



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



SÂMARA CRUZ TFAILE CORBI

**Avaliação dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica
Antimicrobiana com o Fotossensibilizador
Ftalocianina-Glucamina como Terapia Adjunta
no Tratamento da Doença Periodontal Induzida
em Ratos**

Araraquara

2014



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



SÂMARA CRUZ TFAILE CORBI

**Avaliação dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica
Antimicrobiana com o Fotossensibilizador
Ftalocianina-Glucamina como Terapia Adjunta no
Tratamento da Doença Periodontal Induzida em
Ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para o título de Mestre em Odontologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

Araraquara

2014

Corbi, Sâmara Cruz Tfaile.

Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana com o fotossensibilizador ftalocianina-glucamina como terapia adjunta no tratamento da doença periodontal induzida em ratos / Sâmara Cruz Tfaile Corbi - Araraquara: [s.n.], 2014.

75 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

1. Doenças periodontais 2. Fotoquimioterapia 3. Microtomografia por Raio-X I.Título

SÂMARA CRUZ TFAILE CORBI

**Avaliação dos Efeitos da Terapia
Fotodinâmica Antimicrobiana com o
Fotossensibilizador Ftalocianina-Glucamina
como Terapia Adjunta no Tratamento da
Doença Periodontal Induzida em Ratos**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

2º Examinador: Prof. Dr. Marcio Zaffalon Casati

3º Examinador: Profa. Dra. Letícia Helena Theodoro

Araraquara, 24 de Março de 2014

DADOS CURRICULARES

Sâmara Cruz Tfaile Corbi

NASCIMENTO

10 de Outubro de 1986

FILIAÇÃO

Sálua Cruz Tfaile

Jeferson Luis Corbi

2007/2011

Curso de Graduação em Odontologia pela
Faculdade de Odontologia de Araraquara –
UNESP

2012/2014

Curso de Pós-Graduação em Odontologia,
área de concentração em Periodontia, nível
de Mestrado, na Faculdade de Odontologia
de Araraquara – UNESP

Dedico este trabalho aos meus pais Sálua e Jeferson e
à minha irmã Sâmia, pela inspiração de todo dia e a vontade de vencer na vida.

Agradeço primeiramente a **Deus**, por colocar pessoas certas e especiais na minha vida. Pela sabedoria, força e amparo.

Aos meus pais **Sálua e Jeferson**, que me propiciaram uma vida digna, onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros e de caráter e tendo a convicção de que desistir nunca seja uma ação contínua em nossas vidas; que sonhar e concretizar os sonhos só dependerá da nossa vontade. Em especial, agradeço minha mãe por ser um exemplo de vida, guerreira e batalhadora; que me mostra sempre os melhores caminhos, que me dá os conselhos certos, que me ensina a ser sensata e que diariamente me faz perceber quão abençoada e privilegiada eu sou.

À minha irmã **Sâmia**, pelo incessante estímulo, incentivo, exemplo, experiência, enorme compreensão e companheirismo, com quem compartilhei todos os momentos e que tem sido uma constante bênção em minha vida.

À amiga e minha orientadora **profa. Adriana Marcantonio**, a quem dedico admiração, gratidão e respeito; quem me ensinou os primeiros passos da pesquisa científica. Pela influência, direcionamento, grande amizade, apoio e eterna paciência. E por compartilhar comigo seu tempo e conhecimento.

À minha **Tia Salma** (*in memoriam*), que em vida sempre apoiou as minhas decisões, me incentivou a fazer tudo o que eu tinha vontade, mostrou os caminhos do bem e me ensinou que bondade e caridade podem vir de pequenos gestos. Agradeço por compartilhar comigo tantos sonhos, conversas, conselhos, tempo e risadas. Sinto muito sua falta.

Agradeço aos meus familiares, em especial aos meus avós **Aparecida** e **Geraldo** e a minha **Tia Samira** e **Tio Mehesen**, por entenderem minha ausência, falta de tempo e as visitas rápidas. Pelo apoio de sempre e o incentivo de continuar meu caminho com força de vontade e fé no futuro.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Molecular: **Suzane Pigossi**, **Rafael Nepomuceno**, **Giovana Anovazzi**, **Guilherme Braido**, **Fabiano Jeremias**, **Márcia Tanaka**, **profa. Raquel Caminaga** e **profa. Ticiane Capote** pelos momentos de diversão, alegria, risos e descontração.

À minha amiga especial: : **Livia Finoti**, minha 'segunda' irmã, pela companhia divertida de sempre, pelas risadas, momentos engraçados, força, incentivo e apoio em todas as horas e por me ensinar e ajudar na estatística deste trabalho, assim como as referências, com o EndNote!

Aos meus amigos de Mestrado: **Lígia Barbosa**, **Paula Macedo**, **Jackeline Tsurumaki**, **Cássio Rocha**, **Fernanda Florian**, **Fabiana Curylofo**, **Vinícius Paiva**, **Haline Carneiro**, **Adriana Cabrera**, **Patricia Maquera**, **Vinícius Ibiapina**, **Lélis Nícoli** e **Elton Pichotano**, por todos os momentos de aprendizados que passamos juntos.

Às amigas de Doutorado: **Chaine Pavone, Andressa Vilas Boas, Tetê Bedran, Michele Pinheiro e Sabrina Fransnelli**, pelas reuniões, jantares e risadas sempre garantidas quando nos encontramos.

Aos mestres e amigos: **Rubens Spin-Neto**, pelos ensinamentos desde minha iniciação científica e a quem tenho grande admiração e **Guilherme Oliveira**, pela paciência, explicações, dicas e por sempre estar acessível e à disposição para tirar dúvidas e sugerir ideias.

Às minhas amigas de graduação: **Renata Francisconi**, minha eterna dupla de atendimento, pelas conversas, horas de estudos, conhecimentos compartilhados e bons momentos vividos e **Priscila Oliveira**, a quem admiro muito, pela calma presente nos momentos de estresse, grande amizade, carinho, enorme paciência e por me ajudar em cada detalhe da análise histológica deste trabalho.

Aos meus amigos de encontro mensais: **Marina Manduca, Alessandro Alavarce, Aylan Kener, Bruna Bolsoni, Adriano Felicio e Fernando Pavaneli**, pelas tardes de brincadeiras, jogos, gargalhadas e muito conhecimento inútil.

Às minhas amigas do colegial: **Mariana Rozatto e Michele Valila**, pela amizade de sempre, apoio, conselhos, descobertas, cumplicidade e simplesmente por estarem na minha vida após tantos anos.

Aos amigos e funcionários que me ajudaram na realização deste trabalho: **Adriano**, no incansável trabalho no biotério; **Luana**, no escaneamento das imagens do micro-CT; **Claudinha** e **Leandro**, pela enorme paciência nos procedimentos laboratoriais; **Isa** e **Zezé** na organização e funcionamento das clínicas de Periodontia. E também **D.**

Maria do Rosário, Ester, Regina Lúcia, Thelma e Toninho.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP)**, na pessoa de sua Diretora, **Profa. Dra. Andreia Affonso Barretto Montandon**, e da Vice-Diretora, **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

À **profa. Janice Rodrigues Perussi**, ao **prof. Anderson Ribeiro de Oliveira** e **Cláudia Bernal**, que elaboraram e cederam o fotossensibilizador ftalocianina-glucamina utilizado neste trabalho.

Ao **prof. Paulo Cerri**, que gentilmente cedeu o laboratório de histologia e os equipamentos para a captura de imagens e realização da análise histológica deste trabalho.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, **Prof. Dr. Carlos Rossa Jr.**, e a todos os docentes da disciplina de Periodontia, pela excelente formação, dedicação, competência e empenho em suas atividades.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara e José Alexandre**, pela gentileza, paciência e por sempre solucionarem dúvidas!

Aos funcionários da Biblioteca, **Marley, Eliane, Adriano, Maria Inês, Disleide, Ceres Ana Cristina, Denise, Laudicélia e Maria Aparecida**, pela atenção e correção desta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**, por conceder bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**, pelo auxílio pesquisa e pela utilização do equipamento de micrótomo computadorizado desta faculdade, processo: 2009/54080-0.

MUITO OBRIGADA!

O que é sucesso:

Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu.

Isto é ter sucesso!

Rafph Waldo Emerson

Corbi SCT. Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana com o fotossensibilizador ftalocianina-glucamina como terapia adjunta no tratamento da doença periodontal induzida em ratos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

Resumo

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aTFD), é uma terapia que utiliza fonte de luz e fotossensibilizador (FTS) na fotoinativação de microrganismos. O objetivo deste trabalho foi avaliar, in vivo, respostas teciduais da aplicação da aTFD utilizando ftalocianina-glucamina, cujo pico de absorção coincide com o comprimento de onda da cor vermelha, no tratamento da doença periodontal (DP) induzida em ratos, pelas avaliações: microtomográfica, histométrica e histológica. Ligaduras foram inseridas nos sulcos dos segundos molares superiores para indução da DP. Os animais foram distribuídos em 4 grupos: GI: DP (Somente indução da doença, sem tratamento); GII: RAR (Indução e tratamento básico periodontal); GIII: TFD (Indução e aplicação da terapia fotodinâmica); GIV: RAR+TFD (Indução, aplicação da terapia fotodinâmica e tratamento básico periodontal). Após 15 dias, as ligaduras foram removidas e os animais eutanaziados após 7, 15 e 30 dias do tratamento. Como todos os dados apresentaram-se normais (Kolmogorov-Smirnov), aplicou-se o teste paramétrico ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey. Na histometria, não encontraram diferenças estatísticas; a análise microtomográfica mostrou diferenças significantes em todos períodos para o grupo TFD nas proximais e região de furca, assim como o grupo RAR+TFD. No período de 30 dias, entre os grupos DP e TFD na região de furca, como também em 7 dias, além dos grupos DP e RAR+TFD; na histologia, mostrou que não houve danos aos tecidos. Pode-se concluir que a aTFD com ftalocianina-glucamina foi efetiva tanto quanto a RAR no

tratamento da DP induzida, porém mais estudos são necessários para elucidar os efeitos deste fotossensibilizador na aTFD.

Palavras-chave: Doenças periodontais, fotoquimioterapia, microtomografia por raio-X

Corbi SCT. Antimicrobial photodynamic therapy effects of phthalocyanine-glucamine photosensitizer as adjunct therapy on induced periodontal disease treatment in rats [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

Abstract

Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) is a therapy which uses a light source and photosensitizer (PS) in the microorganisms photoinactivation. The aim of this study was to evaluate, *in vivo*, tissue response application of aPDT using phthalocyanine-glucamine, with its peak absorption spectrum of color in red wavelength, in the treatment of induced PD in rats, by the microtomographic, histometric and histological analyses. Ligatures were inserted into the grooves of the upper second molars to induce PD. The animals were divided into 4 groups: GI: PD (only induction of PD, no treatment); GII: SRP (Induction and periodontal basic treatment); GIII: PDT (Induction and application of photodynamic therapy); GIV: SRP+PDT (induction, application of photodynamic therapy and periodontal basic treatment). After 15 days, the ligatures were removed and the animals were euthanized after 7, 15 and 30 days of treatment. Since all data were normal (Kolmogorov-Smirnov test), we used the parametric test ANOVA followed by Tukey post-test. Histometric, no differences were found; microtomographic, showed significant differences in all periods for the PDT group in the proximal and furcation area, as well as the SRP+PDT group. In the period of 30 days between PD and PDT groups in the furcation region as well as in 7 days, in addition to the PD and SRP+PDT groups; histological, showed no tissue damage. It can be concluded that the aPDT with phthalocyanine-glucamine was effective as much as the SRP in treatment induced PD, but more studies are needed to elucidate the effects of this PS in aPDT.

Keywords: Periodontal Disease, photochemotherapy, computadorized
microtomography

Lista de Abreviaturas e Nomenclaturas

DP – Doença Periodontal

RAR – Raspagem e Alisamento Radicular

TFD – Terapia Fotodinâmica

aTFD – Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

FTS – Fotossensibilizador

O₂ – Oxigênio molecular

ROS – Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas do Oxigênio)

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

•OH – Hidroxila

•O₂⁻ – Superóxido

¹O₂ – Oxigênio singlete

DNA – Ácido desoxirribonucléico

LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)

LED – Light Emitting Diode (Diodo Emissor de Luz)

FDA – Food and Drug Administration (Administração de Comida e Remédio)

FC – Ftalocianina

FCZn – Ftalocianina de Zinco

FtZnTc – Ftalocianina de Zinco Tetra-carboxilada

FtZnTcG – Ftalocianina de Zinco Tetracarboxi-N-metilglucamina

FOAr – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

CEUA – Comissão de Ética de Uso Animal

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

mL – Mililitros

mL/g – Mililitro/grama

mg/mL – Miligrama/mililitro

µg/mL – Micrograma/mililitro

nm – Nanômetro

W – Watts

W/cm² – Watts/centímetro quadrado

J/cm² – Joules/centímetro quadrado

EDTA – Ácido Etineldiaminotetraédico-Acético

DMSO – Dimetilsulfóxido

pH – Potencial Hidrogênionico

µm – Micrômetro

µm² – Micrômetro quadrado

mm – Milímetro

mm² – Milímetro quadrado

HE – Hematoxilina/Eosina

Al – Alumínio

KV – Quilovolt

µA – Microampère

ROI – Região de Interesse

JCE – Junção Cimento-Esmalte

µCT – Microtomografia Computadorizada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
3	PROPOSIÇÃO	32
4	MATERIAL E MÉTODO	33
4.1	Comitê de Ética	33
4.2	Amostra	33
4.3	Indução da Doença Periodontal	33
4.4	Desenho Experimental	34
4.5	Preparo do Fotossensibilizador (FTS) - TFD	35
4.6	Fonte de Luz	35
4.7	Técnica de Aplicação do Fotossensibilizador	36
4.8	Especificação dos Grupos Experimentais	36
4.9	Obtenção das Peças Cirúrgicas	37
4.10	Análise Radiográfica Tridimensional (μCT)	37
4.11	Processamento Histológico	39
4.12	Análise Histométrica	40
4.13	Análise Histológica	42
4.14	Planejamento Estatístico	42
5	RESULTADO	43
5.1	Radiografia Tridimensional (μCT) – Proximais	43
5.2	Radiografia Tridimensional (μCT) – Furca	45

5.3	Histometria – Proximais	46
5.4	Histometria – Furca	47
5.5	Análise Histológica	48
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	62
8	REFERÊNCIAS	63
9	ANEXO	77

1 INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal (DP) é uma doença inflamatória multifatorial, de natureza polimicrobiológica, episódica e sítio-dependente, que se desenvolve quando ocorre a quebra do equilíbrio existente entre resposta do hospedeiro e desafio microbiano ^{4, 79}. Assim, a DP é resultado das interrelações dos fatores modificadores locais e sistêmicos durante o desafio microbiano, associativos ou não, e determinam o processo dinâmico de saúde-doença. Também, é clinicamente caracterizada por inflamação, sangramento à sondagem e pronunciada perda de inserção, cujo fator etiológico primário é constituído pelas bactérias do biofilme oral localizadas na superfície supra e subgingival dos dentes ^{19, 21, 75}.

