



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



LIVIA RODRIGUES PERUSSI VALVERDE

**“Avaliação dos efeitos da terapia
fotodinâmica com hipericina no tratamento
da doença periodontal induzida em ratos.”**

ARARAQUARA

2013



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

LIVIA RODRIGUES PERUSSI VALVERDE

**“Avaliação dos efeitos da terapia
fotodinâmica com hipericina no tratamento
da doença periodontal induzida em ratos”.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

ARARAQUARA

2013

Valverde, Livia Rodrigues Perussi

Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica com hipericina no tratamento da doença periodontal induzida em ratos / Livia Rodrigues Perussi Valverde.-- Araraquara: [s.n.], 2013.

88 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

1. Fotoquimioterapia 2. Periodontite 3. Hypericum
4. Microtomografia por raio-x I. Título

Livia Rodrigues Perussi Valverde

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM
HIPERICINA NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL
INDUZIDA EM RATOS**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador.....Prof^a. Dra. Rosemary Adriana C. Marcantonio

2º examinador.....Prof^a. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli

3º examinador.....Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

4º Examinador.....Prof^a. Dra. Priscila Fernanda de Campos Menezes

5º examinador.....Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito

Araraquara, 08 de maio de 2013.

Dados Curriculares

Livia Rodrigues Perussi Valverde

Nascimento	06 de janeiro de 1983 – São Carlos/SP
Filiação	Sergio Perussi Filho Janice Rodrigues Perussi
2003/2006	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2007 – 2008	Curso de Especialização em Periodontia pela APCD em convênio com a FOAr, UNESP – Araraquara/SP.
2008 – 2010	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2010 – presente	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
Jan – Abril 2011	Estágio no exterior – <i>New York University (NYU), Department of Basic Science and Craniofacial Biology</i> – sob orientação da Prof ^a . Dr ^a . Simone Duarte.

Dedicatória

À minha mãe Janice,

Obrigada, obrigada e obrigada!

Nada disso seria possível sem você!

Lembro de ir ao seu laboratório quando pequena e achar aqueles aparelhos todos uma loucura! Hoje, ter tido a oportunidade de trabalhar com você foi uma experiência única e enriquecedora. Minha admiração por você só aumentou e me fez ver a mulher inteligente, forte, dedicada e guerreira que você é. Seus ensinamentos e incentivo diários tem sido estímulo para que eu continue a trilhar meus próprios passos na vida acadêmica. Você é minha maior referência e meu melhor porto seguro.

Amo muito você!

Agradecimentos especiais

À Deus, por sempre me guiar e me confortar nos momentos mais difíceis, fazendo acreditar que tudo é possível.

Aos meus pais (*Janice e Sergio*), não tenho como agradecer todo amor, incentivo, confiança e conforto que sempre me ofereceram. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, seja na alegria ou na tristeza, na saúde ou na doença! Devo à vocês tudo que sou hoje. Saibam que sempre serão meus maiores exemplos e tenho muito orgulho de ser sua filha! Amo muito vocês!

Ao meu marido (*Guilherme*), agradeço por todo apoio, amor, companheirismo e amizade. Depois de tantos dias de Skype (rs), estou muito feliz de finalmente estarmos juntos, caminhando perante os desafios da vida! Amo você!

Ao meu irmão (*Eduardo*) e à toda minha família, obrigada por estarem sempre ao meu lado torcendo por mim. Em especial à minha **avó Dora**, por sempre me benzer para tirar a *urucubaca*!!!!

Muito obrigada!

À minha querida orientadora Adriana,

O meu muito obrigada.....por tudo!!!

Durante todos estes anos você foi muito mais do que uma orientadora. Foi amiga e mãe. Esteve ao meu lado nas minhas conquistas pessoais e soube me apoiar nos momentos mais difíceis. Depois de tantos anos trabalhando juntas, confesso que vou sentir muita falta da convivência do dia-a-dia. No entanto, acredito que a amizade construída ao longo dos anos permanecerá e isso nos deixará unidas por toda a vida.

Sou eternamente grata pelos seus ensinamentos, mas acima de tudo, sou grata por Deus ter colocado na minha vida uma pessoa a qual eu me sinto honrada de ter convivido por tanto tempo.

Você é muito especial para mim!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em nome da Profa. Dra. Andréia Afonso Barreto Montandon e sua vice-diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato.

Ao atual Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em nome do Prof. Mario Tanomaru Filho (coordenador) e do Prof. Dr. Carlos Rossa Junior (vice-coordenador).

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (2009/17404-1) e auxílio pesquisa (2010/14932-4), sem os quais não seria possível desenvolver este trabalho.

Aos docentes da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, Profa. Daniela Leal Zandim Barcelos, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior e ao Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, agradeço por todo aprendizado, paciência, dedicação e amizade. Devo todo meu conhecimento em periodontia à vocês.

À Profa. Dra. Simone Duarte, da Universidade de Nova York (NYU) - EUA, pela oportunidade de ter desenvolvido parte do projeto de doutorado na instituição. Fica aqui minha eterna gratidão pelos conhecimentos adquiridos em seu laboratório.

À Claudinha (Ana Cláudia Gregolin Costa Miranda), ao Leandro Alves dos Santos e à Luana Sabino, auxiliares do Laboratório de Histologia do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, um agradecimento especial por toda ajuda durante os

procedimentos histológicos. À Luana Sampaio, do laboratório de micro-tomografia computadorizada, pela ajuda com os escaneamentos dos animais. Ao Adriano, responsável pela manutenção do biotério desta faculdade, um agradecimento em reconhecimento aos seus esforços pela boa manutenção do biotério e pela sua atenção e cuidados em relação aos animais ali instalados.

À Regina Lúcia, secretária da disciplina de Periodontia desta faculdade, por toda a atenção e ajuda dispensada.

Aos demais funcionários da disciplina de Periodontia desta faculdade, meu muito obrigada. Agradecimento especial à Zezé, D. Maria e à Isabela.

À todos os funcionários da biblioteca desta faculdade, obrigada pela imensa ajuda na redação e finalização desta tese.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em especial à Mara Candida Munhoz Amaral, por toda paciência, suporte e ajuda durante toda a pós-graduação.

Aos demais funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, obrigada pelo bom funcionamento desta instituição.

À CEPOF, da USP São Carlos, pela confecção do LED (equipamento) utilizado neste trabalho.

Aos amigos brasileiros “adquiridos” na NYU, Myrella Lessio Castro, Juliana Delben e Ramiro Murata, obrigada pelo apoio e ajuda no desenvolvimento do meu projeto no laboratório da Profa. Simone.

Agradecimento especial aos meus alunos e amigos de iniciação científica Bruno Segnini, Sâmara Cruz Tfaile Corbi, Gustavo Amadei e Renata Magnin da Silva pela ajuda na parte experimental e laboratorial desta tese e de trabalhos

paralelos. Gostaria também de agradecer aos amigos de doutorado Rafael Molon e Guilherme de Oliveira, pela ajuda nos procedimentos de micro-CT e estatística. Às grandes amigas Morgana Guimarães e Sabrina Garcia de Aquino, agradeço pela paciência e ajuda durante o desenvolvimento das análises de biologia molecular. A colaboração de vocês foi fundamental e de extrema importância para a conclusão desta tese. Sem vocês, não conseguiria chegar até aqui. Muito obrigada!

Agradeço aos meus colegas de pós-graduação pelos bons momentos vividos, pelas experiências e conhecimentos compartilhados. Em especial um agradecimento às amigas que se tornaram *grandes* amigas durante a pós-graduação: Alliny de Souza Bastos, Ana Lúcia Roselino, Fernanda Regina Godoy Rocha, Leila Santana Coimbra, Marina Montosa Belluci, Morgana Guimarães, Sabrina Garcia de Aquino, Roberta Grasselli Batitucci e Yeon Jung Kim. A convivência com vocês tornou minha vida mais colorida e divertida! Sentirei muita falta deste período que desfrutamos juntas em Araraquara. Apesar dos diferentes caminhos percorridos no futuro por cada uma, tenho certeza de que nos encontraremos pelo mundo afora! Levo no coração a amizade e bons momentos vividos com vocês.

E à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho ou mesmo os me esqueci de citar nomes, meus mais sinceros agradecimentos.

Valverde LRP. Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica com hipericina no tratamento da doença periodontal induzida em ratos [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido proposta como terapia auxiliar no tratamento da periodontite, onde um corante não-tóxico (fotossensibilizador, FS) reage com o oxigênio dos tecidos e que, na presença de luz, é capaz de eliminar ou reduzir os microorganismos presentes nos sítios da doença. A hipericina (HY) é um pigmento fotoativo natural muito potente. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da TFD com HY no tratamento da doença periodontal *in vivo*. Para isso, 84 ratos foram submetidos à indução de periodontite por inserção de ligaduras em torno dos 2^{os} molares superiores. Após 7 dias, as ligaduras foram removidas e os animais foram randomicamente distribuídos em 4 grupos e submetidos aos seguintes procedimentos: Grupo I - Controle, doença sem tratamento; Grupo II - RAR, raspagem e alisamento radicular manual com curetas periodontais; Grupo III - TFD, emprego de HY (10µg/ml) por 5 minutos na bolsa periodontal seguido de irradiação com LED 630nm por 4 minutos/dente (35,15J/cm²); Grupo IV- RAR+TFD, associação dos tratamentos dos grupos II e III. Sete, 15 e 30 dias após os procedimentos, os animais foram sacrificados. Avaliação tridimensional por microCT e análise histométrica revelou diferenças significativas entre o grupo controle e os demais grupos aos 7 e 15 dias pós-tratamento. Análise

imunohistoquímica por TRAP e RANKL apresentou marcação semelhante nos grupos I, III e IV. Dentre os limites deste estudo, podemos concluir que a TFD com hipericina foi capaz de reduzir a progressão da periodontite induzida *in vivo* de modo similar ao tratamento mecânico.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia, Periodontite, Hypericum, Microtomografia por raio-x

Valverde LRP. Effects of photodynamic therapy with hypericin in the treatment of periodontal diseases in rats [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) has been proposed as an auxiliary therapy on the treatment of periodontitis. This technique uses a non-toxic dye (photosensitizer, PS) that reacts with oxygen of the tissues in the presence of light, and is able to eliminate or reduce microorganisms on the sites of the disease. Hypericin (HY) is a very potent photoactive natural pigment. The aim of this study was evaluate the effects of HY-PDT in the treatment of periodontal disease induced in vivo. Thus, 84 rats were submitted to periodontitis induction by placing ligatures around superior 2nd molars. After 7 days, ligatures were removed and animals were randomly distributed in 4 groups and submitted to the following procedures: Group I – Control, disease without treatment; Group II – SRP, scaling and root planning with manual periodontal cures; Group III – PDT, application of HY (10µg/ml) for 5 minutes in the periodontal pocket followed by 4 minutes of 630 nm irradiation per tooth (35,15J/cm²); Group IV - SRP+PDT, association of the treatments of groups II and III. Seven, 15 and 30 days post-treatment the animals were sacrificed. MicroCT tridimensional evaluation and histometric analysis showed statistical differences between Control and treatments groups at 7 and 15-days post-

treatment. TRAP and RANKL immunohistochemistry analysis showed similar marking on groups I, III and IV. Therefore, HY-PDT was able to reduce periodontitis progression in vivo in a similar way to mechanical treatment.

Keywords: Photochemotherapy, Periodontitis, Hypericum, X-ray microtomography

LISTA DE ABREVIATURAS

HE – *hematoxilin and eosin* ou hematoxilina e eosina

HY – *hypericin* ou hipericina

LED – *light emitting diode* ou luz emissora de diodo

MB – *methylene blue* ou azul de metileno

microCT – *computerized microtomography* ou micro-tomografia
computadorizada

OPG – *osteoprotegerin* ou osteoprotegerina

PDT – *photodynamic therapy*

RAR – raspagem e alisamento radicular

RANK – *receptor activator of nuclear factor kappa B*

RANKL – *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*

SRP – *scaling and root planing*

TBO – *toluidine blue O* ou azul de toulidina O

TFD – terapia fotodinâmica

TRAP – *tartarate resistente alkaline phosphatase*

SUMÁRIO

1 Introdução.....	18
2 Proposição.....	31
3 Capítulos.....	32
3.1 Capítulo 1.....	33
3.2 Capítulo 2.....	42
4 Conclusão.....	69
5 Referências.....	71
6 Apêndices.....	75
Apêndice 1 Material e método.....	76
7 Anexos.....	84
Anexo A Aprovação do Comitê de Ética.....	85
Anexo B Documentos comprobatórios.....	86
Anexo B.1 - Comprovante do <i>Expert Review of Anti-Infective Therapy</i>	86

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Doença periodontal

A doença periodontal é uma desordem inflamatória à diversos microrganismos do biofilme oral os quais se acumulam sobre as superfícies supra e subgengival dos dentes¹. Atualmente a periodontite afeta 10-15% da população mundial, sendo a maior causa de perdas dentárias em países desenvolvidos⁷. A periodontite é uma doença inflamatória multifatorial cujo fator etiológico primário são as bactérias do biofilme oral sendo este considerado um dos biofilmes mais complexos encontrados na natureza⁵⁸.

