to the Editor in their databases.

Errata, Author Corrections, Retractions

Errata

The Erratum section provides a means of correcting errors that occurred during the writing, typing, editing, or publication (e.g., a misspelling, a dropped word or line, or mislabeling in a figure) of a published article. Submit Errata via the eJP online manuscript submission and peer review system (see “Submission, Review, and Publication Processes”). In the Abstract section of the submission form (a required field), put “Not Applicable.” Upload the text of your Erratum as a Microsoft Word file. Please see a recent issue for correct formatting.

Author Corrections

The Author Correction section provides a means of correcting errors of omission (e.g., author names or citations) and errors of a scientific nature that do not alter the overall basic results or conclusions of a published article (e.g., an incorrect unit of measurement or order of magnitude used throughout, contamination of one of numerous cultures, or misidentification of a mutant strain, causing erroneous data for only a [noncritical] portion of the study). Note that the addition of new data is not permitted.

For corrections of a scientific nature or issues involving authorship, including contributions and use or ownership of data and/or materials, all disputing parties must agree, in writing, to publication of the Correction. For omission of an author's name, letters must be signed by the authors of the article and the author whose name was omitted. The editor who handled the article will be consulted if necessary.

Submit an Author Correction via the eJP online manuscript submission and peer review system (see “Submission, Review, and Publication Processes”). Select Author Correction as the manuscript type. In the Abstract section of the submission form (a required field), put “Not Applicable.” Upload the text of your Author Correction as a Microsoft Word file. Please see a recent issue for correct formatting. Signed letters of agreement must be supplied as supplemental material not for publication (scanned PDF files).

Retractions

Retractions are reserved for major errors or breaches of ethics that, for example, may call into question the source of the data or the validity of the results and conclusions of an article. Submit Retractions via the eJP online manuscript submission and peer review system (see “Submission, Review, and Publication Processes”). In the Abstract section of the submission form (a required field), put “Not Applicable.” Upload the text of your Retraction as a Microsoft Word file. Letters of agreement signed by all of the authors must be supplied as supplemental material not for publication (scanned PDF files). The Retraction will be assigned to the editor in chief of the journal, and the editor who handled the paper and the chairperson of the ASM Journals Board will be consulted. If all parties agree to the publication and content of the Retraction, it will be sent to the Journals Department for publication.