Baseado neste contexto, a terapia periodontal visa a remoção do biofilme dental, possibilitando o restabelecimento da saúde periodontal ^{75, 97}, a regeneração de tecidos que foram perdidos pela doença, como tecido conjuntivo e osso alveolar ¹³ e a redução dos sinais clínicos de inflamação ⁷⁵.

A raspagem e o alisamento radicular (RAR) são técnicas efetivas no tratamento da DP, entretanto, em alguns casos parece não ser capaz de devolver ou manter a saúde periodontal. Isso pode ser explicado pela permanência ou recolonização de microrganismos ²⁷. Há anatomias dentais complexas e desfavoráveis como regiões de furca, grandes invaginações e concavidades que podem dificultar o acesso mecânico às superfícies dentárias, seja pela localização ou pelo tamanho dos instrumentos utilizados, como também exigir habilidade e tempo do profissional ^{19, 24, 75, 92}.

Deste modo, antibióticos locais e sistêmicos associados ao tratamento convencional vem sendo a opção de escolha de muitos profissionais ^{8, 18, 28, 69, 95}. Entretanto, o uso regular destas substâncias pode causar diversos efeitos colaterais, além de uma possível resistência bacteriana ao medicamento ^{9, 15, 19, 21, 24, 39, 42, 65, 72, 73, 75}.

Assim sendo, parece pertinente a busca por uma nova técnica ou terapia coadjuvante ao tratamento mecânico convencional, que permita maior eficiência no tratamento periodontal e tempo reduzido para eliminação dos contaminantes, exigindo menor esforço por parte do profissional ²⁴, assim como menor desconforto ao paciente e reduzida indicação de cirurgias a retalho ²¹.

A terapia fotodinâmica – TFD (do inglês, *Photodynamic Therapy* - PDT), também chamada de terapia fotodinâmica antimicrobiana (aTFD) por afetar microrganismos, é um novo e próspero tratamento clínico que emprega basicamente a associação de uma tríade: oxigênio, fonte de luz e um agente fotossensibilizador (FTS) ^{51, 57}. Cada um destes fatores isolados não é capaz de causar danos, mas quando combinados produzem agentes citotóxicos letais que podem destruir células seletivamente ⁸².

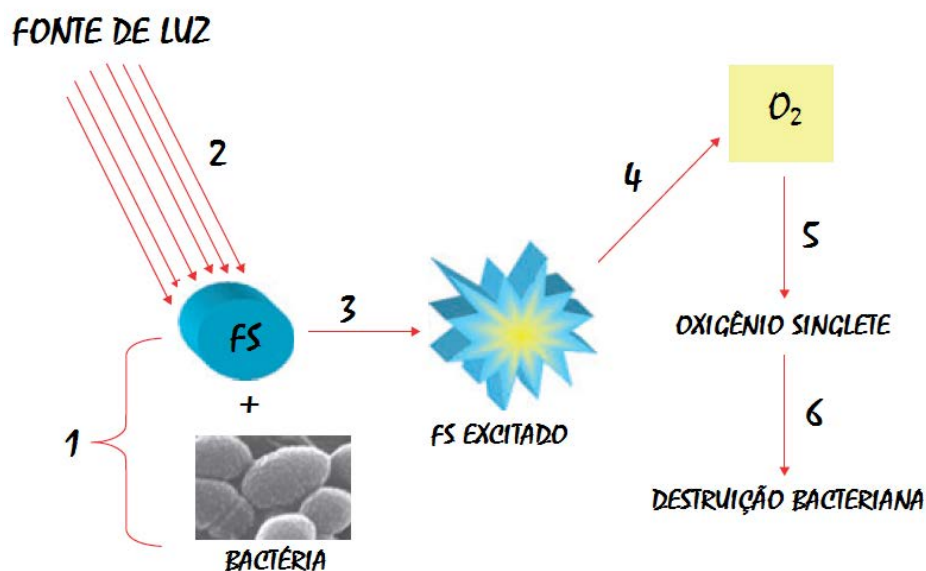
Atualmente, há estudos que têm utilizado a TFD no tratamento da DP experimentalmente induzida, associado ou não a RAR ^{20, 21, 29, 33, 34}.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O mecanismo de ação da TFD é descrito pela excitação de um corante não tóxico, fotossensível e que, irradiado por uma luz visível em uma frequência ressonante com o nível de absorção óptica da referida substância, transfere energia às moléculas circundantes, geralmente, o oxigênio molecular (O_2), e produz espécies altamente reativas (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), como demonstra o esquema da Figura 1. Existem dois tipos de mecanismos consolidados na literatura que justificam o efeito fotodinâmico, descritos como Tipo I e Tipo II. No mecanismo Tipo I, o FTS ativado pode reagir com moléculas vizinhas por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais livres como hidroxila ($\cdot OH$) e superóxido ($\cdot O_2^-$). No mecanismo Tipo II, o FTS ativado reage com moléculas vizinhas por transferência de energia ao oxigênio induzindo a produção do oxigênio singlete (1O_2)²³ e este oxigênio singlete pode modificar as estruturas das membranas plasmáticas ou até mesmo o DNA⁴² e também causar morte celular através de diversos mecanismos, incluindo: peroxidação lipídica, inibição do sistema enzimático, aglutinação proteica e pela reação com outros sistemas biológicos^{4,66}.

O oxigênio singlete é fator intermediário no processo fotodinâmico, sendo o principal responsável pela inativação celular. Em sistemas biológicos, este oxigênio apresenta tempo de vida extremamente baixo ($<0,04\mu s$), e conseqüentemente seu raio de ação também é reduzido ($<0,02\mu m$)⁷⁶. Por conta da limitada difusão do oxigênio singlete, como resultado de sua meia-vida curta, os locais das lesões celulares da terapia fotodinâmica estão relacionados com o local da aplicação do FTS^{60,90}.

Figura 1 – Mecanismo de ação da TFD. O fotossensibilizador é absorvido por microrganismos (1) e seguido de exposição à luz com comprimento de onda adequado (2) torna-se ativado para um estado excitado (3). Então o fotossensibilizador transfere energia da luz para o oxigênio molecular (4) e gera oxigênio singlete e radicais livres (5) que são citotóxicos às células (6) ⁸⁷.



Esta técnica oferece a vantagem de ser altamente seletiva aos microrganismos ou tecido doente, como células cancerígenas ^{39, 72}. Durante a TFD, apenas as células com acumulação seletiva pelo FTS são eliminadas ⁷³. Desta forma, esta terapia pode ser repetida diversas vezes, uma vez que se trata de um procedimento não invasivo que não causa efeitos tóxicos cumulativos. Assim, devido ao seu baixo risco, pode ser aplicada em pessoas debilitadas ou idosos ⁷².

Apesar dos benefícios alcançados pela TFD, alguns estudos revelam as dificuldades em se atingir microrganismos em camadas mais profundas do biofilme oral através da TFD. Porém, esta técnica produz mais morte bacteriana quando comparado ao uso de antibióticos sistêmicos ³¹.

As primeiras fontes luminosas utilizadas em TFD foram lâmpadas convencionais, com luz não-coerente, policromática e forte componente térmico. Com a descoberta e desenvolvimento do LASER (do inglês, *Light Amplification Stimulated*

Emission of Radiation), tornou-se possível o uso de luz homogênea de baixa intensidade para ativar a reação fotodinâmica ¹ e posteriormente a introdução do LED (do inglês, *Light Emitting Diode*) neste processo.

Os LEDs possuem diversas vantagens sobre o laser para o uso clínico: emitem uma combinação de comprimentos de onda ideal para reparo de feridas, podem ser dispostos em arranjos grandes e achatados permitindo irradiação de uma superfície extensa e tridimensional e homogeneidade entre densidade de energia, potência e área de campo irradiado ⁸⁶.

As principais características dos LEDs são: longa durabilidade, baixo custo, circuitos eletrônicos mais simples e confiáveis, não geração de calor, dimensões reduzidas, temperatura de cor (expressa a aparência de cor da luz emitida pela fonte de luz), alta eficiência energética (quase toda energia fornecida para o LED é transformada em luz e uma pequena porção é perdida na forma de calor) ⁸¹.

A luz emitida pelos LEDs é monocromática, não-coerente (emissão estimulada gera fótons que se propagam em diferentes direções no tempo e no espaço), não-colimada (feixe de luz não é unidirecional), menos concentrada que a radiação do laser e mais que a luz comum ⁹¹. Atualmente, há LEDs capazes de emitir luz no modo contínuo e pulsátil ⁹⁹.

Tem sido válido investigar o valor e os benefícios dos LEDs como fonte de luz alternativa para a fototerapia ^{2, 96, 99}. Adicionalmente, como o LED emite pouco calor e em potências ideais consegue obter maior penetração nos tecidos, levando a um mínimo risco de dano térmico ao tecido epitelial, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou o uso de LEDs para testes terapêuticos em humanos.

Entretanto, há poucas evidências sobre o efeito modulatório do LED ^{101, 111}. Com isso, apesar da fototerapia LED ser sugerida para melhorar o processo de reparo de

feridas ^{40, 110}, suas vantagens e benefícios ainda são controversos ⁴⁰. Mais estudos são necessários para consolidar a combinação ideal de comprimento de onda, densidade de energia, potência, bem como trabalhos que avaliem os questionamentos sobre os mecanismos do efeito da luz LED ³ e estudos que investiguem os efeitos biomodulatórios desta luz em relação a luz laser de baixa intensidade nos diversos âmbitos e tecidos biológicos ¹⁷.

Ainda dentro deste contexto, apesar do conceito estabelecido da morte celular induzida pela interação entre a luz e as substâncias químicas, desde o começo do século XX, o interesse por corantes tem aumentado e novas substâncias vêm sendo desenvolvidas em virtude do seu uso no tratamento de tumores e fotoinativação de microrganismos ⁹⁰.

Os fatores que determinam a seletividade dos corantes em células microbianas são: interação eletrostática entre as cargas positivas do corante (ex: azul de metileno) e as cargas negativas da superfície externa da célula microbiana ³⁸. Na maioria dos casos, em bactérias gram-negativas, o sítio primário de ação é a membrana externa, enquanto que nas gram-positivas e fungos é a membrana plasmática da célula-alvo. A ação do FTS envolve a modificação de lipídios e/ou polissacarídeos e a inativação de proteínas e enzimas essenciais, presentes na membrana plasmática, provocando a morte celular ^{38, 93}.

Como a maioria das bactérias orais não absorve luz visível é necessário a utilização de um cromóforo (fotossensibilizador) que se fixe à parede bacteriana, atraindo para si a luz no momento da irradiação ^{105, 107}. O FTS funciona como um agente de absorção óptica e é imprescindível usar um tipo adequado de comprimento de onda de luz para se conseguir a ativação da reação formadora do oxigênio singlete ¹¹.

O FTS ideal para a TFD deve possuir os seguintes requisitos: ser quimicamente puro e de composição conhecida, atóxicos ou de baixa toxicidade, ser biologicamente estável, inativos em seu estado fundamental, ser preferencialmente retido pelo tecido alvo, ser rapidamente excretado pelo corpo (para prover baixa toxicidade sistêmica), ter alta eficiência quântica para o evento fotoquímico, ter forte absorção com um alto coeficiente de excitação na faixa de 600-800nm (onde a penetração de luz no tecido está no máximo) e o comprimento de onda da luz deve permanecer energético o suficiente para produzir o oxigênio singlete ^{1, 25, 30, 45}.

A interação do FTS e o alvo é outro fator de relevância. Nas aplicações tópicas de aTFD, é esperado que o corante una-se ao microrganismo ou até mesmo ultrapasse a membrana citoplasmática, localizando-se no interior da célula ou intercalando-se com o DNA do núcleo. Para que este evento aconteça é necessário um tempo de incubação (pré-irradiação), ou seja, é preciso um tempo entre a aplicação do FTS no alvo e sua ativação pela fonte de luz. A aTFD utiliza tempos que variam de 1 a 10 minutos ⁷⁷.

Na periodontia, o sucesso na eliminação de microrganismos pela TFD, indica-a como uma terapia adjuvante no combate à infecções localizadas, como a DP ^{42, 48, 52}. Estudos *in vitro* ^{15, 80} e *in vivo* ^{4, 9, 16, 21, 24, 49, 50, 74, 75, 84}, analisaram a ação da TFD sobre bactérias periodontopatogênicas que foram expostas a vários FTSs e diferentes comprimentos de onda, resultando em uma ação antimicrobiana efetiva de 99%. Clinicamente, foi observado redução na profundidade de bolsa, nível de inserção clínica e sangramento à sondagem, documentando assim a efetividade da TFD como terapia coadjuvante no tratamento da DP ^{9, 12, 54, 64, 68, 75}.

Os FTSs mais estudados na erradicação de microrganismos pertencem a diferentes grupos de compostos. Na TFD, os principais são: fenotiazínicos (azul de

toluidina e azul de metileno), eritrosina, conjugados de clorina, derivados de hematoporfirinas e fitoterápicos (azulina) ⁹⁸.

Nas últimas décadas, foram desenvolvidos compostos considerados como a segunda geração de corantes, com propósitos diagnóstico e terapêutico, entre os quais está incluída uma das alternativas mais promissoras para a TFD, o grupo das ftalocianinas (FC) ^{10, 102}. Ftalocianinas são corantes sintéticos semelhantes às porfirinas e estruturalmente consideradas azaporfirinas ⁸⁹. São classificadas como FTS de segunda geração, cuja lipofilicidade contribuiria para sua localização nas membranas plasmáticas, nos microsomas e nas mitocôndrias, e, conseqüentemente, para a ação fotodinâmica ⁷⁸. As ftalocianinas de zinco (FCZn) estão entre os sensibilizadores mais promissores deste grupo ^{5, 78, 89}.