Diversas bactérias periodontopatogênicas encontradas no biofilme oral são responsáveis pela indução e manutenção da doença periodontal³. A periodontite é uma doença sítio-específica, clinicamente caracterizada por inflamação, sangramento à sondagem e pronunciada perda de inserção⁵¹.

Deste modo, o sucesso da terapia periodontal visa a completa supressão da patogenia bacteriana e a redução dos sinais clínicos da inflamação⁵¹, assim como a regeneração de tecidos que foram perdidos pela doença, como ligamento periodontal, osso alveolar e cemento¹¹.

Fica evidente que o sucesso do tratamento periodontal envolve a descontaminação da superfície radicular, a fim de eliminar ou reduzir as bactérias periodontopatogênicas^{6,8}. Tratamentos mecânicos, químicos e

físicos tem sido propostos para eliminar os microorganismos presentes no local visando à redução dos sinais clínicos de inflamação, eliminando os fatores locais que contribuem para a destruição dos tecidos periodontais^{3,9,10,26,37,46,48}.

O mecanismo de raspagem e alisamento das superfícies radiculares (RAR) é o tratamento convencional para as doenças periodontais^{6,8}. No entanto, anatomias dentárias complexas e desfavoráveis como regiões de furca, grandes invaginações e concavidades, além de bolsas periodontais profundas podem dificultar o acesso de instrumentos mecânicos às superfícies dentárias, além de exigir habilidade e tempo por parte do profissional^{3,53}.

Assim, muitos profissionais optam por associar o uso de antibióticos locais e sistêmicos ao tratamento convencional, visando uma maior descontaminação das bolsas periodontais^{27,37,53}. Porém, o uso regular destas substâncias pode causar diversos efeitos colaterais nos pacientes, além de uma possível resistência bacteriana ao medicamento^{5,21,29,31}, além da dificuldade em manter concentrações terapêuticas dos antibióticos na cavidade oral^{29,61}. Assim, parece apropriada a escolha de tratamento que permita maior eficiência operatória, ausência de efeitos colaterais, redução do tempo de tratamento e desconforto do paciente, além de reduzir a indicação de cirurgias à retalho⁴.

Terapia fotodinâmica

Uma das alternativas terapêuticas ao tratamento das doenças peridontais é a Terapia Fotodinâmica (TFD), do inglês *Photodynamic Therapy*, PDT. Esta técnica foi descrita pela primeira vez por Von Tappeiner e Raab no início do século passado, onde os autores observaram a inativação de culturas de paramécios na presença do corante laranja de acridina, quando expostas à luz solar^{48,58}. No entanto, a aplicabilidade desta técnica foi abandonada devido à popularização dos antibióticos na Segunda Guerra Mundial. Devido ao aumento mundial da resistência aos antibióticos^{23,48} tem havido um renovado interesse em terapias antimicrobianas, tendo Thomas Dougherty reportado os primeiros efeitos da TFD com uso de porfirinas^{13,14}.

A Terapia Fotodinâmica se baseia na administração sistêmica ou tópica de um corante fotossensível não-tóxico que, estimulado por uma fonte de luz de comprimento de onda adequado, reage com o oxigênio presente nos tecidos produzindo espécies altamente reativas, como oxigênio singlete e radicais livres^{5,23,31,34,48,53}. Esses produtos tóxicos formados podem modificar as estruturas das membranas plasmáticas ou até mesmo do DNA por oxidação das moléculas biológicas^{23,58}. Inicialmente a TFD foi aplicada para tratamento de lesões tumorais malignas e atualmente é empregada não apenas na oncologia, mas também em diversas áreas como na dermatologia, no tratamento de infecções localizadas como, por exemplo, micoses, cândida, HPV²⁸ e

acne, além de desinfecção de alimentos, de sangue para transfusão e de água para reservatórios⁴⁸. Esta técnica oferece a vantagem de ser altamente seletiva aos microorganismos ou tecido doente pois durante a TFD, apenas as células com acumulação seletiva pelo fotossensibilizador são eliminadas^{38,49}. Além disso, a meia vida do oxigênio singlete é da ordem de nanosegundos, o que não permite que este atue longe do local em que foi produzido⁵⁸. Esta terapia pode ser repetida diversas vezes, uma vez que trata-se de um procedimento não-invasivo que não causa efeitos tóxicos cumulativos. Assim, devido ao seu baixo risco, pode ser usada em pessoas idosas ou debilitadas demais para serem submetidas a cirurgias⁴⁸.

Fontes de luz na terapia fotodinâmica

Quando o laser de baixa intensidade é empregado como fonte de luz na TFD um efeito benéfico a mais pode ser observado pois além de produzir morte bacteriana, este aparato favorece a biomodulação tecidual³. Deste modo, o laser é capaz de atuar na cadeia respiratória mitocondrial e na síntese de ATP, favorecendo o reparo³⁹, aumentando a divisão celular e a síntese de colágeno¹⁶. No entanto, este não é um aparelho disponível a muitos profissionais, uma vez que seu custo ainda é elevado. Assim, recentemente alguns estudos tem avaliado o uso de luz emissora de diodo (LED)⁶⁰ como fonte de luz na TFD^{42,64}, uma vez que

apresenta baixo custo, fácil manuseio, além de grande acessibilidade^{23,42}, principalmente aos dentistas.

Doença periodontal e terapia fotodinâmica

O crescente interesse na utilização da TFD como alternativa no tratamento das doenças periodontais se deve principalmente ao crescente desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos aos antibióticos²¹. Por ser altamente seletiva, esta terapia evita efeitos sistêmicos na flora bacteriana considerada “saudável” e minimiza os efeitos colaterais causados pela administração de antibióticos¹⁵.

Recentemente a TFD tem sido indicada como terapia antimicrobiana e muitos termos tem sido associados a esta técnica, tais como aPDT (*antimicrobial photodynamic therapy*), PACT (*photodynamic antimicrobial chemotherapy*) e PDI (*photodynamic inactivation*)^{18,22,31,42,48,50,52}.

Devido à alta seletividade da técnica e ausência de resistência microbiana, a TFD tem sido estudada como terapia auxiliar do tratamento mecânico da periodontite^{19,48,58,23,50}.

Apesar dos benefícios alcançados por esta técnica, alguns estudos in vitro revelam dificuldades em se atingir microrganismos em camadas mais profundas do biofilme oral através da TFD^{17,64}. Porém, esta técnica produz mais morte bacteriana quando comparada ao uso de antibióticos sistêmicos¹⁷.

Sabe-se que bactérias gram-positivas são mais susceptíveis à fotoinativação, enquanto bactérias gram-negativas são mais resistentes à ação fotodinâmica⁵⁸. Isso se deve às diferenças estruturais na membrana externa destes microrganismos, sendo que a camada externa das bactérias G- atuam como uma barreira funcional^{23,29,31,34,48}. Nas bactérias G+, a membrana citoplasmática é circundada por uma camada relativamente porosa de peptidoglicanos e ácido lipotecoico, a qual permite a entrada do fotossensibilizador³⁶. O envelope celular das bactérias G- consiste de uma membrana externa complexa incluindo duas bicamadas lipídicas, interna e externa, que são separadas por peptidoglicanos. Esta membrana externa produz uma barreira de permeabilidade, restringindo a ligação e penetração de diversos fotossensibilizadores^{34,40}.

Na periodontia, a TFD tem mostrado efeitos positivos contra bactérias periodontopatogênicas como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus sanguis*^{12,49}. Estudos utilizando a TFD como tratamento da periodontite crônica, periodontite agressiva ou mesmo em modelos de periodontite induzida por ligaduras em animais tem apresentado resultados animadores, por exemplo: diminuição estatisticamente significativa de bactérias periodontopatogênicas⁴⁴, redução de citocinas pró-inflamatórias e melhora nos parâmetros clínicos da doença³⁵, opção de terapia auxiliar

em imunossuprimidos^{9,18}, redução de sítios com sangramento em bolsas maiores ou iguais a 5mm²⁰ e redução da perda de tecidos periodontais³.

No entanto, recentes revisões sistemáticas e meta-análises observaram ausência de benefício adicional da TFD em relação à RAR ou benefícios apenas a curto prazo mas com resultados microbiológicos ainda contraditórios^{5,53}. Ainda, alguns estudos observaram resultados satisfatórios aplicando a TFD como opção de tratamento para a periimplantite^{26,55,56}. Com isso, nota-se que o desafio frente à Terapia Fotodinâmica é ajustar os parâmetros para aumentar a aplicabilidade, a eficácia e credibilidade desta técnica para que possa ser utilizada em tratamentos odontológicos num futuro próximo.

Fotossensibilizadores

O primeiro fotossensibilizador aprovado para uso clínico no tratamento de câncer foi um derivado de hematoporfirina denominado Photofrin®⁵⁸. Atualmente, muitos fotossensibilizadores estão disponíveis para utilização na TFD, como porfirinas, ftalocianinas e fenotiazinas. Na área odontológica, os fotossensibilizadores mais empregados são as fenotiazinas, como azul de metileno (MB, *methylene blue*), azul de toluidina O (TBO, *toluidine blue O*) e eritrosina^{17,18,31,45,47,57,58,62,64}.

Sabe-se que o mecanismo da TFD pode atuar por duas vias: Reação do Tipo I, com produção de radicais livres ou Reação do Tipo II, com produção de oxigênio singlete (sendo este o principal agente

citotóxico responsável pela foto-inativação dos microorganismos e células)^{23,29,34,48}. Os hidroperóxidos destas reações podem levar à formação de espécies reativas com oxigênio (ROS) e, uma vez que a reatividade desta molécula não é específica, a multiplicidade de alvos torna mais difícil para as células desenvolverem resistência celular. Ambos os mecanismos podem levar à morte celular e destruição do tecido doente⁴⁸.

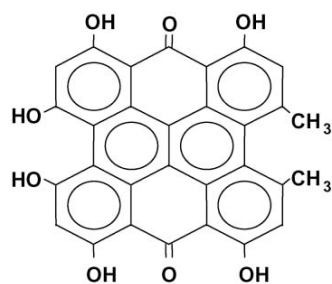
A fotossensibilidade das bactérias tem sido relacionada à carga dos fotossensibilizadores, sendo que normalmente bactérias Gram positivas são inativadas por fotossensibilizadores neutros ou aniônicos. A afinidade de fotossensibilizadores carregados negativamente por bactérias Gram negativas pode ser aumentada pelo pré-tratamento com EDTA e ligação de moléculas catiônicas como lisina ao corante e, ainda, conjugação de anticorpos monoclonais^{25,29,33,34,58}. Assim, o estudo de novos fármacos que apresentem maior eficácia antimicrobiana tem sido de fundamental importância para a obtenção de resultados cada vez mais promissores em bactérias G- periodontopatogênicas presentes no biofilme das doenças periodontais.

Hipericina

A hipericina é um pigmento fotoativo natural extraído de plantas herbáceas do gênero *Hypericum perforatum*, mais conhecida como erva de São João^{48,63} (Figura 1). Este fitoterápico é utilizado como

medicamento em quadros de distúrbios psicovegetativos, estados depressivos leves/moderados, medo e/ou agitação emocional⁴⁸, sendo um dos produtos naturais mais consumidos nos EUA⁴¹. Introduzido na TFD há quase 20 anos para tratamento antitumoral³², este pigmento tem sido associado a uma potente ação fototóxica antitumor in vitro e in vivo², além de apresentar propriedades antiinflamatórias, anti-sépticas, anti-infecciosas, antivirais e antimicrobianas^{2,48}.

Figura 1 - Erva de São João e a estrutura química da hipericina



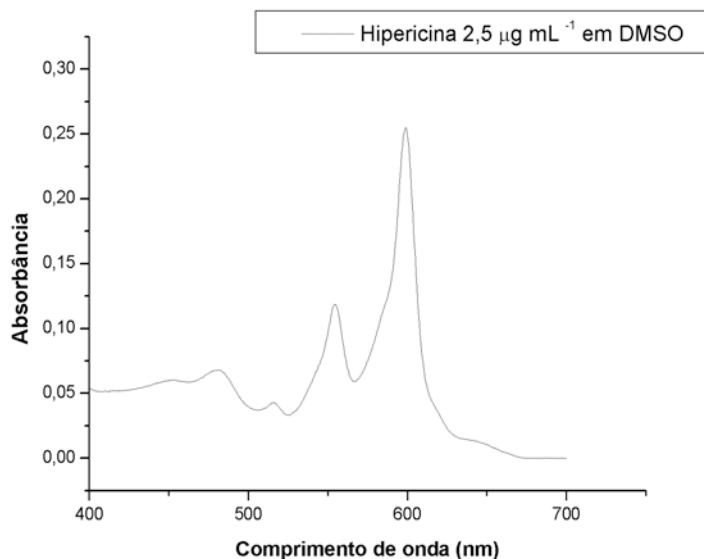
O poder fototóxico da hipericina tem sido avaliado em muitos estudos de caráter antimicrobiano^{15,41,63} e na eliminação de células tumorais, induzindo tanto apoptose quanto a necrose de células tumorais^{43,54}. Embora não tenha sido totalmente elucidado o mecanismo de ação da hipericina², seu efeito biológico tem sido associado à produção de grande quantidade de oxigênio singlete (reação tipo II)^{30,32},

sendo este radical oxidativo extremamente tóxico às bactérias. Atualmente a hipericina é considerada o fotossensibilizador mais potente encontrado na natureza^{30,48,59}.

A hipericina pode ser sintetizada a partir do Emodin, um precursor da hipericina, que após sucessivas oxidações e presença de luz gera a molécula da hipericina. Este fotossensibilizador é um composto de caráter hidrofóbico e, portanto, insolúvel em água. Seu extrato deve ser dissolvido em solventes como o DMSO (*dimethyl sulfoxide*), a acetona, o dietil éter, etc^{15,32,41,54,63}.

No espectro eletromagnético, a hipericina apresenta dois picos de absorção: 550 nm e 590 nm (Figura 2), com o pico máximo de fluorescência próximo à 600 nm. Na TFD-HY a variação no comprimento de onda deve estar em torno de 590 nm, sendo esta informação de extrema importância para a escolha da luz empregada, seja laser ou LED, para que o efeito fototóxico da hipericina possa ser eficientemente ativado³².

Figura 2 – Espectro de absorção da hipericina em DMSO



Terapia fotodinâmica e hipericina

De modo geral, poucos estudos de fotoinativação de bactérias tem sido realizadas. É conhecido que bactérias G+ são mais sensíveis à TFD. Alguns estudos relatam que TFD-HY apresenta resultados positivos em bactérias G+ e resultados negativos em bactérias G-^{41,63}. Essa falha tem sido associada às diferenças nas membranas e paredes celulares das bactérias e, para contornar esta divergência e ampliar o poder de ação do fotossensibilizador, formulações catiônicas de hipericina tem sido introduzidas²⁴. Em contrapartida, resultados recentes têm mostrado que hipericina é capaz de inativar tanto bactérias G+ como G- além de cepas de *Candida albicans* e *Candida Dulbinienses* de forma seletiva, ou seja, sem causar morte celular³⁸.

Diversos fatores relacionados à técnica de TFD-HY podem alterar a eficácia da eliminação de microrganismos. Sugere-se que o período de incubação é de extrema importância para a hipericina apresentar seu efeito citotóxico, assim como ambientes limitados em oxigênio podem reduzir o efeito da TFD antimicrobiana¹⁵. Estudos que ampliaram a dose de luz também revelaram maior eficiência da TFD-HY na eliminação de cepas G+ de *S. aureus*. Ainda, a integridade da membrana revelou ser dose-dependente em relação à concentração de hipericina, onde maiores doses apresentaram mudanças morfológicas mais expressivas e maior taxa de morte bacteriana⁶³.

Neste contexto, acredita-se que a TFD-HY com seu alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete, alta fotoestabilidade, ausência de citotoxicidade no escuro e elevada atividade fotodinâmica possa ser empregada para tratamento da periodontite, embora muitos parâmetros da técnica e características da doença periodontal precisarão ser contornadas.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica com uso de hipericina no tratamento da doença periodontal induzida in vivo, como terapia única ou como auxiliar do tratamento mecânico.

Objetivos Específicos

- Capítulo 1: Fazer uma revisão da literatura sobre o uso da Terapia Fotodinâmica em biofilmes orais;
- Capítulo 2: Avaliar a perfil ósseo alveolar e processos de reparo pós-tratamentos por meio de análise histométrica e por avaliação tridimensional por micro-tomografia computadorizada, assim como avaliar a expressão de proteínas relacionadas à reabsorção óssea (TRAP e RANKL) por meio de análise imunohistoquímica.

CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1

In: Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection

Wanessa CMA de Melo, Milene N de Oliveira, Pinar Avci, Asheesh Gupta, Daniela Vecchio, Magesh Sadasivam, Rakkiyappan Chandran, Rui Yin, Livia R Perussi, George P Tegos, Janice R Perussi, Michael R Hamblin.

Photodynamic Therapy in Dental Biofilms* ***Clinical studies and applications***

Livia Rodrigues Perussi, Janice Rodrigues Perussi

Revisão submetida e aceita para o

Expert Review of Anti Infective Therapy (IF: 3.28)

* Este capítulo faz parte de uma revisão mais extensa, intitulada: *Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection*. Anexo B.

ABSTRACT. Microbial biofilms are defined as accumulations of microbial cells embedded within a polymeric matrix, typically comprising exopolysaccharide that together form a complex community. These communities of microorganisms in biofilms have been found to be responsible for a wide variety of microbial infections in different parts of the body such as: urinary tract infections, catheter infections, middle-ear infections, gingivitis, caries, periodontitis, orthopedic implants and so on. The microbial cells growing in a biofilm have properties and gene expression patterns distinct from planktonic cells. These differences include phenotypic variations in enzymatic activity, cell wall composition, and surface structure, which increase the resistance to antibiotics and other antimicrobial treatments and therefore pose a major therapeutic challenge. There is consequently an urgent need for new approaches to attack biofilm-associated microorganisms, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) may be a promising candidate. aPDT involves the combination of a non-toxic dye, termed a photosensitizer, and low intensity visible light which, in the presence of oxygen, produce cytotoxic reactive oxygen species. It has been found that many biofilms are susceptible to aPDT, particularly in dental disease. This review will focus on aspects of aPDT that are designed to increase efficacy against biofilms, including PS drug design, modalities to enhance penetration of PS into biofilm, and combination of aPDT with biofilm-disrupting agents.

Key Words: Antimicrobial photodynamic therapy, biofilm, microbial resistance, extracellular polysaccharide, persister cells, multidrug efflux pump, dental infection, phenothiazinium dye.

Photodynamic Therapy in Dental Biofilms

Clinical studies and applications

Livia Rodrigues Perussi¹, Janice Rodrigues Perussi²

¹ Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Brazil

² Instituto de Química de São Carlos – USP, Brazil

Periodontal diseases are among the most common oral diseases in the world, leading to tooth loss. Upon poor oral hygiene, constituents of the diet interact with oral bacteria leading to changes in the local microflora resulting in an upsurge of oral biofilms that adhere in teeth and soft tissues of the mouth. Thus, bleeding of the gingiva (gingivitis) can advance and involve supporting tissues of the teeth such as bone, creating the periodontal pocket (periodontitis). An adequate treatment must be done in order to stop the advance of the disease. However, due to the complex biofilm composition, systemic therapy may be associated with conventional therapy of periodontal diseases.

Chronic use of antibiotics has led resistance to many bacterial strains. Thus, the development of alternatives therapies is necessary in order to control anaerobic gram-negative microorganisms in periodontal infections. The large number of reviews articles on the association of low-power lasers with photosensitizers in periodontal disease conditions [1-7] reflects the increasing use of PDT in dentistry, which represents a novel therapeutic approach in the management of oral biofilms.

Early in 1996, Wilson et al has quantitatively investigated the lethal photosensitization of one of the predominant organisms in dental plaque, *Streptococcus sanguis*. When grown as a biofilm under conditions similar to those

existing in the oral cavity, using hydroxyapatite as the substratum and artificial saliva as the nutrient source, *S. sanguis* was killed using an aluminium disulphonated phthalocyanine (AlPcS₂) as a light-activated antimicrobial agent [8].

In 2002, O'Neill et al used multi-species biofilms of oral bacteria irradiated with light from a helium/neon laser. The biofilms consisted of extremely large numbers of bacteria (9.10^9) and 97.4% were killed following irradiation with 31.5 J in the presence of 25 mg/ml toluidine blue O (TBO), concluding that this may be useful in the treatment of dental plaque-related diseases [9].

Fontana et al, 2009 investigated the photodynamic ability to reduce the number of dental bacteria in the planktonic phase and in biofilms. The microorganisms were sensitized with 25 µg/ml of methylene blue (MB) and exposed to red light for 5 minutes. As results, they observed 63% reduction of bacteria in the suspension form and only 32% in the biofilms. Thus, the conclusion was that PDT is less effective in biofilm conditions than in bacteria planktonic phase [10].

Goulart et al, 2010 have evaluated the inactivation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), responsible for causing aggressive periodontitis, by rose bengal (RB) as a model of a reactive oxygen species (ROS) generator, in planktonic and biofilm cultures. After PDT, the reduction in the biofilm (about 45%) was significantly dependant on RB concentration and irradiation time and it did not cause damage to gingival fibroblast cells under the same conditions [11]. In another study it was compared methylene blue (MB) and erythrosine (ERY) to inactivate Aa. The results showed that ERY is more efficient at killing these bacterial cells in planktonic (75%) and biofilm (77%) culture compared with MB (50% and 54%, respectively). They have concluded that PDT using MB or ERY as a photosensitizing agent and a dentistry photopolymerizer as a light source could be an efficient option

for pocket decontamination in aggressive periodontal disease [12]. Table 1 summarizes some important outcomes of each study.

Table 1. *In vitro* studies outcomes.

Year	Authors	Bacteria in biofilm	PS	Light source	Effect
1996	Wilson	<i>S. sanguis</i>	AIPcS2	GaAIAs laser	5 log ₁₀ reduction
2002	O'Neill	<i>Multi-species</i>	TBO	Helium/neon laser	97.4%
2003	Soukos ¹⁸	<i>Dental plaque bacteria and Actinomyces naeslundii species</i>	Conjugate clorin e6 and pL	Red light	Dental plaque species: 90% A. naeslundii: 99%
2009	Fontana	<i>Multi-species</i>	MB	Diode laser	32%
2010	Goulart	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	ERY MB RB	Hand-held photopolymerizer (HHP)	77% 54% 45%

As it can be observed, antimicrobial PDT is very effective in periodontal studies *in vitro*. However, when biofilms studies are evaluated and even more, when clinical studies are conducted, PDT results are controversial.

An *in vivo* study evaluated PDT as a treatment for induced periodontitis in diabetic rats. PDT was applied once with toluidine blue O (TBO) 100 µg/ml and red source laser for 133 seconds. Results showed that PDT groups had less bone loss than group given only the SRP treatment. Even though the animals had a systemic disease, the therapy was able to decrease the signals of periodontal destruction [13].

A clinical study conducted in 10 patients with diagnosis of aggressive periodontitis on which they were submitted to SRP or PDT and evaluated in terms of clinical outcomes. After 3 months, both treatments led to improvements in reducing the signals of disease, but with no significant statistical differences among them [14].

Another clinical study evaluated 58 individuals submitted to SRP alone, SRP plus 1 session of PDT and SRP plus 2 sessions of PDT. The two most significant outcomes measured (probing depth, PB and clinical attachment level, CAL) had no

statistical difference among the groups. However, bleeding on probing (BOP) decreased in the groups with the associated therapies [15].