A ftalocianina (Figura 2) é um macrociclo simétrico composto por quatro unidades iminoisindol com uma cavidade central de tamanho suficiente para acomodar vários íons metálicos e, este metal central possui influência considerável em sua propriedade fotossensibilizadora (Figura 3) ^{5, 78, 89}. O nome ftalocianina vem de uma combinação do prefixo phthal, originalmente do grego naphtha (óleo de rocha), para enfatizar a associação com seus vários precursores derivados do ácido ftálico, e o grego cyanine (azul) ⁵⁹.

Figura 2 – Estrutura química da ftalocianina.

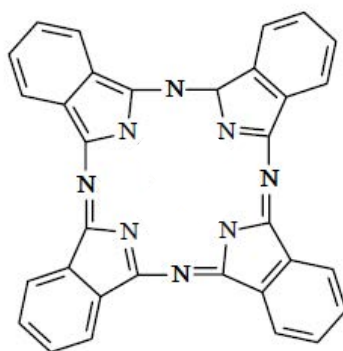
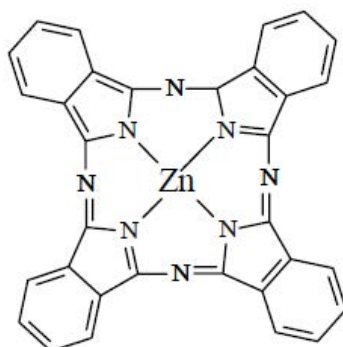


Figura 3 – Estrutura química da ftalocianina acomodando o íon metálico zinco.

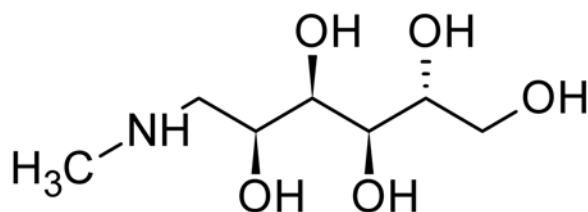


Um fato importante é quanto à hidrofobicidade que alguns fotossensibilizadores apresentam, pois essa propriedade em meio aquoso leva à auto-agregação e em muitos casos a uma subsequente precipitação, o que reduz drasticamente a capacidade do composto de gerar oxigênio singlete ⁸⁵. Desse modo é necessário que o princípio fotoativo apresente-se solúvel em meio aquoso para possível aplicação clínica.

Uma estratégia interessante para aumentar a solubilidade em meio aquoso de alguns FTS envolve a formação de espécies supramoleculares hidrofílicas. Uma supramolécula é definida como uma espécie química constituída por duas ou mais moléculas unidas por interações intermoleculares. Nesse sentido a química supramolecular utiliza uma abordagem centrada na associação de moléculas, visando a obtenção de uma determinada propriedade ou funcionalidade ²².

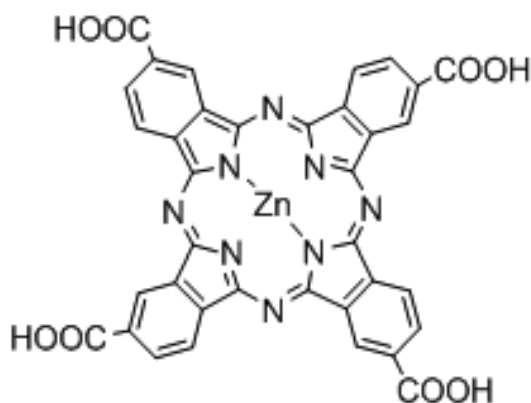
A meglumina, conhecida também como N-metilglucamina (Figura 4) é um aminocarboidrato derivado da glicose capaz de formar espécies supramoleculares binárias hidrofílicas com compostos que possuam em sua estrutura átomos de hidrogênio ácidos ²².

Figura 4 – Estrutura química da meglumina.



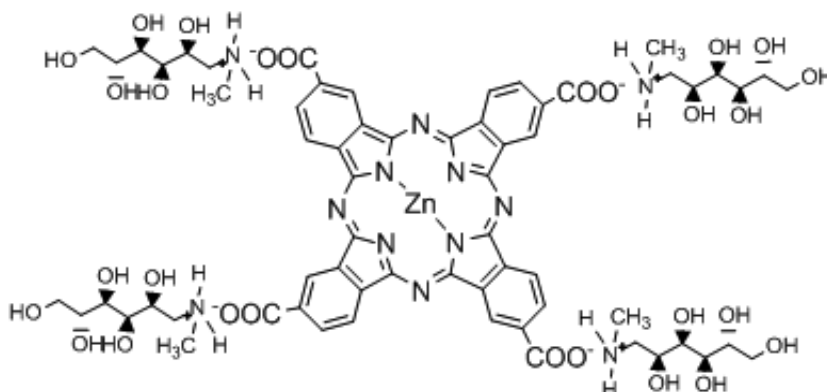
A formação dos compostos de meglumina envolve como condição uma reação ácido-base em que o hidrogênio ácido é transferido ao grupo amina do aminocarboidrato. Para viabilizar a formação de espécies supramoleculares entre a meglumina e as ftalocianinas, estas primeiramente são funcionalizadas com grupos carboxílicos como a ftalocianina de zinco tetracarboxilada (FtZnTc, Figura 5)²².

Figura 5 – Ftalocianina-Zn-tetracarboxilada.



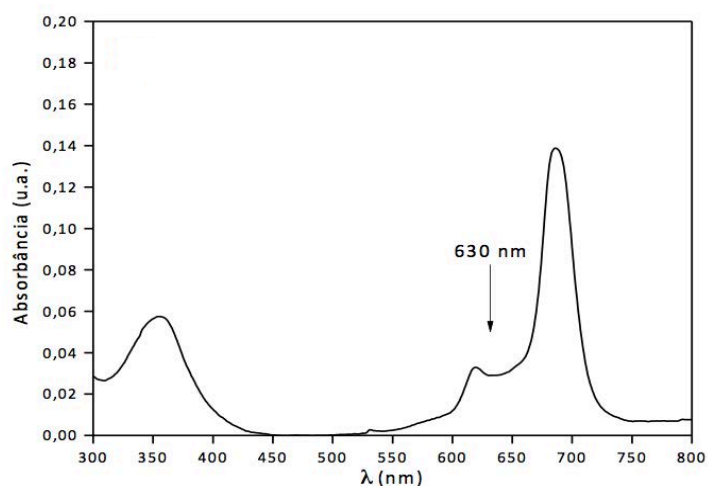
Posteriormente à inserção dos grupos ácidos, a reação com o aminocarboidrato pode ser conduzida produzindo espécies mais solúveis em água. Esse procedimento permite a inserção de até quatro moléculas de meglumina como é observado na Figura 6 para a ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina (FtZnTcG). A presença de vários grupos hidroxila na supramolécula fornece os sítios onde as ligações de hidrogênio são estabelecidas aumentando a hidrofiliabilidade das ftalocianinas²².

Figura 6 – Ftalocianina-Zn-tetracarboxi-N-metilglucamina.



O espectro de absorção das ftalocianinas em solução consiste de duas bandas principais centradas em torno de 350 nm e 670 nm. A Figura 7 ilustra o espectro de absorção molecular da molécula da ftalocianina de zinco tetracarboxilada.

Figura 7 – Espectro de absorção molecular da ftalocianina de zinco tetracarboxilada em DMSO.



Os estudos de Sibata et al.⁸³ (2004); Oliveira et al.⁶⁷ (2006); Dobson, Wilson²⁶ (1992); Wilson et al.¹⁰⁸ (1993); Wilson, Dobson¹⁰⁶ (1993); Wilson (1995)¹⁰⁹ têm

corroborado a eficiência das ftalocianinas como agentes fotossensíveis na eliminação de microrganismos periodontopatogênicos com uso em TFD.

Baseada na literatura atual deste FTS e seu potencial na eliminação de microrganismos, há uma escassez de estudos, principalmente na área de odontologia, que mostra sua efetividade nas respostas teciduais da aplicação da aTFD no tratamento da doença periodontal, e tampouco a colocação desta, em associação à terapia periodontal convencional.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho foi avaliar in vivo, as respostas teciduais da aplicação da aTFD utilizando o FTS ftalocianina-glucamina como terapia adjunta no tratamento da DP induzida em ratos, por meio das avaliações: radiográfica tridimensional (Micro-CT), histométrica e histológica.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Comitê de Ética

O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CEUA no. 07/2012) (Anexo), dentro dos regulamentos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 Amostra

Neste estudo foram utilizados 60 ratos (*Rattus Norvegicus*), variação *albinus*, *Holtzman*, adultos, com peso variando entre 300-330 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) - UNESP. Os animais foram mantidos no Biotério da FOAr, em caixas plásticas coletivas com 5 animais cada, e tratados com água e ração *ad libitum* antes e durante todo o período experimental, mantidos em ambiente com luz, umidade e temperatura controladas.

4.3 Indução da Doença Periodontal

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina (Cloridrato de Quetamina – Francotar 3% – Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda.) com Xilazina (Cloridrato de Xilazina - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda.), na proporção 0,08 ml/100g e 0,04 ml/100g de massa corporal, respectivamente. Logo em seguida, os animais foram colocados em posição supina na mesa operatória e para ter livre acesso aos dentes posteriores da maxila, cada animal teve a boca encaixada em anéis de metal, afastando mandíbula e língua para facilitar a abertura.

Nestes animais, a hemimaxila que recebeu a indução da DP (Figura 8), foi escolhida de forma randômica (direito ou esquerdo). As ligaduras, fios de algodão nº 24, foram inseridas na região subgingival ao redor dos segundos molares superiores com auxílio de sonda e pinça específicas. O nó cirúrgico manteve-se voltado para a face vestibular da boca do animal. Após um período de 15 dias, as ligaduras foram removidas e no dia seguinte, foi aplicado os tratamentos em cada grupo.

Figura 8 – Indução da DP com ligadura.



4.4 Desenho Experimental



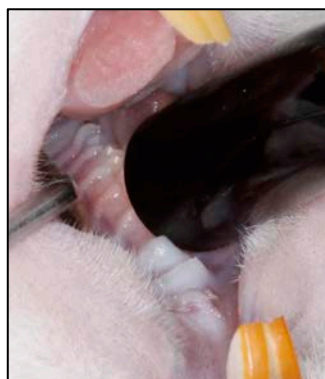
4.5 Preparo do Fotossensibilizador (FTS) - TFD

A ftalocianina-glucomina foi preparada no Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), de acordo com as especificações: foi preparada solução de estoque de zinco-tetracarboxi-ftalocianina na concentração 1,1 mg/mL em DMSO e posteriormente diluída em salina tamponada com fosfato (pH=7,2) para a concentração final de 10 μ g/mL. Logo após o preparo, o FTS foi armazenado em falcons protegidos da luz com papel alumínio e estes, permaneceram em ambiente refrigerado até o momento da aplicação.

4.6 Fonte de Luz

A fonte de luz utilizada para ativar o FTS ftalocianina-glucomina correspondeu ao comprimento de onda de 655 nm, com potência de 0,45W, densidade de potência de 0.47W/cm² e dose de 170,52 J/cm² (LED vermelho, diâmetro 11mm, DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, Brasil), coincidindo com a banda de absorção máxima da ftalocianina-glucomina. O LED foi colocado na face oclusal dos dentes a serem tratados (perpendicular ao longo eixo do dente), ficando 6 minutos em contato com toda a superfície ao redor dos dentes (Figura 9).

Figura 9 – Aplicação da fonte de luz (LED) na face oclusal dos dentes a serem tratados após o tempo de incubação do FTS (10 minutos).



4.7 Técnica de Aplicação do Fotossensibilizador

No momento de aplicação do FTS, o ambiente foi deixado em penumbra e sub luz indireta, o material, que estava acondicionado em um recipiente (falcon) envolto com lâmina de papel alumínio, foi transferido para uma seringa também protegida da luz. A seringa com uma agulha de ponta romba foi posicionada no sulco gengival, com um volume de 0,2 mL. No momento da aplicação, as luzes foram totalmente apagadas e o FTS foi inserido por todas as faces do dente a ser tratado e manteve-se dentro da bolsa periodontal por 10 minutos no escuro (tempo de incubação) e logo após, a luz foi irradiada.

4.8 Especificação dos Grupos Experimentais

No dia seguinte à remoção das ligaduras, os animais foram tratados de acordo com os grupos, composto de 5 animais/grupo/período:

Grupo DOENÇA PERIODONTAL (DP): somente indução da DP, não houve tratamento.

Grupo RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULAR (RAR): os animais foram submetidos à RAR com curetas específicas no 2º molar superior (Gracey mine Five 5-6, HuFriedy).

Grupo TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD): os animais foram submetidos à Terapia Fotodinâmica: Aplicação do FTS dentro do sulco gengival (10 minutos de incubação no escuro) e em seguida, irradiação com LED vermelho (655nm; 450mW; 170,52J/cm²) ao redor do 2º molar superior durante 6 minutos.

Grupo RAR+TFD: os animais foram submetidos à RAR (igual ao tratamento do grupo RAR) com curetas específicas e, em seguida, aplicação da Terapia Fotodinâmica (igual ao tratamento do grupo TFD).

Os animais foram eutanaziados nos períodos experimentais de 7, 15 e 30 dias após os tratamentos.

4.9 Obtenção das Peças Cirúrgicas

Após os períodos correspondentes, os animais foram eutanaziados com sobredose dos anestésicos utilizados (Quetamina e Xilazina). As hemimaxilas foram removidas, imersas em paraformol 4% durante 48 horas. Após esse período, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e colocadas em álcool 70%, onde permaneceram até a realização do escaneamento no microtomógrafo computadorizado para a avaliação radiográfica tridimensional.

4.10 Análise Radiográfica Tridimensional (μ CT)

As hemimaxilas foram escaneadas através de uma varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia computadorizada (Skyscan 1176, Aatselaar, Belgium, 2003). Os parâmetros utilizados para este procedimento foram: filtro de Al 0.5mm; tamanho do voxel: 17,48 μ m; voltagem de 50KV e corrente elétrica de 500 μ A.