In 2011, a statement released by the American Academy of Periodontology (AAP) reported that lacks evidence of PDT effectiveness based on the clinical trials, where only two trials observed great bacterial reduction from out of ten already published. Therefore, AAP states that PDT is unpredictable and inconsistent in the ability to reduce bacterial loads compared to SRP alone [16]. However, to our knowledge, comparisons between PDT clinical studies are difficult to eliminate all bias. There are PDT applications in many different diseases, such as chronic periodontitis and aggressive periodontitis. As it is know, the nature and the pathogenesis of the diseases are different, making difficult to compare the therapies outcomes. Moreover, the PDT technique has many parameters that can alter between studies methodologies, such as photosensitizers used, concentrations of the dyes, time of pre-irradiation and dose of light.

Even though PDT has still a long way to roam in studies related to dental biofilms, it is already clear that this therapy can be interesting in many clinical situations due to its unique characteristics [13,14]. PDT applications related to caries, endodontic infections and dental implants have also been evaluated and promising results have been achieved [17].

Author's statement. It is clear that PDT will never be prescribed as a unique therapy for treating dental biofilms. However, we can affirm that PDT is an effective and promising complementary therapy in many different clinical situations, especially in periodontal treatment.

References:

1. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 57, 680-4 (2006).
2. Shivakumar V, Shanmugam M, Sudhir G, Pavithra S. Priyadarshoni Scope of photodynamic therapy in periodontics and other fields of dentistry. *J Interdiscip Dentistry.* 2 (2), 78-83 (2012).
3. Sudhakara Reddy R, Ramya Kotha, Ramesh Tatapudi, Subbarayudu Gudapati, Sai Madhavai N, Sai Kiran CH. Photo Dynamic Therapy in Oral Diseases. *Int J Biol Med Res.* 3(2), 1875-83 (2012).
4. Malik R, Manocha A, Suresh DK. Photodynamic therapy - A strategic review. *Indian J Dent Res.* 21, 285-91 (2010).
5. Bains VK, Gupta S, Bains R. Lasers in Periodontics: An overview. *J Oral Health Comm Dent.* 4, 29-34 (2010).
6. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 81 (1) 4-14 (2010).
7. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 36, 59-97 (2006).
8. Wilson M, Burns T, Pratten J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrob Chemother.* 37 (2), 377-81 (1996).
9. O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med.* 31 (2), 86-90 (2002).
10. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. *J Periodontal Res.* 44 (6), 751-9 (2009).
11. Goulart R de C, Bolean M, Paulino T de P, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg.* 28 (1), 53-60 (2010).
12. Goulart R de C, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes in

photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg.* 28 (1), 85-90 (2010).

13. De Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol.* 79 (11), 2156-65 (2008).
14. De 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.* 78 (6), 965-73 (2007).
15. Ge L, Shu R, Li Y, Luo L, Song Z, Xie Y, et al. Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planning in the treatment of chronic periodontitis. *Photomed Laser Surg.* 29 (1), 33-7 (2011).
16. American Academy of Periodontology statement on the efficacy of lasers in the non-surgical treatment of inflammatory disease. *J Periodontol.* 82 (4), 513-4 (2011).
17. Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Investig.* 27, [Epub ahead of print] (2012).
18. Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of Human Dental Plaque Bacteria: Enhancement of the Photodynamic Effect by Photomechanical Waves in an Oral Biofilm Model. *Lasers Surg Med.* 33 (3), 161-8. (2002).

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

Hypericin- PDT Treatment of Experimental Periodontitis *In Vivo*.

Livia Rodrigues Perussi-Valverde, Rafael Scaf de Molon, Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira, Anderson Orzari Ribeiro, Janice Rodrigues Perussi, Rosemary Adriana Chierici Marcantonio.

Hypericin- PDT Treatment of Experimental Periodontitis *In Vivo*.

Livia Rodrigues Perussi-Valverde, MS, PhD student¹; Rafael Scaf de Molon, MS, PhD student¹; Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira, MS, PhD student¹; Anderson Orzari Ribeiro, PhD, Adjunct Professor²; Janice Rodrigues Perussi, PhD, Adjunct Professor³; Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, PhD, Titular Professor¹

¹Departamento de Diagnostico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, SP, Brazil

² Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC - UFABC, Santo André, SP, Brazil

³Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

Corresponding author:

Prof^a. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

Department of Diagnosis and Surgery, Araraquara Dental School Universidade

Estadual Paulista – UNESP; Rua Humaitá, 1680 Araraquara, São Paulo, Brazil, Zip

Code 14801-903

Tel: +55-16-3301-6376. E-mail: adriana@foar.unesp.br

Abstract

Background: Hypericin has been quoted as a powerful photosensitizer but no reports of HY-PDT (Hypericin – Photodynamic Therapy) for periodontal diseases to date have been observed. The aim of this study was to evaluate the HY-PDT effects on experimental periodontitis *in vivo* as a monotherapy or as an adjunct to mechanical periodontal treatment.

Methods: Eighty-four rats had periodontitis induced by cotton ligatures that were inserted in the subgingival area of maxillary second molars. After seven days, the ligatures were removed and the animals were randomly divided into the following treatments groups: Control (C); Scaling and root planning (SRP) with mini-curettes; PDT (HY 10µg/ml, LED 590nm) and SRP+PDT. Seven, 15 and 30 days post-treatment the animals were euthanized. The furcation area was evaluated by immunohistochemical analysis for TRAP and RANKL in the 7-days samples; histometric and micro-computerized tomography (microCT) analysis for bone loss observations were performed at all periods samples.

Results: MicroCT and histometric analysis of bone at 7 and 15-days periods showed significant differences between SRP, PDT and SRP+PDT groups to Control group, whereas treatments groups revealed more bone repair. At 30-days period, no differences were found among all groups. PDT and SRP+PDT immunohistochemistry analysis showed TRAP-positive cells and RANKL-staining similar to Control group.

Conclusion: In this study conditions, HY-PDT as a single therapy or as an auxiliary treatment of periodontitis *in vivo* showed similar results to SRP regarding bone loss at all time points. Therefore, more studies should be performed in optimize the periodontal outcomes.

Keywords: photodynamic therapy (PDT); hypericin; microCT; periodontitis

Introduction

Periodontitis is characterized by loss of periodontal tissues due to accumulation of bacterial biofilm around the structure of the teeth. If untreated, the biological response leads to inflammation and bone loss.¹ In order to investigate host bacteria interactions, the ligature model in rats is a feasible way to evaluate periodontal therapies *in vivo*.²⁻⁴

The conventional treatment of periodontal diseases includes scaling and root planning (SRP), which is a mechanical procedure indicated to eliminate bacterial deposits on tooth surfaces in order to diminish signs of inflammation.^{4,5} However, the pattern of the disease, anatomical variations, involvement of systemic diseases and different therapeutic approaches can make mechanical treatment not sufficient as a monotherapy.^{4,6-9} Thus, chemical support in association to SRP is commonly used to amplify the bacterial reduction and help eliminate clinical signs of periodontitis. Although antibiotic is commonly an ally, a long-term prescription can lead to microorganism resistance and many other side effects to the patient.⁹⁻¹⁴

New therapies have been proposed as auxiliary to periodontal mechanical treatment, such as photodynamic therapy (PDT). This technique requires a non-toxic light-sensitive dye (known as photosensitizer) that interacts with a specific target cell in the presence of oxygen and is activated by a visible light of adequate wavelength. This reaction produces singlet oxygen and other reactive oxygen compounds (ROS) that are toxic to bacteria.¹⁵⁻¹⁸

Although many studies *in vitro* and *in vivo* have already evaluated the efficacy of PDT in the treatment of periodontitis, results are still contradictory.^{17,19,20} Furthermore, it is known that many factors related to this technique such as the choice of the photosensitizer²¹ and its concentration, the wavelength and dose of light as

well as the interval among the administration of the dye and the irradiation time can make it difficult to achieve a protocol with 100% efficiency.

It is also important to consider that most of the PDT studies are conducted with lasers to activate the PS.^{6, 21-23} Although they have many advantages as a light source, this technology is very expensive, limiting the applicability of this technique. An alternative is the light emitting diode (LED),²⁴ which is reasonably less expensive and may be easily found in a dental office.^{25,26}

Other aspect to emphasize is that most studies associating PDT and periodontitis uses mainly phenothiazines dyes, like methylene blue (MB) and toluidine blue O (TBO), which have poor effects against G- microorganisms and can also stain the teeth as well as implants and restorations.^{17,23,25,27} Hypericin (HY) is a natural photosensitive pigment that is extracted from various species of the *Hypericum* genus, the herbaceous plant known as St. John's Wort and is on the market for many years as an anti-depression herbal agent.²⁸⁻³¹ HY is considered one of the most powerful photosensitizers found in nature due to the high generation of superoxide anion and singlet oxygen.^{15,30,32} Although the phototoxicity of HY on several tumor cells has been reported, the data concerning its photoactivity on microorganisms are scarce.^{33,34} A detailed study to obtain the experimental parameters to achieve satisfactory selective photoinactivation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* with hypericin has been achieved.³⁵ In another study, HY was showed to kill *E. coli* on a similar amount as Zn-phthalocyanine since 12 J cm⁻² leads to a 7 log reduction, almost twice the inactivation obtained with rose Bengal and methylene blue at high concentration and at the same light dose.³⁶ A recent study evaluating Gram-positive and Gram-negative bacteria in planktonic culture and in biofilm, also observed selective photoinactivation with hypericin (results not yet published).

However, antimicrobial-PDT with HY related to oral bacteria was poorly investigated to date.^{28,31}

During progression of periodontal disease, bone reabsorption occurs in the presence of cytokines that are released in the inflammatory sites. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and multinuclear tartrate-resistant acid-phosphatase (TRAP)-positive cells are related to osteoclast differentiation and activation, leading to osteoclastogenesis and bone loss. Both cytokines play an important role in the alveolar bone during periodontitis.^{23,37-39} To evaluate bone destruction, micro-computerized tomography (microCT) is a very sensitive technique providing three-dimensional images such as bone height, bone density and bone structures⁴⁰⁻⁴² and has been indicated to evaluate periodontal bone modifications. Regarding previous PDT *in vivo* studies, there are no reports of bone repair by means of micro-CT.

A great amount of questions still needs to be answered regarding PDT as a treatment for periodontal diseases. To our knowledge, there are no reports using HY for this purpose. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of HY-PDT as a monotherapy or as an adjunct treatment to experimental periodontitis in a rat model.

Material and Methods *

Sample

Experimental group comprised eighty-four male *Holtzman* rats (*Rattus Novergicus*), weighting 200-250g, maintained in the animal facilities of the Araraquara Dental School, with controlled temperature ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity (65-75%),

* Para metodologia completa, ver apêndice 1.

and a 12-hour light-dark cycle. Throughout the experimental period, rats were housed in plastic cages, fed by a standard laboratory diet and given water *ad libitum*. The study protocol was conducted according to the recommendations of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Institutional Experimentation Committee for Animal Care and Use (Protocol 21/2009).[#]

Experimental Periodontal Disease Induction

The animals underwent general anesthesia (0.08 ml of ketamine hydrochloride and 0.04 ml of xylazine per 100g body weight) administered via intramuscular injection. The ligature model was obtained by placing a cotton thread around the second maxillary molars at the level of the gingival sulcus. The ligatures were placed bilaterally and kept for 7 days in order to induce periodontitis. After the 1-week induction period, the ligatures were removed and the treatments were performed.

Experimental Protocol

At the day of ligature removal, all treatments were performed. The animals were randomly[∞] assigned into four groups: Control (C, n=21) in which no treatment was performed; Scaling and root planning (SRP, n=21); Photodynamic therapy (PDT, n=21); and SRP associated with PDT (SRP+PDT, n=21). On each group, the animals were divided into three experimental periods: seven, 15 and 30 days post treatment, with seven animals *per* period on each group.

[#] Aprovação do Comitê de Ética: Anexo A

[∞] A blinded co-autor performed randomization.

SRP Treatment

The SRP treatment was conducted with mini-five curettes (#7-8, #11-12, #13-14)* through distal-mesial traction movements in both vestibular and palatine surfaces of the second maxillary molars. The furcation and interproximal areas were scaled through cervico-occlusal traction movements with the same curettes.

Photosensitizer

Hypericin was synthesized from emodin according to the literature⁴³ and the product was checked by ¹H nuclear magnetic resonance (NMR). The stock solution 1 mg/mL was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO 1%). In order to achieve the established concentration (10 µg/mL), the stock was diluted in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and kept in the dark to avoid photodegradation³⁰.

Light source

The maximum absorption band of HY is 590 nm and therefore the light source used to activate the photosensitizer was a yellow LED (light emitting diode) operating at 590 ± 10 nm at an intensity of 115 mW.cm^{-2} . The LED apparatus (tip: 1 mm diameter) was developed by the Optics Group (Research Center for Optics and Photonics) of the Physics Institute, University of São Paulo - USP, São Carlos, SP - Brazil.

PDT Treatment

Hypericin was inserted into the gingival sulcus at a volume of 0.2 mL using a syringe (1 mL) and an insulin needle (13 x 0.45 mm), without a bevel, through all

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

faces of the second molars teeth. The photosensitizer remained within the periodontal pocket for five minutes (*pre-irradiation time*). The *irradiation time* was 4 minutes per tooth, where the LED was applied in a parallel position to the teeth occlusal surface. The fluence delivered was 35.15 J/cm² per tooth.

Experimental Periods

The animals were sacrificed at 7, 15 and 30 days post treatments, by an overdose of anesthesia administration. After euthanasia, the maxillary jaws were hemisected. Half of the blocks was separated for histology and immunohistochemical processing, whereas the hemi-maxillas were fixed in 4% buffered paraformaldehyde (pH 7.2) for 48 hours and decalcified for 2 months in 7% EDTA (0.1M, pH 7.2) and embedded in paraffin. The remaining blocks were placed in H₂O₂ for 48 hours in order to facilitate removal of the soft tissues and, subsequently, stored in 70% ethanol for alveolar bone analysis by micro-computerized tomography.

Histometric analysis

After decalcification, the specimens were embedded in paraffin, cut into 6µm sections of longitudinal serial slices and stained with hematoxylin and eosin.

For the histometric analysis, a calibrated blinded examiner randomly selected three histological images from each animal corresponding to the beginning, middle and end of each sample. The proportion of bone tissue in the furcation area was assessed using an image analyzer program#. The measures of each section were performed three times by the same examiner within a week interval. The area analyzed was delimited from the furcation roof to a distance of 1000 µm apically and

Image J Launcher 1.42q, Bethesda, Maryland, USA

limited horizontally by the tooth molar roots, according to the methodology described by César-Neto *et al*, 2006.⁴⁴

MicroCT Analysis

The hemi-maxilla samples of seven rats per group and period were scanned with MicroCT system[∞]. The x-ray generator was operated at 50 kVp, beam current at 500 μ A, 0.5mm aluminum filter at an image resolution of 12.45 μ m. The images were reconstructed with specific software^ξ in all three spatial dimensions and then, all the images were orientated and saved in sagittal slices (2000 x 1336) with Skyscan software^φ. The volumetric measurements were performed after the selection of a 3-D ROI (region of interest) with CTAn program[≈]. During the drawing of the ROI the examiner was guided by morphological landmarks. The ROI was delimited from the most mesial root of third molar to the most distal root of first molar served as endpoint landmark borders, because the experimental periodontal disease and the maximum bone loss was evident on the second molar around the furcation and interproximal area. After the delimited landmarks borders, the contours of the ROI were drawn at regular intervals with a slice-based method, every 10 planes, resulting in minimum inclusion of the teeth roots and maximum quantification of alveolar bone. All contours were drawn beginning immediately below the cemento-enamel junction (CEJ) and moving 1,5 mm in the apical direction. Thus, the entire bone area of the interproximal region and the furcation area of the second molar were involved in the ROI. Finally,

[∞] Skyscan, 1176, Aartselaar, Belgium

^ξ NRecon 1.6.1.5 – Skyscan, Belgium

^φ Data Viewer 1.4.3.1 - Skyscan, Belgium

[≈] CT Analyser 1.10.1.0 - Skyscan, Belgium

on the original three-dimensional image, the indices were calculated through the binarized ROI. The architectural parameter evaluated was bone volume fraction (%) that represents the volume of the mineralized tissue.

Immunohistochemical analysis

Serial longitudinal sections (4µm) were mounted on silanized slides_ς and incubated for 2 hours at 58°C. Briefly, tissue sections were deparaffinized and rehydrated. No antigen retrieval was performed. The sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 30 minutes at room temperature (RT). Afterwards, sections were incubated with 3% bovine serum albumin for 2 hours. Thereafter, the sections were incubated with rat TRAP or RANKL polyclonal antibodies raised in rabbit (1:200 dilution for both proteins), in a humid chamber at RT overnight. As negative control, primary antibody was omitted and incubated with 1% PBS. Following the incubation period, the sections were washed with 1% PBS and incubated with biotinylated immunoglobulin for 30 minutes at RT. After washing, sections were incubated by biotin-streptavidin peroxidase_φ complex for 30 at RT. Diaminobenzidine/hydrogen peroxide_ψ was used as a chromogen substrate. All sections were counter-stained with Carrazi Hematoxylin for 45 seconds and mounted in Permount.

Standardized photomicrographs of the most coronal portion of the furcation region were taken using a light microscope (20x, original magnification). The area of the furcation for immunohistochemical analysis was selected as the same methodology described for histometric analysis.

_ς Dako, Glostrup, Denmark

_φ DAKO-LSAB

_ψ DAB - DAKO

A masked, calibrated examiner analyzed the images. The positively TRAP-cells around bone tissue were assessed whereas osteoclasts with more than two nuclei were considered TRAP-positive multinuclear cells. The RANKL marker was analyzed in the same furcation area by percentages: no marking (0%), weak marking (<25% of cells), moderate marking (<50% cells) and strong intensity (>50% cells), according to Garcia et al.⁴⁵

Data Analysis

The histometric and microCT data distribution were statistically analyzed using the test of Shapiro-Wilk to assess whether the data were distributed according to the central theorem of distribution. All groups showed normal distribution of data, and then the parametric test ANOVA (One Way) supplemented with Tukey test was used for inter-group analysis of the data. For the histometric data, the paired t-test was used to intra-groups for comparison taking into account different evaluation periods. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0°. All tests in this study were applied with a 95% confidence level ($p < 0.05$).

Results

Histometric analysis

The histometric data showed that on the 7-days analysis, all the treatment groups (SRP, PDT and SRP+PDT) presented a higher percentage of bone fill in furcation area when compared to Control group ($p < 0.05$; $p < 0.001$). The same observation was verified at 15-days analysis; all the treatment groups presented a higher percentage of bone fill in furcation area when compared to Control group ($p < 0.05$;

° (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)

$p < 0.001$; $p < 0.001$). However, no statistical differences were observed between the treated groups.

The intragroup analysis showed that there was statistically significant difference in the PDT group, between the periods of 15 and 30-days ($p < 0.05$), which presented greater bone fill in the furcation area at 15-days samples.

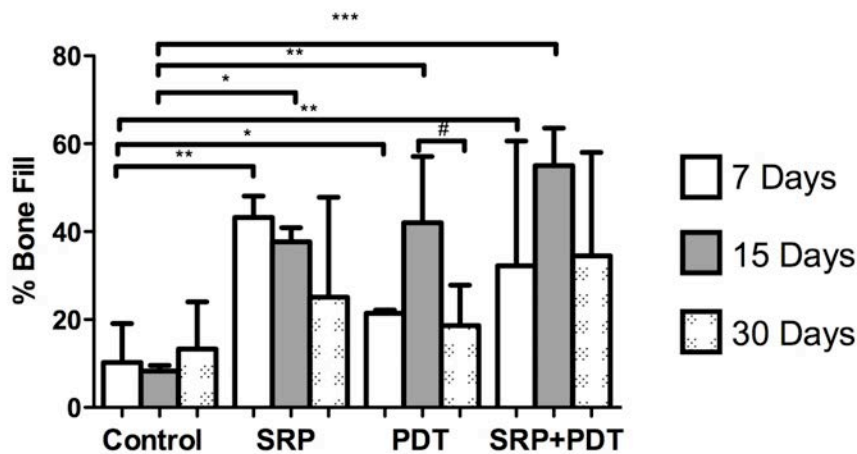


Figure 1. Percentage of bone fill in all groups at the 7, 15 and 30 days experimental periods.

* Significant differences between Control and PDT group at 7-days and between Control and SRP group at 15-days ($p < 0.05$). Tukey's test.

** Significant differences between Control and SRP and SRP+PDT groups at 7-days and between Control and PDT group at 15-days ($p < 0.01$). Tukey's test.

*** Significant difference between Control and SRP+PDT group at 15-days ($p < 0.001$). Tukey's test.

Significant difference between 15 and 30-days period at PDT group ($p < 0.05$).

Paired t-test.

MicroCT Analysis

The results of bi-dimensional and three-dimensional sagittal micro-computed tomography views of maxillary molars from each group at 7 days are shown in figure 2a to 2d and 2e to 2h, respectively. Graphs of all experimental periods with the results of bone fraction volume (BVF) are shown in figure 3a to 3c. Relevant effect on bone repair, represented by BVF, was evidenced in the control group compared to SRP, PDT and SRP+PDT groups at 7 and 15-day periods. No significant difference was evident at 30-day period evaluation between groups ($p < 0.05$).



Figure 2. Images of the maxillary second molars using micro-computed tomography in a 7-day period. Bi-dimensional (2a to 2d) and three-dimensional (2e to 2g) sagittal micro-computed tomography views of maxillary molars of different animals according to the treatment: (a,e) Control; (b,f) SRP; (c,g) PDT and (d,h) SRP + PDT. Note the repair process on interproximal alveolar bone and furcation area for the treated groups compared to the control group.

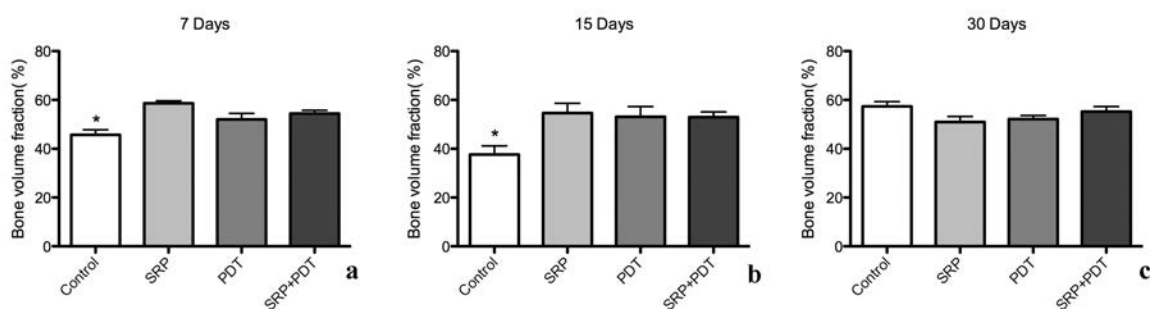


Figure 3. Figure 3a to 3c – Bone volume fraction in all experimental periods of 7 (a), 15 (b) and 30 (c) days, respectively.

* Significant difference between treatment groups (SRP, PDT and SRP+PDT) and Control group ($p < 0.05$). Tukey's test.

Immunohistochemical analysis

The RANKL and TRAP staining patterns demonstrated antibody specificity (Figure 4). Among the different treatments applied in the animals, RANKL immunoreactivity was strongly more evident at PDT and SRP+PDT groups. The number of TRAP-positive cells in the animals in the PDT and SRP+PDT groups was slightly similar to Control group while the SRP group had the lowest number of TRAP-positive cells (Table 1).

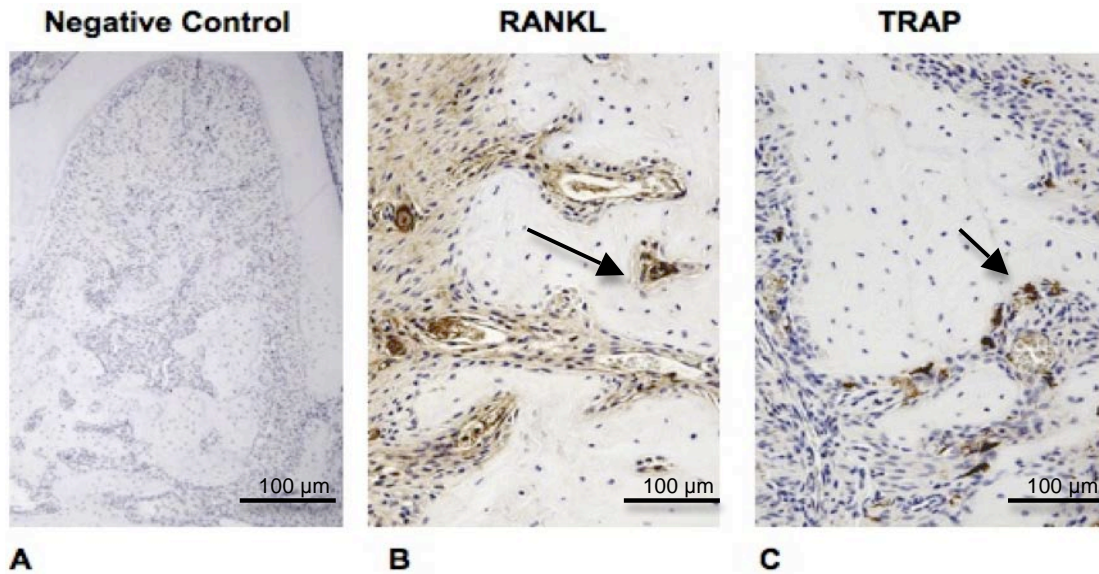


Figure 4. TRAP and RANKL immunostaining (IS) in the furcation area, 7-days post treatment in sections from the Control group. Negative control (A) of IS, original magnification: 5x; arrow indicating RANKL IS (B) and TRAP-positive cell (C), original magnification: 20x.