A cada 28 *scan* (varredura) foram reconstruídos em uma matriz de 18x18x18 μ m e as imagens 3D foram geradas para cada amostra, utilizando o software específico (NRecon 1.6.1.5 – SkyScan N. V., Belgium, 2003) (Figura 10). Essas imagens foram rotacionadas e reposicionadas em uma orientação padrão, com o auxílio do software Dataviewer (SkyScan 1176, Aartselaar, Belgium, 2003) (Figura 11) e foi estabelecido um limite de contraste (Threshold variando de 59 a 255) para distinguir tecidos

mineralizados utilizando os softwares CTan/CTvol (Skyscan 1176, Aatselaar, Belgium, 2003). A região de interesse (ROI) foi posicionada medindo-se 3 regiões no 2º molar superior: região de furca com uma área e $1,26 \times 1,15 \text{mm}^2$, e as proximais (mesial e distal) com uma área $1,26 \times 0,56 \text{mm}^2$ a partir da junção cimento-esmalte, de acordo com Macedo et al.⁵⁶ (2013) (Figura 12). Os dados foram obtidos em porcentagem de volume de tecido ósseo e com o auxílio dos programas CTan e CTvol, as amostras foram processadas e analisadas no laboratório de Microscopia in vivo da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Figura 10 – Programa NRecon utilizado para reconstrução das peças.

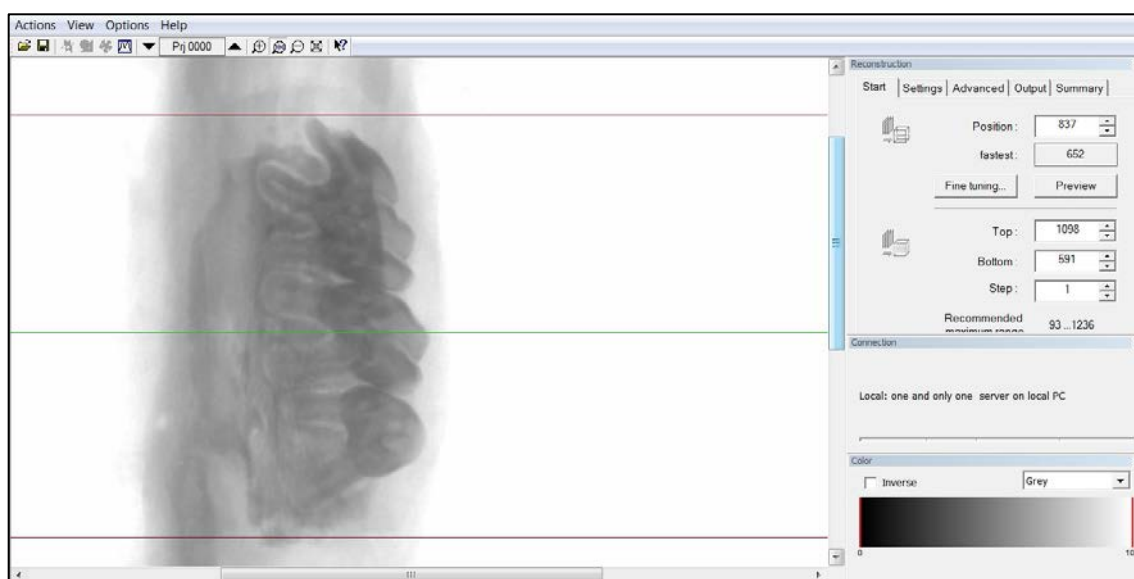


Figura 11 – Programa Dataviewer utilizado para orientação e padronização das posições das peças.

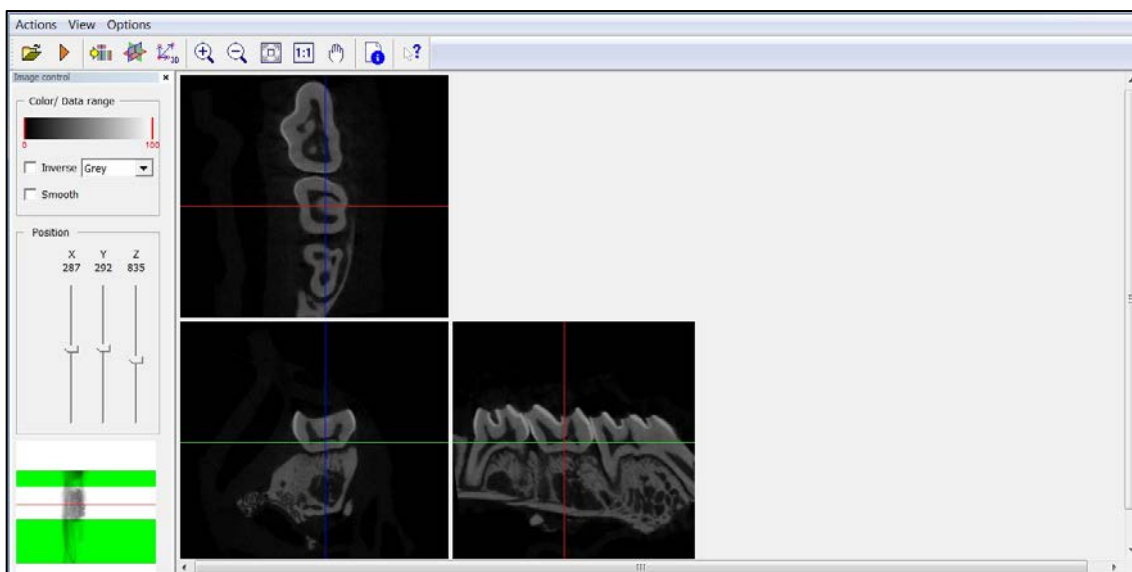
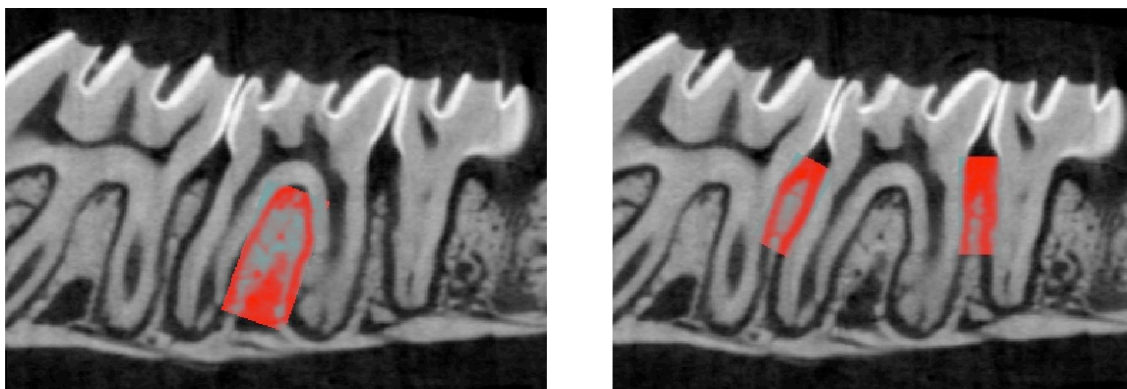


Figura 12 – Programa CTAn utilizado para análise de percentagem de volume ósseo nas regiões de furca e proximais, com o ROI em posição.



4.11 Processamento Histológico

Após a análise de radiografia tridimensional, as peças foram colocadas em solução de EDTA (Marca: Synth 7%; pH=7,2; tamponado de fosfato de sódio monobásico e dibásico) para descalcificação por um período de 8 semanas, com 3 trocas semanais. Posteriormente foram lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol

e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados no sentido méso-distal ao longo eixo do dente com 4 μ m de espessura, utilizando o micrótomo manual (Marca: Microm; Modelo: HM 360). Foram obtidos aproximadamente 30 cortes seriados de cada bloco, divididos em lâminas com 3 cortes cada, numerados de 01 a 10. As lâminas 1, 2, 3, 6, 7 e 8 eram normais e foram utilizadas para as análises histométrica e histológica; as lâminas 4, 5, 9 e 10 eram silanizadas para posterior análise de imunohistoquímica. Assim, duas lâminas (2 e 7) de cada hemimaxila foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e usadas para a avaliação histométrica e histológica.

4.12 Análise Histométrica

Para realização da análise histométrica, um examinador cego e calibrado ($r=0.99$), selecionou 2 lâminas de cada grupo. A área da região de furca foi delimitada de acordo com a metodologia de César-Neto et al ¹⁴ (2006) (Figura 13). As mensurações foram feitas utilizando um software de imagens ImageJ Launcher versão 1.48b (National Institutes of Health, USA), avaliando:

1. Região de furca: medindo-se 1000 μ m a partir do teto da furca delimitado pelas raízes (Figura 14), foi medido a área de furca e a de osso, obtendo assim, a porcentagem de osso presente na região de furca de cada corte histológico.

2. Região interproximal (mesial e distal): medindo a perda óssea da Junção Cimento-Esmalte (JCE) até a crista óssea (Figura 15).

As medidas da furca foram obtidas em μm^2 e das interproximais em μm , e posteriormente convertidas em mm^2 e mm , respectivamente.

Figura 13 – Metodologia de César-Neto et al.¹⁴ (2006), mostrando a delimitação da área de furca utilizada para a análise histométrica.

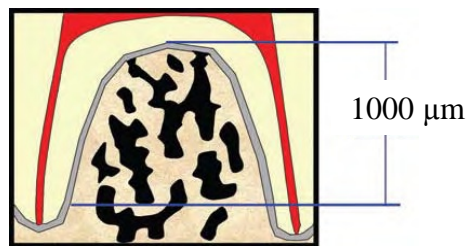


Figura 14 – Fotografia de corte corado com HE, na região de furca do 2º molar superior, com aumento de 2,5x. Em destaque, a área analisada para histometria de região de furca, com aumento de 5x.

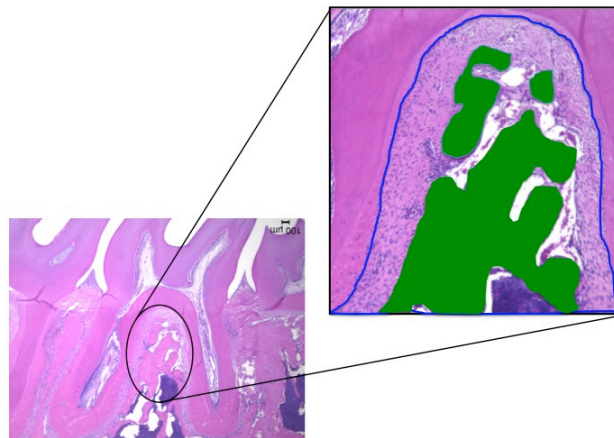
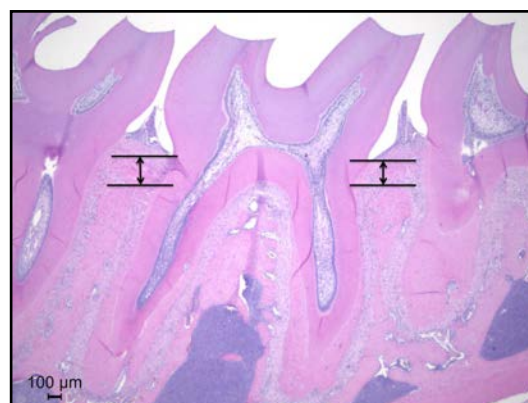


Figura 15 – Fotografia de corte corado com HE, na região do 2º molar superior, com aumento de 2,5x. Entre linhas, a área analisada para histometria das regiões interproximais



4.13 Análise Histológica

Utilizando-se um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) com objetiva para aumento de 4.0/10 vezes e oculares com aumento de 10 vezes, as imagens foram captadas e enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo DXC-1107A/107AP (Sony Eletronics Inc, Japão). Na análise histológica, foram avaliadas as reações inflamatórias do tecido conjuntivo em cada grupo experimental, processos de reabsorção óssea e neoformação tecidual.

4.14 Planejamento Estatístico

Os dados experimentais foram tabulados utilizando o programa Microsoft Excel 2010 e analisados estatisticamente com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc, USA).

Os dados foram avaliados em relação ao teorema do ponto central, para verificar se a disposição dos mesmos respeitava a distribuição normal. Para tal, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov com intervalo de confiança de 95%. Como todos os dados apresentaram-se normais, aplicou-se o teste paramétrico ANOVA (One Way) para analisar a existência de diferenças estatísticas entre os grupos. A complementação da análise foi realizada com o teste de Tukey com a finalidade de detectar entre quais grupos ocorreram às diferenças. Para comparação entre os períodos, foi utilizado o teste paramétrico ANOVA (Two Way). Os testes foram aplicados com 95% de intervalo de confiança.

5 RESULTADO

Foram realizadas as coletas dos dados referentes à avaliação histométrica e análise de radiografia tridimensional de regiões interproximais e região de furca dos 2os. molares superiores e captura de imagens para a descrição histológica.

5.1 Radiografia Tridimensional (μ CT) – Proximais

As imagens ilustrativas desta análise estão na Figura 17, em que houve diferença estatisticamente significativa para o percentual de volume de tecido ósseo nas regiões interproximais dos 2os. molares superiores das hemimaxilas tratadas dentro do grupo TFD, entre os períodos de 7 e 15 dias ($p < 0,05$) e entre os períodos de 15 e 30 dias ($p < 0,05$), em que o período de 15 dias mostrou menos volume ósseo quando comparado com os períodos de 7 e 30. Tais dados estão no gráfico na Figura 16 e a Tabela 1.

Figura 16 – Média e desvio padrão da porcentagem de volume ósseo (%) das regiões proximais do 2º molar superior das hemimaxilas tratadas dos grupos experimentais. Letra ‘a’ corresponde a diferença estatística entre TFD aos 7 e 15 dias. Letra ‘b’ corresponde a diferença estatística entre TFD nos períodos de 15 e 30 dias.

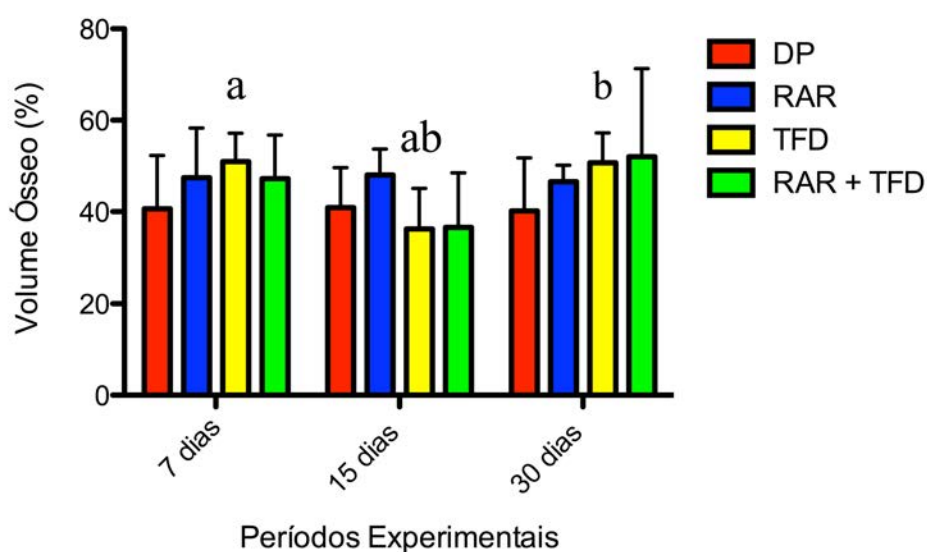


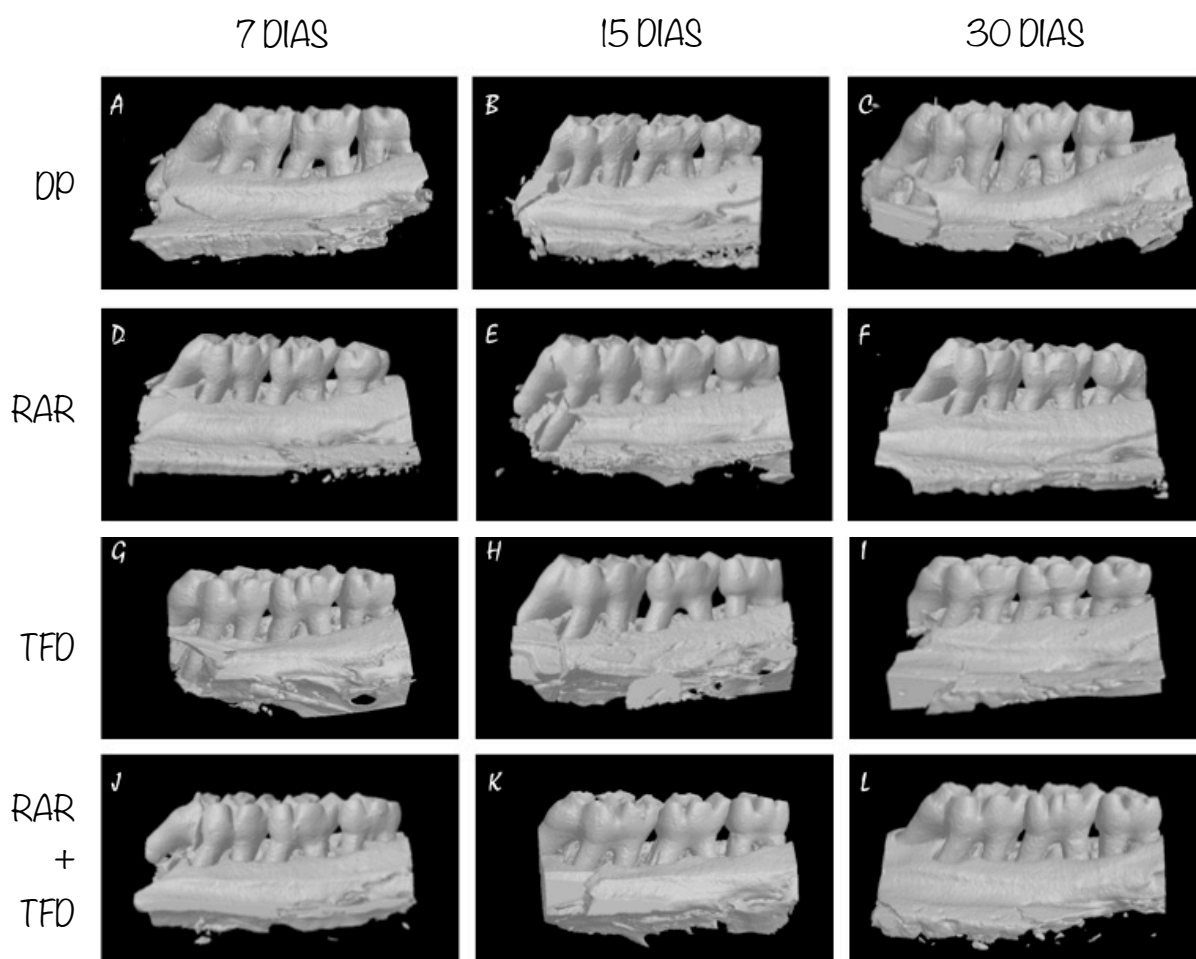
Tabela 1 – Média e desvio padrão da porcentagem de volume ósseo (%) das regiões proximais do 2º molar superior das hemimaxilas tratadas dos grupos experimentais.

Períodos/Grupos	DP	RAR	TFD	RAR+TFD
7 Dias	40,62 (\pm 11,66)	47,46 (\pm 10,85)	50,94 (\pm 6,24) ^a	47,22 (\pm 9,57)
15 Dias	40,88 (\pm 8,75)	48,04 (\pm 5,63)	36,26 (\pm 8,84) ^{ab}	36,56 (\pm 11,95)
30 Dias	40,18 (\pm 11,58)	46,46 (\pm 3,63)	50,72 (\pm 6,51) ^b	52,02 (\pm 19,26)

^aCorresponde a diferença estatística entre TFD aos 7 e 15 dias.

^bCorresponde a diferença estatística entre TFD nos períodos de 15 e 30 dias.

Figura 17 – Fotografia dos modelos em 3D confeccionados a partir do escaneamento das peças no μ -CT, vista palatina, mostrando as regiões analisadas (distal, mesial e furca) dos grupos experimentais: A, B e C (Grupo DP); D, E e F (Grupo RAR); G, H e I (Grupo TFD); J, K e L (Grupo RAR+TFD), na sequência 7, 15 e 30 dias.



5.2 Radiografia Tridimensional (μ CT) - Furca

Nesta análise, houve diferença estatisticamente significativa para o percentual de volume de tecido ósseo na região de furca dos 2os. molares superiores das hemimaxilas tratadas dentro do período de 7 dias, entre os grupos DP e TFD (* $p < 0,05$) e entre DP e RAR +TFD ([#] $p < 0,05$). No período de 30 dias, houve diferença estatística entre os grupos DP e RAR+TFD (& $p < 0,05$). O grupo DP apresentou menor percentual de volume ósseo quando comparado aos grupos experimentais nos dois períodos. Os grupos TFD e RAR+TFD mostraram diferença estatisticamente significativa nos períodos de 7 e 15 dias ($p < 0,05$) e entre 15 e 30 dias ($p < 0,05$) onde o percentual de volume ósseo no período de 15 dias foi menor em relação aos outros dois períodos. Tais dados estão apresentados no gráfico na Figura 18 e Tabela 2.

Figura 18 – Média e desvio-padrão da porcentagem de volume ósseo (%) da região de furca do 2º molar superior das hemimaxilas tratadas dos grupos experimentais. Letra ‘a’ corresponde a diferença estatística entre TFD aos 7 e 15 dias. Letra ‘b’ corresponde a diferença estatística entre TFD nos períodos de 15 e 30 dias. Letra ‘c’ corresponde a diferença estatística entre RAR+TFD aos 7 e 15 dias. Letra ‘d’ corresponde a diferença estatística entre RAR+TFD nos períodos de 15 e 30 dias.

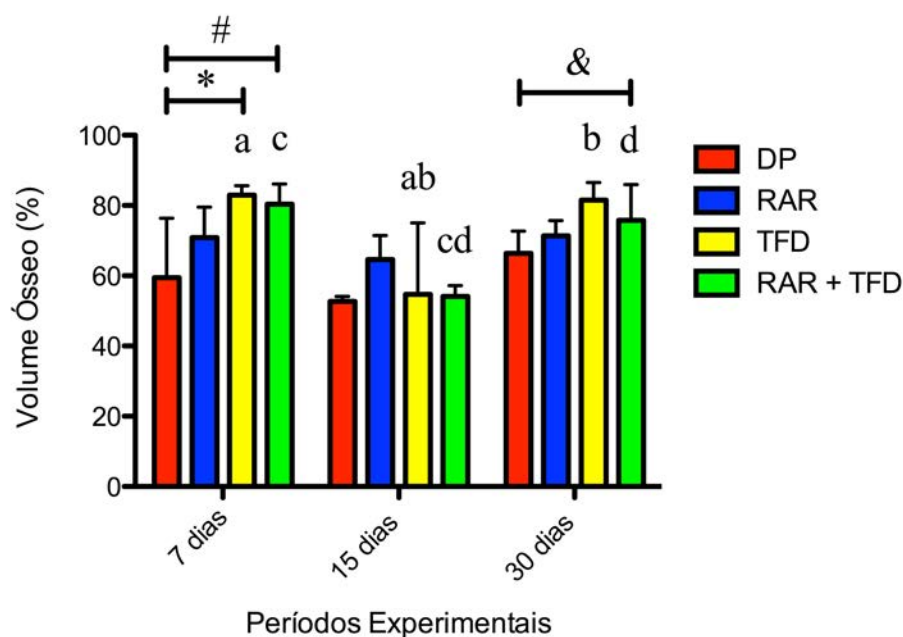


Tabela 2 – Média e desvio-padrão da porcentagem de volume ósseo (%) da região de furca do 2º molar superior das hemimaxilas tratadas dos grupos experimentais.

Períodos/Grupos	DP	RAR	TFD	RAR+TFD
7 Dias	59,47 ($\pm 16,89$) ^{*#}	70,89 ($\pm 8,66$)	82,93 ($\pm 2,67$) ^{*a}	80,36 ($\pm 5,79$) ^{#c}
15 Dias	52,68 ($\pm 1,42$)	64,64 ($\pm 6,78$)	54,72 ($\pm 20,36$) ^{ab}	54,17 ($\pm 3,01$) ^{cd}
30 Dias	66,38 ($\pm 6,32$) ^{&}	71,36 ($\pm 4,32$)	81,56 ($\pm 4,95$) ^b	75,80 ($\pm 10,16$) ^{&d}

^aCorresponde a diferença estatística entre TFD aos 7 e 15 dias.

^bCorresponde a diferença estatística entre TFD nos períodos de 15 e 30 dias.

^cCorresponde a diferença estatística entre RAR+TFD aos 7 e 15 dias.

^dCorresponde a diferença estatística entre RAR+TFD nos períodos de 15 e 30 dias.

^{*}Corresponde a diferença estatística entre DP e TFD aos dias.

[#]Corresponde a diferença estatística entre DP e RAR+TFD aos 7 dias.

[&]Corresponde a diferença estatística entre DP e RAR+TFD aos 30 dias.

5.3 Histometria – Proximais

Nos resultados desta análise, avaliados estatisticamente, todos os dados se mostraram estatisticamente iguais para a perda óssea nas regiões interproximais dos 2os. molares superiores das hemimaxilas tratadas dos grupos experimentais como mostra a Figura 19 e a Tabela 3.

Figura 19 – Média e desvio padrão da perda óssea linear em milímetros (mm) das regiões proximais dos 2º molar superior das hemimaxilas tratadas dos grupos experimentais.

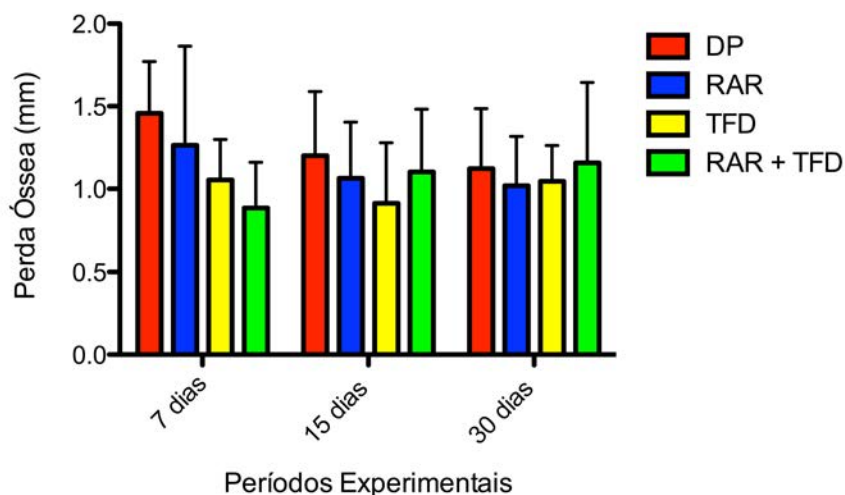


Tabela 3 – Média e desvio padrão da perda óssea linear em milímetros (mm) das regiões proximais dos 2º molar superior das hemimaxilas tratadas dos grupos experimentais.

Períodos/Grupos	DP	RAR	TFD	RAR+TFD
7 Dias	1,48 (±0,31)	1,26 (±0,60)	1,05 (±0,24)	0,88 (±0,27)
15 Dias	1,20 (±0,38)	1,06 (±0,33)	0,91 (±0,36)	1,02 (±0,38)
30 Dias	1,12 (±0,36)	1,02 (±0,29)	1,04 (±0,21)	1,15 (±0,48)

5.4 Histometria - Furca

Todos os dados se mostraram estatisticamente iguais para a área de osso na região de furca dos 2os. molares superiores das maxilas tratadas dos grupos experimentais, como demonstra a Figura 20 e a Tabela 4.

Figura 20 – Média e desvio padrão da área de osso em milímetros quadrados (mm²) da região de furca do 2º molar superior das hemimaxilas tratadas dos grupos experimentais.