Table 1. RANKL Immunostaining and TRAP-positive cells staining on the groups analyzed.

	Control	SRP	PDT	SRP+PDT
RANKL Immunostaining	Weak (<25%) to moderate marking (<50%)	No marking (0%) - weak marking (<25%)	Moderate marking (<50%)	Moderate marking (<50%)
TRAP-positive cells	8	3	7	9

Discussion

In this study, clinical signs of inflammation were evident and bone loss was observed by the tridimensional images after the 7-days induction period of

periodontal disease. Therefore, the outcomes of the disease model were in accordance to previous *in vivo* studies performed in rodents with the same experimental period for periodontitis.^{1,2,5,9,41,45}

Photodynamic therapy, initially indicated for treatment of malignant tumors, recently has been proposed to inactivate bacteria and may also be cited as antimicrobial or antibacterial-PDT (a-PDT), photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) or even photodynamic inactivation (PDI).^{9,15,26,33,45-47} Since we did not evaluate bacterial load, the PDT term was used. This therapy has advantages such as selectivity and lack of resistance development, being a very promising treatment in association to periodontal mechanical therapy.^{9,15,17,18}

Periodontitis is an inflammatory disease formed by accumulation of oral biofilm, mainly formed by periodontopathogenic bacteria, mostly G-. This type of bacteria possesses an outer membrane that restricts binding and penetration of many photosensitizers, especially when arranged in a biofilm.^{15,33,48} Thus, one of the challenges to PDT is to find a suitable drug that can penetrate in bacteria walls appropriately so that the efficiency of the therapy is maximized. This may explain why PDT for periodontal diseases have less efficient outcomes than reports on other diseases mainly constituted by G+ bacteria.^{25,33} Yow et al.⁴⁹ observed that combination of HY with light irradiation was able to significantly kill G+ bacteria but was not effective against G- cells and therefore, the difference of susceptibility of the PACT was related to the cell walls structures that diverged within the uptake of HY between the two species analyzed. However, Melo et al.³⁶ reported that despite of HY being a neutral molecule, this PS is able to kill *E. coli* after irradiation at 630 nm. The increase in light dose as well as in the photosensitizer concentration leads to increase in bacteria inactivation up to 7 log reduction.

Fontana et al.⁴⁸ reported that PDT killed more bacteria in suspension than when arranged in biofilms. Furthermore, Zanin et al.²⁵ reported that mature biofilms are less susceptible to PDT. The microCT and histometric results at 7 and 15-days (Figures 1 and 3, respectively) showed significant differences between Control and treatment groups (SRP, PDT and SRP+PDT), but without differences among them. PDT alone or combined to SRP did not reveal a significant greater bone repair compared to SRP group. The lack of expressive outcomes in the PDT and SRP+PDT groups may be related to deficiencies on the PDT parameters and as well as on the hypericin's characteristics. Some explanations can be cited, such as: hypericin may have had difficulty in binding to the G- bacteria walls arranged in a complex biofilm in periodontitis; the pre-irradiation time could have been short; the dose used could not be sufficient to photosensitize HY on a biofilm *in vivo* and lastly, the concentration of HY may have been low. Therefore, the PDT outcomes in this study were not significant compared to SRP and some modifications in the parameters of HY-PDT should be made in further studies, such as utilization of nanoparticles to improve hypericin's delivery to its targets.

In this study, PDT as a monotherapy or as adjunct to SRP showed similar results to SRP alone, considered the gold- therapy for periodontitis. To our knowledge, SRP will never be an option but a *sine qua non* treatment to diminish progression of periodontitis and thus, PDT should never be indicated as a monotherapy.⁵⁰ SRP should always be performed in order to disrupt the biofilm structure on teeth surface, although our results revealed outcomes similar to conventional mechanical therapy, which could suggest substitution of SRP by HY-PDT. Berakdar et al.⁵⁰ examined the additional efficacy of PDT to SRP and observed that after 6 months of clinical evaluation, higher improvements of clinical parameters

were observed when PDT was applied after SRP. The authors concluded that PDT as adjunct to SRP should be a treatment option but not a substitute to conventional therapy by SRP.

Beyond that, the inflammatory character of periodontitis leads to bleeding, which can alter the concentration and efficiency of the photosensitizer, once hemoglobin is present on gingival crevicular fluid, reducing the effectiveness of the PDT.^{19,26} In this study, in order to avoid this problem, once the cotton ligature was removed, the bleeding was controlled using a soft gauze. Since all the treatments were performed immediately after ligature removal, we cannot affirm that blood was totally removed and thus, did not interfere with the absorbance of the photosensitizer and efficiency of the therapy. Thus, bleeding and saliva may have interfered in our PDT outcomes, even though the treatments were carefully conducted. Even more, our PDT treatments were performed in a single session. Recent studies in carcinoma cells observed that more applications of PDT can lead to more effectiveness of the therapy and can also produce more reactive oxygen species (ROS).⁵¹

Photodynamic therapy has two pathways of action and production of ROS: type I and type II reactions. Hypericin is mostly related to a high yield of singlet oxygen formation (type II reaction) even in low concentrations (<0.1 µg/mL), a characteristic that makes its photosensitizing effect so powerful⁴⁹. Since singlet oxygen's action time is very short, this reactive oxygen is only toxic to the organism in a small range of seconds and in a small radius of action (20 nm), avoiding interactions with the surrounding tissues.^{15,17,29} Therefore, those peculiar characteristics made HY-PDT a challenge for periodontal treatment.

Our previous *in vitro* study evaluating different concentrations of HY revealed that 10 µg/mL was able to eliminate G+ bacteria (results not published) and G-

bacteria.⁵² Moreover, it is wise to use low concentrations of HY, since high concentrations of photosensitizers may lead to aggregation in aqueous medium.^{26,30} Therefore, HY is considered potentially more effective in lower concentrations so 10 µg/mL seemed to be a feasible initial parameter in this *in vivo* study.

To improve even more the HY-PDT outcomes, changes in the settings such as pre-incubation time, irradiation time, dose and HY concentration should be evaluated. Nevertheless, future studies should evaluate PDT outcomes in multiple sessions. With exception of PDT group at 15 and 30-days (Figure 1) which had significant less bone filling at 30-days compared to 15-days period, the 30-day period observation between all groups had no statistical significant difference within the bone repair (Figure 3). One of the explanations may be the re-colonization of the periodontal pockets.⁵³ Prates et al.⁹ evaluated the short-term of bacterial reduction after PDT and reported no difference between the initial bacterial load (analyzed immediately after ligature removal) and 7-days post treatment. The authors concluded that re-growth or re-colonization may have occurred. Other aspect to emphasize is that the ligature model involves trauma of the periodontal tissues, like reported by Li, Amar.⁴⁰ Although without statistical significant difference, these observations could explain the tendency of equal bone filling and repair in all 4 groups at the 30-day period compared to groups at 7 and 15-days. Thus, we can presume that more applications of the therapy could lead to an augmentation of the bone repair at long term, as well as changes in the parameters of the PDT and on the delivery system of HY to G- bacteria.

The light source used in this study was selected in accordance to the maximum absorbance band of HY, which has its peak at 590 nm, the same wavelength as the yellow LED. There are many advantages of using a LED instead

of a laser such as low cost, easy configuration and high efficiency.^{18,26} Furthermore, this apparatus is available in almost every dental office since it is used in other dental procedures such as curing composites and dental bleaching. Thus, these features can make PDT a technique more achievable for dentists and financially more reliable to the patient as well.

Li, Amar⁴⁰ comparing three different methods to evaluate bone loss during periodontitis, observed the peak of leukocyte and osteoclast number at day 7. However, bone loss had its peak at day 10. These observations are in accordance to our results since the 7-days period bone filling had a tendency to be lower than the 15-days outcomes. However, in our study, TRAP and RANKL immunostainings revealed similar averages for PDT and SRP+PDT groups compared to Control group, where the natural course of the disease was left to progress. Thus, the area analysed for both cytokines in this study contradicts previous PDT-periodontitis studies results.^{45,54} Garcia et al.⁴⁵ evaluated the efficacy of aPDT as adjunct to SRP in ovariectomized rats and observed more TRAP positive cells in the SRP group than on the aPDT group. The authors also observed lower number of osteoclasts on the group associating PDT to SRP. Therefore, our PDT groups revealed more bone resorption cytokines compared to SRP group, although bone volume fraction evaluation by microCT and bone fill by histometric analysis revealed better outcomes than Control group. Therefore, our further investigations should evaluate different analysis methodologies in order to verify the correct role of TRAP and RANKL in HY-PDT.

Conclusion

Within the limitations of this study, hypericin-PDT as a monotherapy or as adjunct to SRP diminished periodontitis progression *in vivo*, similarly to conventional mechanical treatment. Thus, hypericin can be considered a promising photosensitizing agent. However, more studies are required in order to provide a more efficient protocol to justify the use of HY-PDT in the treatment of periodontal diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by the São Paulo State Research Support Foundation (Process no. 2009/17404-1 and no. 2010/14932-4). There were no conflicts of interest related to this study.

Sources of support

São Paulo State Research Support Foundation - FAPESP, São Paulo-SP, Brazil (process no. 2009/17404-1 and no. 2010/14932-4).

Conflict of interest and declaration of financial support

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Bottura PE, Milanezi J, Fernandes LA, Caldas HC, Abbud-Filho M, Garcia VG, et al. Nonsurgical periodontal therapy combined with laser and photodynamic therapies for periodontal disease in immunosuppressed rats. Transplantation proceedings. 2011 Jun;43(5):2009-16.
2. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. Journal of clinical periodontology. 2008 Feb;35(2):89-105.

3. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *Journal of periodontology*. 2008 Nov;79(11):2156-65.
4. Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *Journal of periodontal research*. 2008 Apr;43(2):162-7.
5. Giannopoulou C, Cappuyns I, Cancela J, Cionca N, Mombelli A. Effect of photodynamic therapy, diode laser, and deep scaling on cytokine and acute-phase protein levels in gingival crevicular fluid of residual periodontal pockets. *Journal of periodontology*. 2012 Aug;83(8):1018-27.
6. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of periodontology*. 2007 Mar;78(3):566-75.
7. de 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. *Journal of periodontology*. 2007 Jun;78(6):965-73.
8. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *Journal of periodontology*. 2008 Jun;79(6):1081-8.
9. Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, Franca CM, Cai S, Mayer MP, et al. 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. *Photomedicine and laser surgery*. 2011 Dec;29(12):835-44.
10. O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers in surgery and medicine*. 2002;31(2):86-90.
11. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *Journal of periodontology*. 2004 Oct;75(10):1343-9.
12. Hayek RR, Araujo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *Journal of periodontology*. 2005 Aug;76(8):1275-81.
13. Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *Journal of clinical periodontology*. 2008 Oct;35(10):885-96.
14. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in surgery and medicine*. 2006 Jun;38(5):468-81.
15. Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microorganismos. *Química Nova*. 2007;30(4):988-94.

16. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *Journal of dental research*. 2007 Aug;86(8):694-707.
17. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology* 2000. 2011 Feb;55(1):143-66.
18. Gursoy H, Ozcakir-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clinical oral investigations*. 2012 Sep 27.
19. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2010 Jan;81(1):4-14.
20. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers in medical science*. 2013 Feb;28(2):669-82.
21. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Journal of clinical periodontology*. 2008 Oct;35(10):877-84.
22. de Oliveira RR, Novaes AB, Jr., Garlet GP, de Souza RF, Taba M, Jr., Sato S, et al. The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. *Lasers in medical science*. 2011 May;26(3):359-67.
23. Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Gualberto EC, Jr., Santinoni Cdos S, Bosco AF, et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers in medical science*. 2013 Jan;28(1):143-50.
24. Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP, et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers in medical science*. [Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Jul;27(4):687-93.
25. Zanin IC, Goncalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Aug;56(2):324-30.
26. Nagata JY, Hioka N, Kimura E, Batistela VR, Terada RS, Graciano AX, et al. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2012 Jun;9(2):122-31.
27. Seal GJ, Ng YL, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *Int Endod J*. 2002 Mar;35(3):268-74.
28. Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2010 Mar;9(3):365-9.

29. Kiesslich T, Krammer B, Plaetzer K. Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy. *Current medicinal chemistry*. 2006;13(18):2189-204.
30. Karioti A, Bilia AR. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *International journal of molecular sciences*. 2010;11(2):562-94.
31. Mortensen T, Shen S, Shen F, Walsh MK, Sims RC, Miller CD. Investigating the effectiveness of St John's wort herb as an antimicrobial agent against mycobacteria. *Phytotherapy research*. 2012 Sep;26(9):1327-33.
32. Stupakova V, Varinska L, Mirossay A, Sarissky M, Mojzis J, Dankovcik R, et al. Photodynamic effect of hypericin in primary cultures of human umbilical endothelial cells and glioma cell lines. *Phytotherapy research : PTR*. 2009 Jun;23(6):827-32.
33. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers in surgery and medicine*. 2011 Sep;43(7):755-67.
34. Nakajima N, Kawashima N. A basic study on hypericin-PDT in vitro. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2012 Sep;9(3):196-203.
35. Bernal C, Rodrigues JAO, Guimarães APP, Ribeiro AO, Oliveira KT, Imasato H, et al. Selective photoinactivation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* with Hypericin. *Laser Physics*. 2011;21(1):5.
36. Melo WCMA, Carto LF, Dalmas RMMTS, Perussi JR. Effectiveness of photodynamic therapy on Gram-negative bacteria. In: Mendez-Vilas A, editor. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*: Formatex Research Center; 2011. p. 6.
37. Lui J, Corbet EF, Jin L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2011 Feb;46(1):89-96.
38. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *Journal of clinical periodontology*. 2012 Mar;39(3):239-48.
39. Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai JV, Taba M, Jr., Kostenuik PJ, et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *Journal of periodontology*. 2007 Jul;78(7):1300-8.
40. Li CH, Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *J Periodontol*. 2007 Jun;78(6):1120-8.
41. Liu YF, Wu LA, Wang J, Wen LY, Wang XJ. Micro-computerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature- and nicotine-induced experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontal research*. 2010 Dec;45(6):714-9.
42. Park CH, Abramson ZR, Taba M, Jr., Jin Q, Chang J, Kreider JM, et al. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *Journal of periodontology*. 2007 Feb;78(2):273-81.
43. Huygens A, Kamuhabwa AR, de Witte PA. Stability of different formulations and ion pairs of hypericin. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005 Apr;59(3):461-8.

44. Cesar-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH, Jr. . The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *Journal of periodontal research*. 2006 Apr;41(2):118-23.
45. Garcia VG, Gualberto Junior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casatti CA, et al. Adjunctive Antimicrobial Photodynamic Treatment of Experimentally Induced Periodontitis in Ovariectomized Rats. *Journal of periodontology*. 2012 Jun 9.
46. Goulart Rde C, Thedei G, Jr., Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomedicine and laser surgery*. 2010 Aug;28 (1):85-90.
47. Ribeiro AP, Andrade MC, da Silva Jde F, Jorge JH, Primo FL, Tedesco AC, et al. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. *Photochemistry and photobiology*. 2013 Jan-Feb;89(1):111-9.
48. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *Journal of periodontal research*. 2009 Dec;44(6):751-9.
49. Yow CM, Tang HM, Chu ES, Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochemistry and photobiology*. 2012 May-Jun;88(3):626-32.
50. Berakdar M, Callaway A, Eddin MF, Ross A, Willershausen B. Comparison between scaling-root-planing (SRP) and SRP/photodynamic therapy: six-month study. *Head & face medicine*. 2012;8:12.
51. Sharma KV, Davids LM. Hypericin-PDT-induced rapid necrotic death in human squamous cell carcinoma cultures after multiple treatment. *Cell Biol Int*. 2012;36(12):1261-6.
52. Melo WCMA. Effectiveness of photodynamic therapy on Gram-negative bacteria. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 2011:6.
53. Novaes AB, Jr., Schwartz-Filho HO, de Oliveira RR, Feres M, Sato S, Figueiredo LC. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers Med Sci*. 2012 Mar;27(2):389-95.

CONCLUSÃO

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

1. A terapia fotodinâmica apresenta resultados in vitro e in vivo promissores;
2. A Terapia fotodinâmica com hipericina, tanto como monoterapia quanto como terapia adjunta à raspagem e alisamento radicular para o tratamento de periodontite in vivo foi tão eficiente quanto o tratamento mecânico;
3. A TFD-HY pode ser um tratamento auxiliar da doença periodontal porém novos estudos in vitro e in vivo devem otimizar os parâmetros da técnica a fim de definir protocolos mais eficientes que justifiquem a indicação do uso deste fotossensibilizador perante outros já estabelecidos na literatura.

REFERÊNCIAS

5 REFERÊNCIAS¹

1. 1999 International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions [Papers]. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1): 1-112.
2. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34(3):221-41.
3. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2007; 78(3): 566-75.
4. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol.* 2008; 79(6): 1081-8.
5. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2010; 81(1): 4-14.
6. Badersten A, Niveus R, Egelberg J. 4-year observations of basic periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 1987; 14(8): 438-44.
7. Baelum V, Lopez R. Periodontal epidemiology: towards social science or molecular biology? *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004; 32(4): 239-49.
8. Berkstein S, Reiff RL, McKinney JF, Killoy WJ. Supragingival root surface removal during maintenance procedures utilizing an air-powder abrasive system or hand scaling. An in vitro study. *J Periodontol.* 1987; 58(5): 327-30.
9. Bottura PE, Milanezi J, Fernandes LA, Caldas HC, Abud-Filho M, Garcia VG, et al. Nonsurgical periodontal therapy combined with laser and photodynamic therapies for periodontal disease in immunosuppressed rats. *Transplant Proc.* 2011; 43(5): 2009-16.
10. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(10): 877-84.
11. Caton JG. Overview of clinical trials on periodontal regeneration. *Ann Periodontol.* 1997; 2(1): 215-22.
12. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2003;18(1): 51-5.
13. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korblik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90(12): 889-905.
14. Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg.* 2002; 20(1): 3-7.
15. Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci.* 2010; 9(3): 365-9.
16. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med.* 1998; 22(5): 281-7.
17. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res.* 2009; 44(6): 751-9.

* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

18. Garcia VG, Gualberto Junior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casatti CA, et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in ovariectomized rats. *J Periodontol.* 2013; 84(4): 556-65.
19. Garcia VG, Longo M, Fernandes LA, Gualberto EC, Jr., Santinoni Cdos S, Bosco AF, et al. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(1): 143-50.
20. Ge L, Shu R, Li Y, Li C, Luo L, Song Z, et al. Adjunctive effect of photodynamic therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(1): 33-7.
21. Gootz TD. The global problem of antibiotic resistance. *Crit Rev Immunol.* 2010; 30(1): 79-93.
22. Goulart Rde C, Thedei G, Jr., Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28 Suppl 1: S85-90.
23. Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(4): 1113-25.
24. Hager B, Strauss WS, Falk H. Cationic hypericin derivatives as novel agents with photobactericidal activity: synthesis and photodynamic inactivation of *Propionibacterium acnes*. *Photochem Photobiol.* 2009; 85(5): 1201-6.
25. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(5): 436-50.
26. Hayek RR, Araujo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol.* 2005; 76(8): 1275-81.
27. Herrera D, Alonso B, Leon R, Roldan S, Sanz M. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(8 Suppl): 45-66.
28. Inada NM, Costa MM, Guimaraes OC, Ribeiro Eda S, Kurachi C, Quintana SM, et al. Photodiagnosis and treatment of condyloma acuminatum using 5-aminolevulinic acid and homemade devices. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012; 9(1): 60-8.
29. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(5): 468-81.
30. Karioti A, Bilia AR. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2010; 11(2): 562-94.
31. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(7): 755-67.
32. Kiesslich T, Krammer B, Plaetzer K. Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy [Review]. *Curr Med Chem.* 2006; 13(18): 2189-204.
33. Komerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006; 25(1-2): 487-504.
34. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86(8): 694-707.

35. 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.* 2011; 46(1): 89-96.
36. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B.* 1992; 14(3): 262-6.
37. Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(10): 885-96.
38. Melo WCMA, Carto LF, Dalmas RMMTS, Perussi JR. Effectiveness of photodynamic therapy on Gram-negative bacteria. In: Mendez-Vilas A, editor. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* Badajoz, Spain: Formatex Research Center; 2011. 6 p.
39. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985; 5(1): 31-9.
40. Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown SB. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(3): 522-7.
41. Mortensen T, Shen S, Shen F, Walsh MK, Sims RC, Miller CD. Investigating the effectiveness of St John's wort herb as an antimicrobial agent against mycobacteria. *Phytother Res.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012; 26(9): 1327-33.
42. Nagata JY, Hioka N, Kimura E, Batistela VR, Terada RS, Graciano AX, et al. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012; 9(2): 122-31.
43. Nakajima N, Kawashima N. A basic study on hypericin-PDT in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012; 9(3): 196-203.
44. Novaes AB, Jr., Schwartz-Filho HO, de Oliveira RR, Feres M, Sato S, Figueiredo LC. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(2): 389-95.
45. de 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.* 2007; 78(6): 965-73.
46. Oliveira GJ, Theodoro LH, Marcantonio Junior E, Sampaio JE, Marcantonio RA. Effect of Er,Cr:YSGG and Er:YAG laser irradiation on the adhesion of blood components on the root surface and on root morphology. *Braz Oral Res.* 2012; 26(3): 256-62.
47. O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med.* 2002; 31(2): 86-90.
48. Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microorganismos. *Química Nova.* 2007; 30(4): 988-94.
49. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol.* 2004; 75(10): 1343-9.

50. Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, Franca CM, Cai S, Mayer MP, et al. 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.* 2011; 29(12): 835-44.
51. Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2008; 43(2): 162-7.
52. Ribeiro AP, Andrade MC, da Silva Jde F, Jorge JH, Primo FL, Tedesco AC, et al. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. *Photochem Photobiol.* 2013; 89(1): 111-9.
53. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(2): 669-82.
54. Sharma KV, Davids LM. Hypericin-PDT-induced rapid necrotic death in human squamous cell carcinoma cultures after multiple treatment. *Cell Biol Int.* 2012; 36(12): 1261-6.
55. Shibli JA, Martins MC, Nociti FH, Jr., Garcia VG, Marcantonio E, Jr. . Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol.* 2003; 74(3): 338-45.
56. Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio EJ. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Sci.* 2003; 45(1): 17-23.
57. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod.* 2006; 32(10): 979-84.
58. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011; 55(1): 143-66.
59. Stupakova V, Varinska L, Mirossay A, Sarissky M, Mojzis J, Dankovcik R, et al. Photodynamic effect of hypericin in primary cultures of human umbilical endothelial cells and glioma cell lines. *Phytother Res.* 2009; 23(6): 827-32.
60. Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP, et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(4): 687-93.
61. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(5): 412-8.
62. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(4): 680-4.
63. Yow CM, Tang HM, Chu ES, Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(3): 626-32.
64. Zanin IC, Goncalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(2): 324-30.

APÊNDICES

6 APÊNDICES

Apêndice 1 – MATERIAL E MÉTODO

COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, dentro dos regulamentos exigidos pelo CONSEA, sob nº CEEA 21/2009.

AMOSTRA

Neste estudo foram utilizados 84 ratos (*Rattus Norvegicus*), variação *albinus*, *Holtzman*, adultos, com peso variando entre 200-250g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) - UNESP. Os animais foram mantidos no Biotério da FOAr em gaiolas individuais e tratados com água e ração *ad libitum* antes e durante todo o período experimental, mantidos em ambiente com luz e temperatura controladas. Todos os animais serviram como amostras para as análises de histometria, microCT e imunohistoquímica.

INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 2:1, respectivamente (0,08 ml/100g de massa corporal - Cloridrato de Quetamina e 0,04 ml/100g massa corporal de Cloridrato de Xilazina). Posteriormente, os ratos foram colocados em posição supina na mesa operatória. Para ganhar livre acesso aos dentes da região posterior da maxila, a boca dos animais foi retraída por um retrator para afastar queixo e língua, facilitando a

abertura bucal. Ligaduras (fios de algodão nº24) foram inseridas através de sonda e pinça específicas na região subgengival em volta dos segundos molares superiores (bilateralmente) para que a doença periodontal fosse induzida através do acúmulo de placa bacteriana. Após um período de sete dias, as ligaduras foram removidas e os tratamentos realizados, conforme a figura 3.

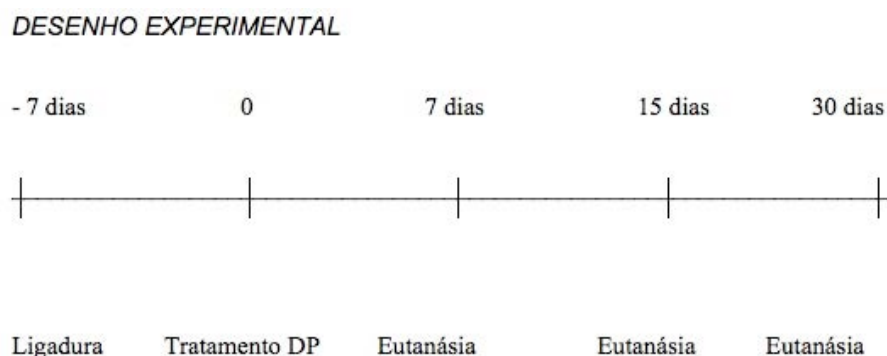


Figura 3. Desenho experimental do estudo

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos randomicamente em quatro grupos, avaliados em três períodos experimentais (7, 15 e 30 dias após o tratamento da doença periodontal), conforme a Quadro I:

Quadro 1. Animais utilizados nos grupos experimentais.

	7 dias	15 dias	30 dias	
GRUPO I	7	7	7	21
GRUPO II	7	7	7	21
GRUPO III	7	7	7	21
GRUPO IV	7	7	7	21
TOTAL	28	28	28	84

ESPECIFICAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram randomicamente distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

1. Grupo I: CONTROLE POSITIVO DA DP (C)

Não houve tratamento após a remoção das ligaduras.

2. Grupo II: RASPAGEM (RAR)

Raspagem e alisamento radicular manual supra e subgingival com auxílio de curetas específicas (Gracey mini-five 7/8, 11/12, 13/14, Hu-Friedy), englobando toda a superfície vestibular e lingual.

3. Grupo III: TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) = FS + LED

Primeiramente aplicou-se o FS e, depois, o LED.

4. Grupo IV: RASPAGEM + TFD (RAR+TFD)

Associação dos tratamentos dos grupos II e III. Primeiramente realizou-se a RAR, depois a TFD foi realizada.

PREPARO DO FOTOSSENSIBILIZADOR (HIPERICINA)

A hipericina usada neste estudo foi extraída e preparada na Universidade Geral do ABC (UFABC), pela supervisão do Prof. Dr. Anderson Orzari Ribeiro. Por sua vez, a hipericina estoque foi obtida no Laboratório de Fotossensibilizadores do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, em São Carlos (IQSC-USP), gentilmente cedida pela Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi.

Uma vez que hipericina é muito pouco solúvel em solução aquosa, a solução estoque de hipericina foi preparada em solvente apolar, dimetil sulfóxico (DMSO) na concentração de 1 mg/mL e esterelizada por filtração à vácuo em membrana Millipore com poro de 0,22 µm. A solução foi mantida ao abrigo de luz a 4°C. A

concentração de hipericina empregada nos experimentos foi de 10 µg/mL, concentração em que não ocorre agregação. Para isso, a solução estoque foi diluída em balão volumétrico com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH=7,4, sempre no escuro, dentro do fluxo laminar e colocada em recipiente escuro estéril e com proteção de papel de alumínio para evitar a entrada de luz e possível degradação. Nessa concentração, a concentração final de DMSO é de 1%, portanto, não causa danos celulares.

APLICAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR (TEMPO DE INCUBAÇÃO)

Para realização da TFD, a hipericina foi inserida dentro do sulco gengival com ajuda de uma seringa com agulha de ponta romba por todas as faces dos segundos molares superiores. O tempo de incubação dentro da bolsa periodontal foi de cinco minutos e o animal foi mantido no escuro durante este período para evitar a fotoativação do fotosensibilizador.

FONTE DE LUZ UTILIZADA (LED AMARELO)

Um LED amarelo em formato de caneta fotopolimerizadora foi desenvolvido pelo Grupo de Ótica do CEPOF (Centro de Pesquisa em Ótica e Fotônica, do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo - IFSC, USP) sob a coordenação do Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato. As características do LED utilizado são:

Comprimento de onda: 550-630nm

Pico de absorção máximo: 593-594nm

Área: 0,785 cm²

Diâmetro da ponta: 1 mm

Densidade de potência: 115 mW/cm²

APLICAÇÃO DA LUZ (TEMPO DE IRRADIAÇÃO)

Para a TFD, após a incubação do fotossensibilizador, a fonte de luz LED foi aplicada sobre a oclusal dos segundos molares a serem tratados, ficando 4 minutos sobre esta superfície. A aplicação da luz foi feita num único momento, simulando uma única aplicação clínica da TFD.

Deste modo, a fluência de energia (FE) da luz utilizada, por dente tratado com luz, foi de 35,15 J/cm², de acordo com a seguinte equação:

FE (J/cm²) = P x t / A , onde:

P = Potência (W); T = Tempo (s); A = Área (cm²), onde:

A = $\pi \cdot R^2$, onde:

R = raio.

Assim, aplicando-se os valores conhecidos, obtém-se:

$$FE = 0,115 \times t \times 60 / 0,785$$

$$FE = 35,15 \text{ J/cm}^2$$

OBTENÇÃO DAS PEÇAS CIRÚRGICAS

Após os períodos correspondentes os animais foram sacrificados com sobredose anestésica. As maxilas foram divididas em hemimaxilas, onde cada lado foi randomicamente separado para histologia e imunohistoquímica ou para microCT. Deste modo, as hemimaxilas para análise histométrica e imunohistoquímica foram removidas preservando-se os tecidos moles e fixadas em paraformol tamponado a 4% por um período máximo de 48 horas. As demais hemimaxilas tiveram o tecido ósseo armazenado em água oxigenada 10%, por 48 h, para remoção dos tecidos

moles restantes. Seqüencialmente, as peças foram transferidas para álcool 70% para posterior análise por microCT.

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após o período de 48 h em paraformol, as peças destinadas à análise histométrica e imunohistoquímica foram colocadas em solução de EDTA para descalcificação por um período de 2 meses, com três trocas semanais. Posteriormente as peças foram lavadas e desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafinizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes histológicos foram confeccionados com 4 μm de espessura, de maneira seriada e no sentido mésio-distal ao longo eixo do dente, num micrótomo rotatório manual e automático (Leica). Após adesão dos cortes em estufa por uma hora, os mesmos foram desparafinizados, rehidratados e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Imagens foram analisadas utilizando um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) com objetiva para aumento de 4.0/10 vezes, captadas com o auxílio de uma câmera de vídeo DXC-1107A/107AP (Sony Eletronics Inc, Japão) e enviadas para um microcomputador.

A avaliação histométrica foi realizada na região de furca, utilizando um software analisador de imagens (Image J). Os valores para a extensão de perda óssea para a área óssea original foram obtidos em μm e μm^2 , respectivamente, de acordo com César-Neto et al. 2006. Posteriormente estes valores foram transformados em percentagem de formação óssea. A avaliação foi realizada em

triplicata por um examinador treinado e cego para os grupos experimentais. As imagens positivamente marcadas por TRAP foram consideradas onde osteoclastos ao redor do osso na área de furca apresentavam mais de dois núcleos. A marcação por RANKL foi avaliada na mesma área, de acordo com as intensidades elaboradas por Garcia ET al. 2012, onde: nenhuma marcação (0%), pouca/fraca marcação (<25% células), marcação moderada (<50%) e intensidade forte (>50% células).

ANÁLISE TRIDIMENSIONAL POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA

Sete hemi-maxilas por grupo e por período foram escaneadas pelo microCT (SkyScan). O gerador de raio-X operou com os seguintes parâmetros: 50KVp, 500µA, filtro de alumínio com 0.5mm e resolução de imagem de 12.45µm. As imagens tridimensionais foram reconstruídas em software específico e imagens foram salvas em cortes sagitais (2000 x 1336). As mensurações volumétricas foram realizadas após seleção de imagem de interesse em 3-D (ROI) com o programa CTan. O ROI foi delimitado pela raiz mesial do 3º molar e raiz distal do 1º molar, já que a periodontite induzida a ser observada se encontrava na área de furca dos 2ºs molares. Após esta delimitação, os contornos do ROI foram desenhados em intervalos regulares a cada 10 *slices*, gerando máxima quantificação de osso alveolar. todos os contornos começaram pela junção cimento-esmalte (JCE), movendo 3mm na direção apical. Assim, toda área interproximal e de furca do 2º molar foi envolvida pelo ROI. Finalmente, com a imagem 3-D, os índices foram calculados com valores de ROI binarizados. O parâmetro aquitetônico avaliado foi valor de osso fracionado (BVF) que representa o volume de tecido mineralizado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação histométrica e por microCT, os dados foram analisados por Shapiro Wilk para verificar a distribuição dos mesmos pelo teorema central de distribuição. Após verificação da normalidade dos dados, o teste paramétrico ANOVA foi realizado e complementado pelo teste de Tukey para avaliação dos dados entre grupos. Ainda, para a análise histométrica, o teste t-pareado foi realizado intra grupo para verificar diferenças entre os períodos analisados. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPrism 5.0. Todos os testes foram aplicados num intervalo de confiança de 95% ($p < 0.05$).

AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

Foi empregado o método de imunohistoquímica para detecção e localização da expressão das proteínas ligadas à reabsorção óssea: ligante do ativador do receptor de fator kappa B nuclear (RANKL) e fosfatase alcalina resistente ao tartarato (TRAP). Cortes histológicos seriados com 4 μ m de espessura foram montados em lâminas silanizadas (Dako), seguido de tramitação laboratorial de rotina para desparafinização e rehidratação. Em seguida, os cortes foram tratados pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) com a utilização do kit ABC Staining System (Dako) seguindo as instruções do fabricante. Anticorpos primários anti-RANKL e TRAP (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) de rato tiveram diluição otimizada em 1:200. Como controle negativo os anticorpos primários foram omitidos. Os cortes foram corados com solução de hematoxilina de Carrazi por 45 segundos para visualização dos núcleos. A intensidade e localização de células positivamente marcadas foram registradas por um examinador cego para os grupos experimentais.

ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEEA nº 21/2009

Araraquara, 15 de dezembro de 2009

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 14/12/2009, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica com hipericina no tratamento da doença periodontal. Estudo em ratos" (Proc. CEEA nº 21/2009) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para ABRIL/2014.

Atenciosamente.

Profª Drª ELENY ZANELLA BALDUCCI
Coordenadora do CEEA

À
Profª Drª ROSEMARY ADRIANA CHIÉRICI MARCANTONIO
DD. Pesquisadora Responsável
a/c Lívia Rodrigues Perussi e Janice Rodrigues Perussi
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Anexo B – Documentos Comprobatórios

Anexo B.1 – Comprovante de submissão e revisão do artigo submetido ao *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, Capítulo 1 deste trabalho



Expert Reviews Ltd: Peer Review Paper

1 Review article for *Expert Review of Anti-infective Therapy*

2 **Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn**
3 **infection**

4 **ABSTRACT**

5 Microbial biofilms are defined as accumulations of microbial cells embedded within a polymeric
6 matrix, typically comprising exopolysaccharide (EPS) that together form a complex community.
7 These communities of microorganisms in biofilms have been found to be responsible for a wide
8 variety of microbial infections in different parts of the body such as: urinary tract infections,
9 catheter infections, middle-ear infections, gingivitis, caries, periodontitis, orthopedic implants
10 and so on. The microbial cells growing in a biofilm have properties and gene expression

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 08 de maio de 2013.

LIVIA RODRIGUES PERUSSI VALVERDE