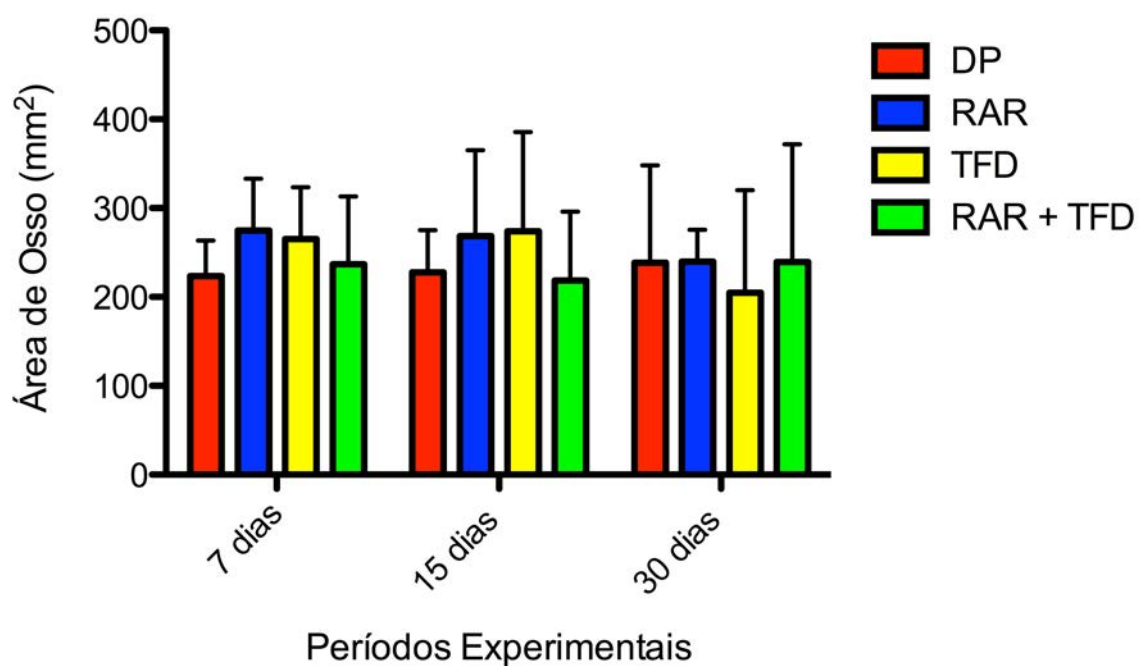


Tabela 4 – Média e desvio padrão da área de osso em milímetros quadrados (mm²) da região de furca do 2º molar superior das hemimaxilas tratadas dos grupos experimentais.

Períodos/Grupos	DP	RAR	TFD	RAR+TFD
7 Dias	223,7 (±39,40)	275,0 (±58,05)	265,2 (±58,56)	236,9 (±76,21)
15 Dias	227,7 (±47,40)	268,7 (±96,39)	274,1 (±111,3)	218,4 (±77,50)
30 Dias	238,5 (±109,7)	239,6 (±36,01)	205,0 (±115,1)	239,5 (±132,2)

5.5 Análise Histológica

O periodonto dos animais do grupo DP (Figura 21) mostrou várias alterações morfológicas. Aos 7 dias, um intenso processo inflamatório foi observado na lâmina própria da gengiva interdentária nos animais. Esta, frequentemente, apresentou-se ulcerada; o epitélio gengival estava adjacente à superfície do cimento acelular, ou seja, apicalmente à junção cimento-esmalte. Uma evidente redução no processo inflamatório foi observada nos períodos subsequentes, de maneira gradativa.

A análise dos grupos RAR, TFD e RAR+TFD (Figuras 22, 23 e 24) apresentou as mesmas características histológicas encontradas no grupo DP, porém com migração do epitélio, processo inflamatório, perda do processo alveolar e reabsorção óssea na região de furca, menos pronunciado. Deste modo, as descrições histológicas foram semelhantes para todos os grupos experimentais. As imagens têm o objetivo de ilustrar os tecidos periodontais dentro de cada tratamento nos diferentes períodos.

Figura 21 – Fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas de ratos do grupo DP, nos diferentes períodos de 7, 15 e 30 dias, no aumento de 4x, mostrando o processo alveolar (PA) formado por trabéculas ósseas irregulares, situado entre os 1º (1M) e 2º (2M) e entre os 2º (2M) e 3º (3M) molares. A porção cervical do processo alveolar (PA) situa-se junto ao terço apical das raízes do 2M. Foi observado reabsorção do osso alveolar (OA) na região de furca. No aumento de 10x, o epitélio gengival (EG) está situado apicalmente à junção cimento-esmalte (JCE), e a mucosa gengival exibe processo inflamatório (PI) evidente e a papila interdentária destruída. JCE, junção cimento-esmalte; EG, epitélio gengival; D, dentina; P, polpa dentária; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar da região de furca. HE. x10 – Bar: 80. x4 – Bar: 330.

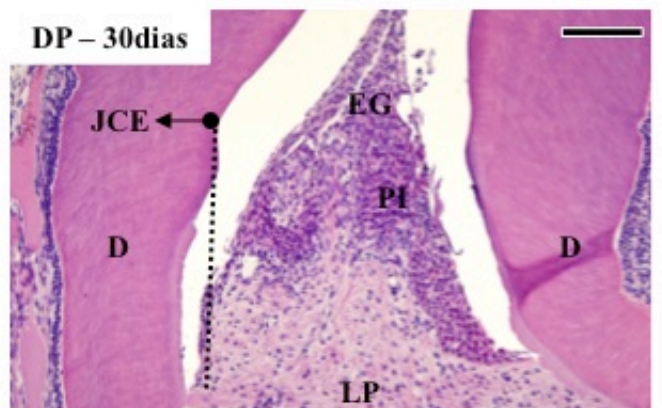
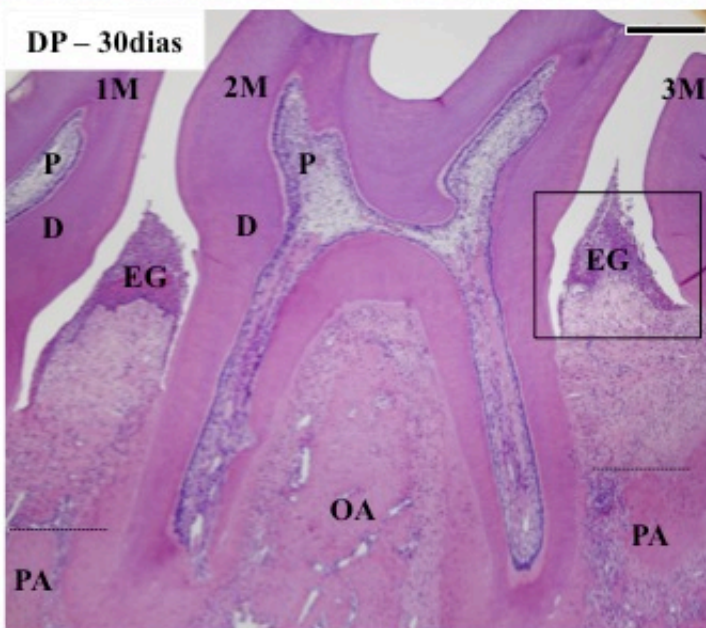
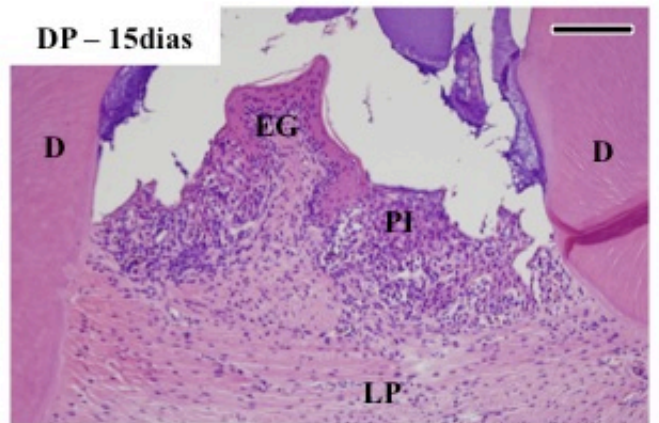
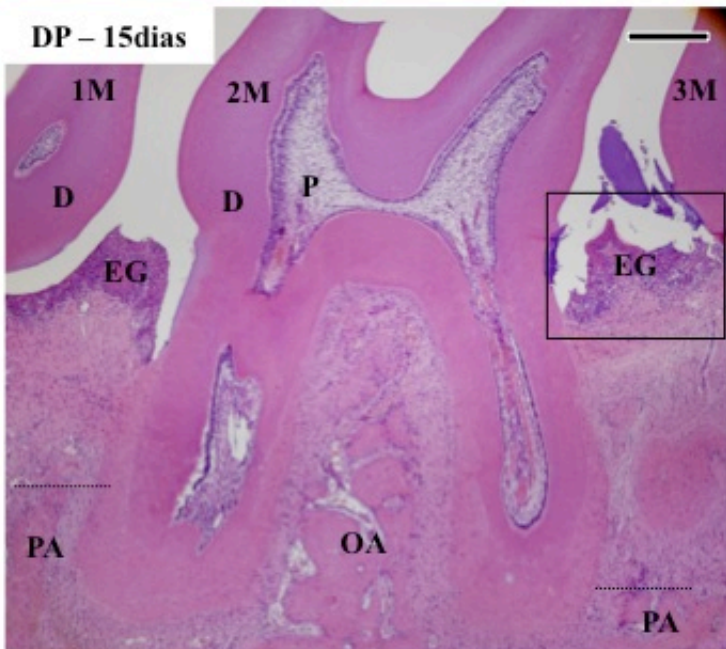
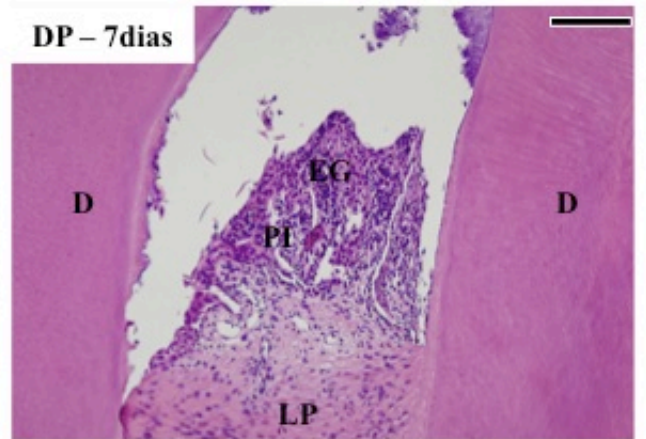
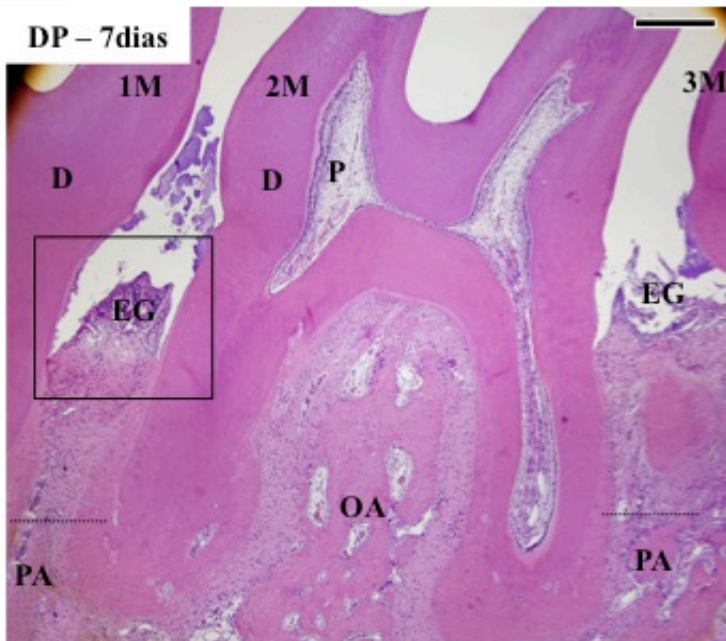


Figura 22 – Fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas de ratos do grupo RAR, nos diferentes períodos de 7, 15 e 30 dias, no aumento de 4x, mostrando o processo alveolar (PA) formado por trabéculas ósseas irregulares, situado entre os 1º (1M) e 2º (2M) e entre os 2º (2M) e 3º (3M) molares. A porção cervical do processo alveolar (PA) situa-se junto ao terço apical das raízes do 2M. Foi observado reabsorção do osso alveolar (OA) na região de furca. No aumento de 10x, o epitélio gengival (EG) está situado apicalmente à junção cimento-esmalte (JCE), em que a mucosa gengival exibe processo inflamatório (PI) evidente menos pronunciado que o grupo DP e a papila interdentária destruída. JCE, junção cimento-esmalte; EG, epitélio gengival; D, dentina; P, polpa dentária; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar da região de furca. HE. x10 – Bar: 80. x4 – Bar: 330

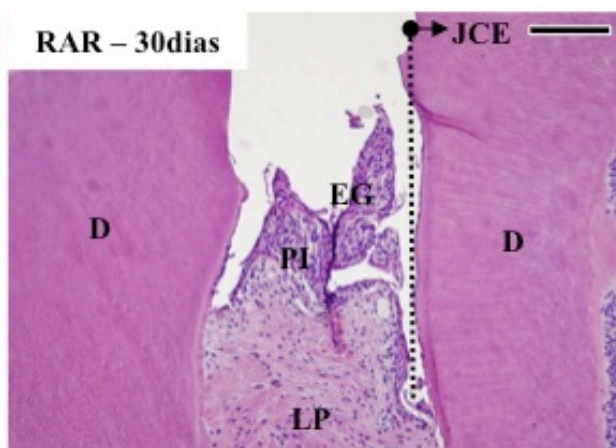
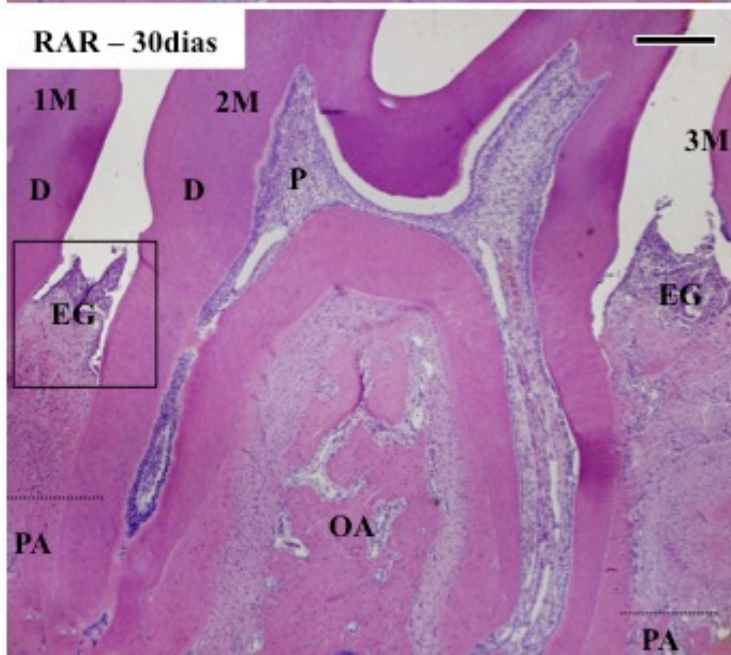
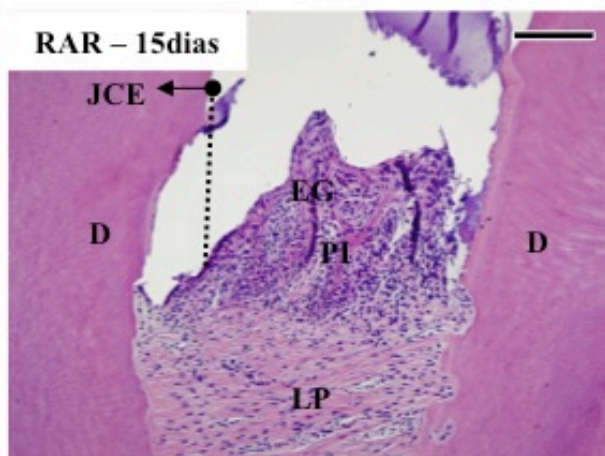
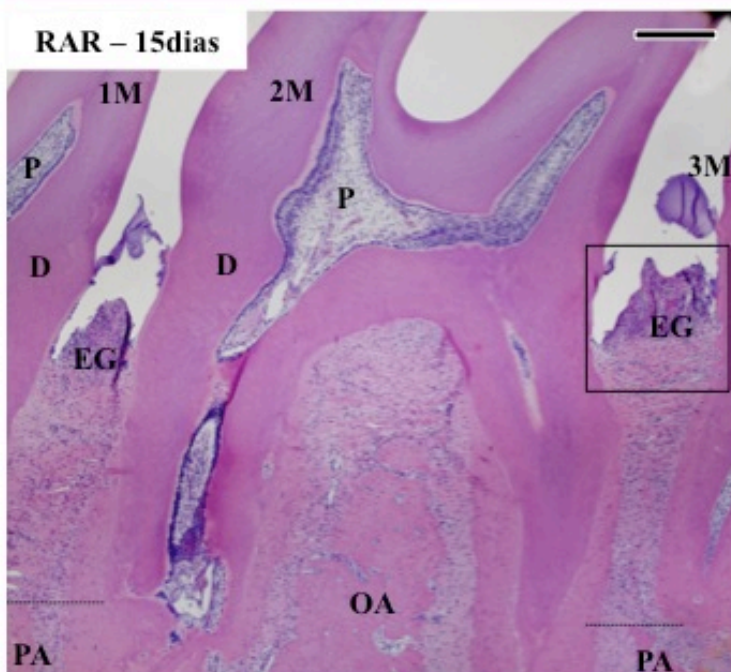
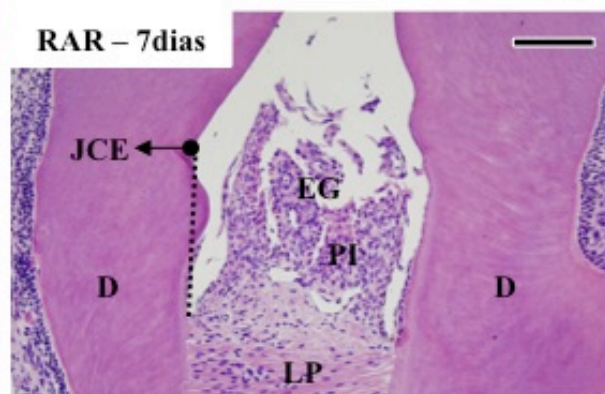
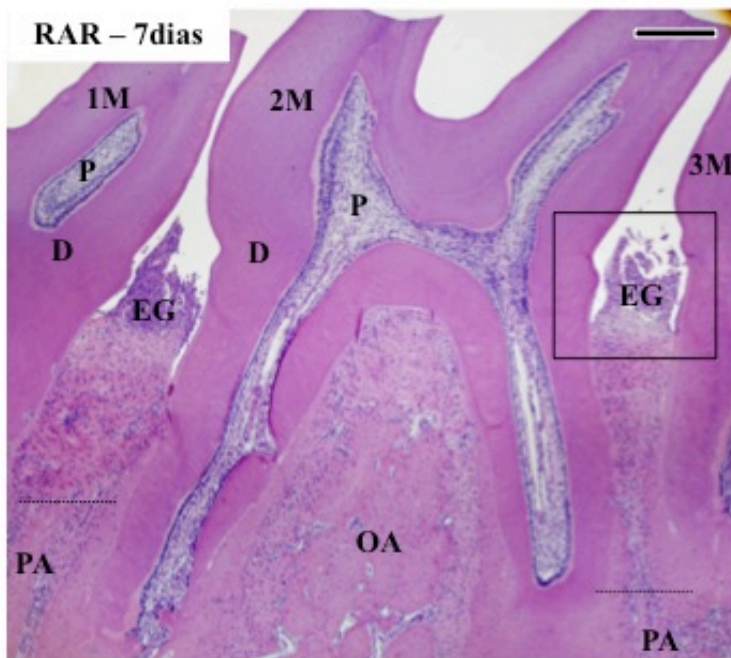


Figura 23 – Fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas de ratos do grupo TFD, nos diferentes períodos de 7, 15 e 30 dias, no aumento de 4x, mostrando o processo alveolar (PA) formado por trabéculas ósseas irregulares, situado entre os 1º (1M) e 2º (2M) e entre os 2º (2M) e 3º (3M) molares. A porção cervical do processo alveolar (PA) situa-se junto ao terço médio e apical das raízes do 2M. Foi observado reabsorção do osso alveolar (OA) na região de furca. No aumento de 10x, o epitélio gengival (EG) está situado apicalmente à junção cimento-esmalte (JCE), em que a mucosa gengival exibe processo inflamatório (PI) evidente menos pronunciado que o grupo DP e a papila interdentária destruída. JCE, junção cimento-esmalte; EG, epitélio gengival; D, dentina; P, polpa dentária; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar da região de furca. HE. x10 – Bar: 80. x4 – Bar: 330.

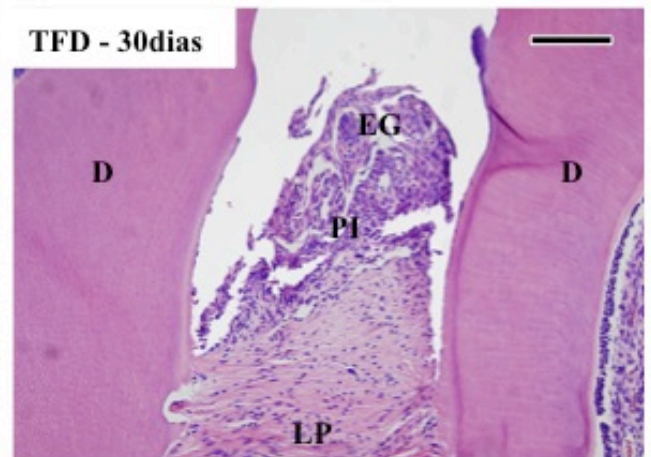
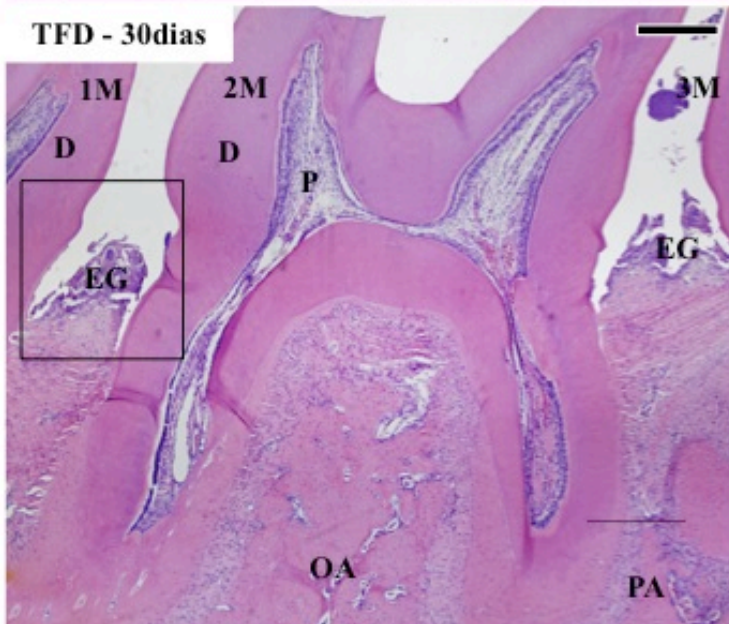
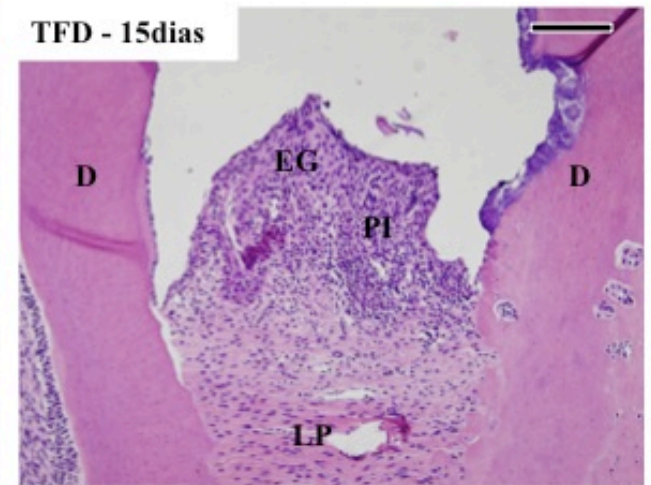
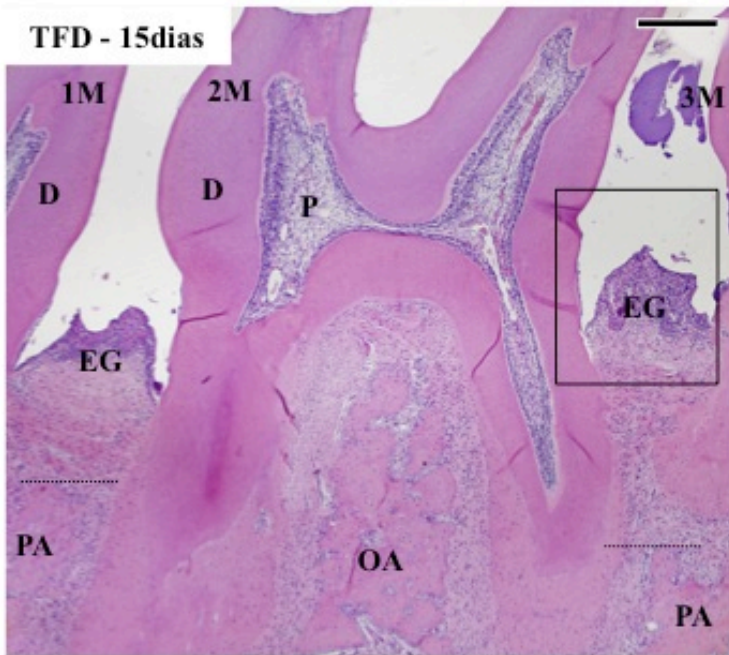
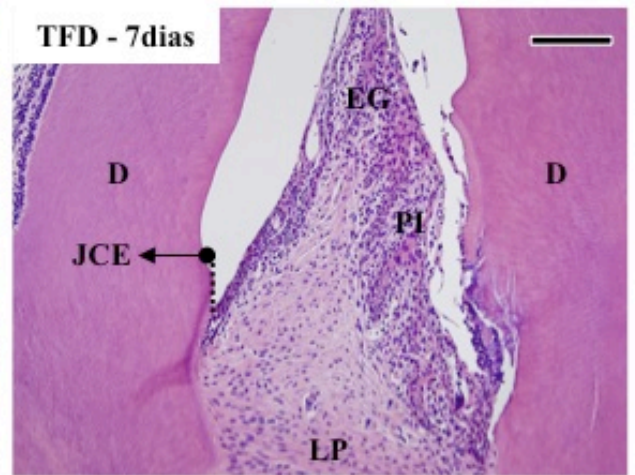
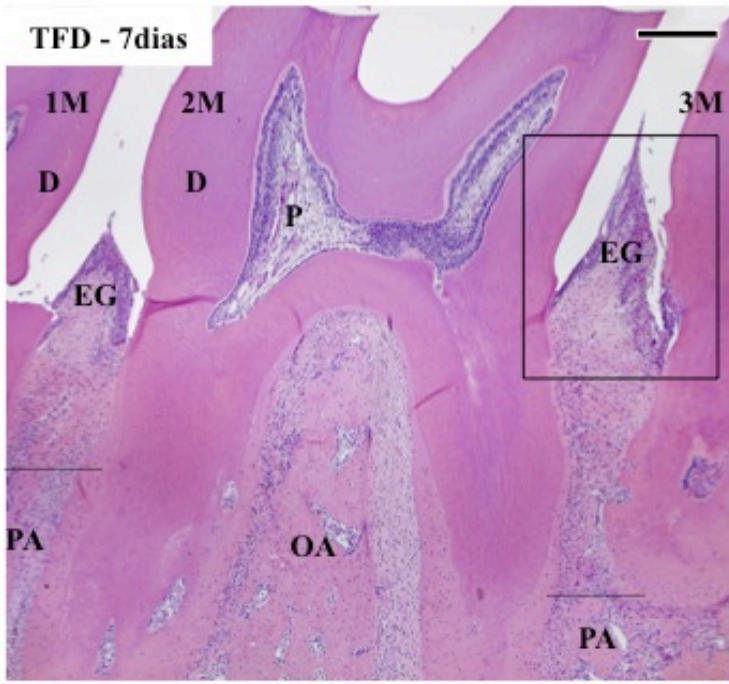
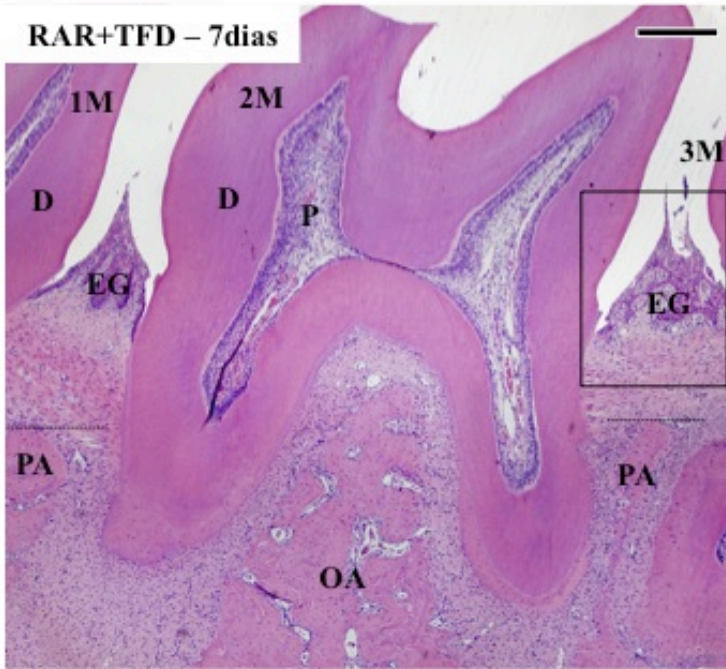
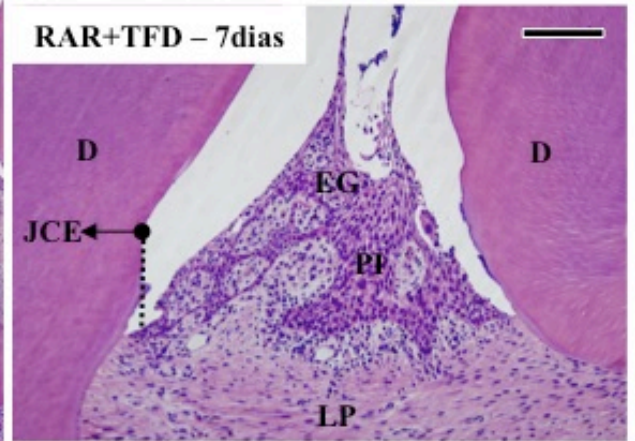


Figura 24 – Fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas de ratos do grupo RAR+TFD, nos diferentes períodos de 7, 15 e 30 dias, no aumento de 4x, mostrando o processo alveolar (PA) formado por trabéculas ósseas irregulares, situado entre os 1º (1M) e 2º (2M) e entre os 2º (2M) e 3º (3M) molares. A porção cervical do processo alveolar (PA) situa-se junto ao terço médio e apical das raízes do 2M. Foi observado reabsorção do osso alveolar (OA) na região de furca. No aumento de 10x, o epitélio gengival (EG) está situado apicalmente à junção cimento-esmalte (JCE), em que a mucosa gengival exibe processo inflamatório (PI) evidente menos pronunciado que o grupo DP e a papila interdentária destruída. JCE, junção cimento-esmalte; EG, epitélio gengival; D, dentina; P, polpa dentária; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar da região de furca. HE. x10 – Bar: 80. x4 – Bar: 330.

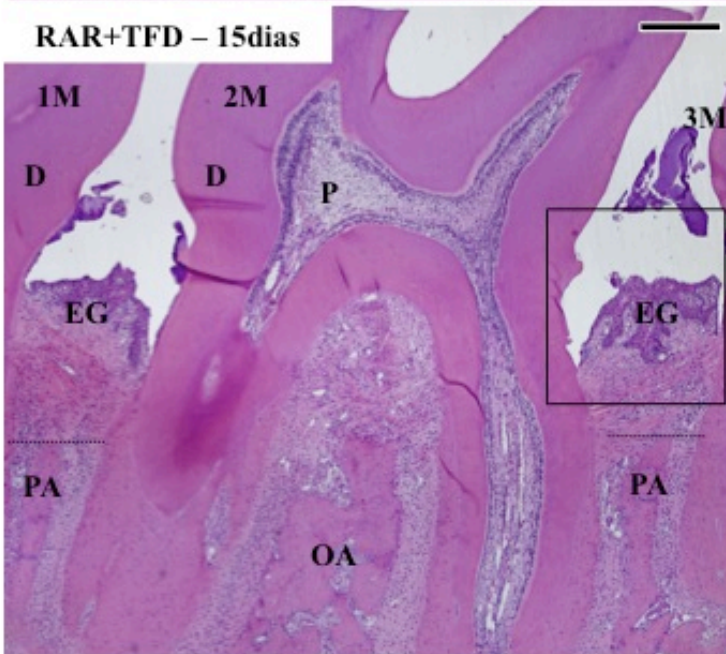
RAR+TFD - 7dias



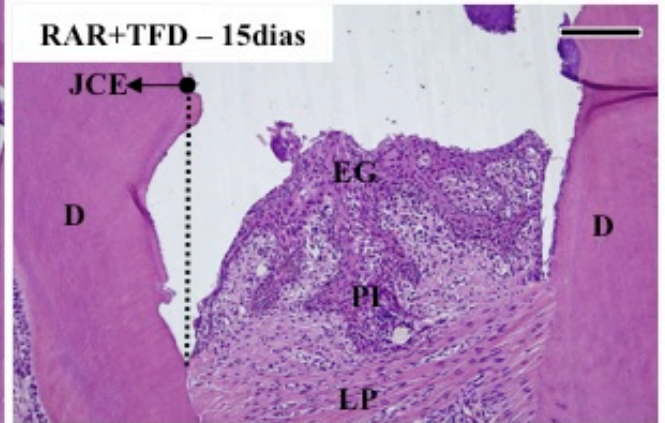
RAR+TFD - 7dias



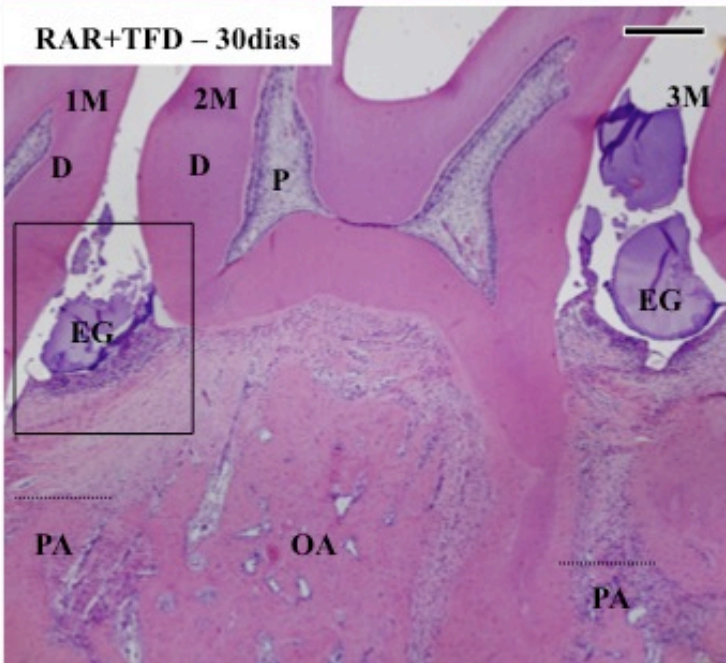
RAR+TFD - 15dias



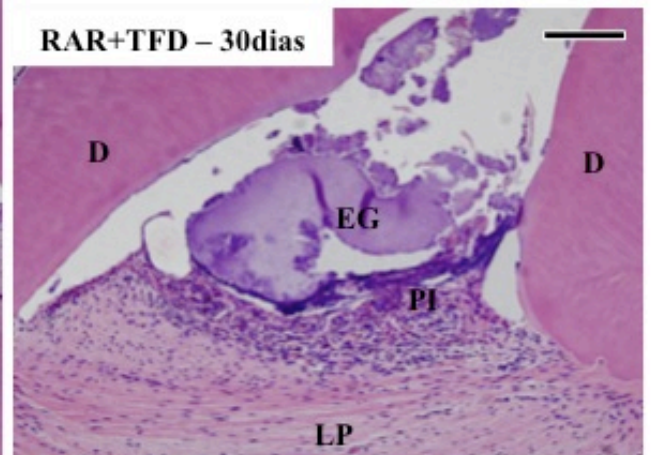
RAR+TFD - 15dias



RAR+TFD - 30dias



RAR+TFD - 30dias



DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo*, as respostas teciduais da aplicação da aTFD utilizando o FTS ftalocianina-glucamina como terapia adjunta no tratamento da DP induzida em ratos. No presente estudo, os resultados da análise histológica não mostraram diferenças entre os grupos dentro dos períodos. Isto demonstra que a TFD não acarretou danos aos tecidos. Outros estudos em animais utilizando outros FTSs, várias concentrações e diferentes fontes de luz e comprimentos de onda também observaram resultados semelhantes^{47, 49}. A aplicação tópica de ftalocianina de zinco em pele de camundongos Balb/c tem mostrado respostas satisfatórias quanto a sua absorção, capacidade fotossensibilizadora e segurança^{43, 46}.

Neste trabalho *in vivo*, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, em relação aos períodos avaliados, através da análise histométrica. No entanto, os grupos de TFD mantiveram o mesmo padrão de perda óssea quando comparado ao grupo RAR, tanto das regiões interproximais, quanto da região de furca. Os resultados da análise radiográfica tridimensional demonstraram que nos períodos de 7 e 30 dias, o grupo TFD apresentou maior volume ósseo nas regiões interproximais e de furca, comparando com os demais grupos. O grupo DP exibiu maior perda óssea em todos os períodos, porém foi estatisticamente significativa na região de furca no período de 7 e 30 dias. Estes resultados podem estar relacionados com o modelo experimental utilizado, a concentração do FTS, o tempo de incubação, tempo de irradiação da luz e o número de aplicações.

O modelo experimental empregado neste estudo é o que tem sido amplamente utilizado para conhecer os efeitos da TFD na DP: colocação de ligaduras em ratos^{21, 29, 33, 75}. Como a DP é uma doença multifatorial e polimicrobiana, a colocação de ligaduras pode ser o método mais representativo de indução da doença, quando se quer avaliar o

tratamento periodontal ^{32, 35, 63}. Nesses estudos têm sido avaliadas as alterações nos tecidos periodontais, tanto por meio radiográfico; morfométrico ³⁵, histomorfométrico ⁶² e biologia molecular ⁴⁴. Independentemente da metodologia utilizada, estes autores comprovam em seus estudos, alterações como a reabsorção óssea alveolar e a perda de inserção conjuntiva ^{32, 53}. Porém, outros estudos ³⁶ têm demonstrado que este modelo apresenta reparação espontânea.

Os resultados destas duas análises, avaliando as mesmas regiões, diferem devido aos conceitos de cada método. Na análise histométrica, a metodologia utilizada foi realizada, avaliando dois cortes de cada dente, nas regiões de furca e interproximais, no qual representavam o dente como um todo. Já a metodologia da radiografia tridimensional, foi executada a partir de uma varredura da peça inteira, permitindo uma análise detalhada da arquitetura óssea ao redor de todo o dente, originando dados mais confiáveis de acordo com Park et al. ⁷⁰ (2007).

Matevski et al. ⁵⁸ (2003), realizaram um estudo in vitro para avaliar se fatores externos, como a presença do fluido gengival, sangue e exsudato poderiam influenciar os resultados da TFD. Os autores concluíram que apesar da ação bactericida ser eficaz, a TFD tem sua ação afetada negativamente pela presença de sangue e fluido gengival, pois estes podem refletir ou absorver a luz, e promovem um “efeito protetor” para as bactérias, impedindo a penetração do corante e do laser até a célula alvo. Deste modo, justifica-se os resultados obtidos no presente estudo, onde observamos que o grupo RAR+TFD apresentou um volume ósseo menor que o grupo TFD em todos os períodos experimentais, porém não significativo, indicando possivelmente a presença de sangue após a RAR, devido a inflamação do tecido gengival.

Também parece estar esclarecido o mecanismo da TFD, não havendo contestação entre os autores que acreditam em sua capacidade bactericida. Estes são

unânicos ao afirmarem que a excitação do fotossensibilizador provocada pela fonte de luz desencadearia o surgimento de moléculas tóxicas para os microrganismos^{41, 55, 74, 84, 90}. Vários estudos^{15, 49, 73, 75, 84, 88} vêm comprovando a alta taxa de destruição de microrganismos submetidos à TFD. Por outro lado, espécies bacterianas como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) se mostram mais resistentes a essa terapia, quando comparadas a outras como *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*⁷³.

Bactérias gram-positivas são geralmente suscetível a fotoinativação, enquanto que as gram-negativas são frequentemente resistentes⁸⁷. Esta resistência é atribuída à membrana externa, que serve como barreira à penetração de substâncias. A utilização de um corante catiônico mostra maior atividade fotodinâmica contra bactérias gram-negativas, já que a carga positiva promove uma ligação eletrostática à superfície externa da célula, induzindo um dano inicial que favorece a penetração do corante⁶¹. No entanto, alguns FTS, como porfirinas, ftalocianinas e fenotiazínicos (azul de metileno e azul), que são capazes de aderir à bactéria, induzir danos locais, penetrar na membrana bacteriana e agir em ambos os tipos de bactérias: gram-positivas e gram-negativas⁸⁷.

Alguns estudos em animais^{49, 75, 84} mostraram que a aTFD é efetiva em reduzir microrganismos periodontopatogênicos, enquanto outros mostraram que a aTFD é efetiva no controle da perda óssea alveolar quando combinado com o tratamento periodontal convencional^{20, 29, 33}.

de Almeida et al.²¹ (2007) avaliaram histologicamente e radiograficamente, o efeito da TFD na evolução da DP induzida em ratos. O grupo TFD foi tratado com corante azul de metileno, irradiado com laser de baixa intensidade e apresentou menos perda óssea comparada ao grupo controle nos 5 e 15 dias. Não houve diferença estatística nos 30 dias. Após 15 dias, os resultados histológicos mostraram diferença

estatística na extensão da reação inflamatória no tecido gengival. Os autores concluíram que a TFD pode reduzir a destruição óssea periodontal transitoriamente. Em 2008, este mesmo grupo de pesquisa ²⁰, desenvolveu um experimento em ratos com a proposta de avaliar histometricamente a influência da TFD com azul de metileno na perda óssea em áreas de furca. O grupo TFD demonstrou menos perda óssea comparado aos outros grupos no período de 7 dias. No período de 15 dias, os grupos só corante e TFD apresentaram menos perda óssea do que os demais grupos

Qin et al. ⁷⁵ (2008) compararam a eficácia da TFD com azul de toluidina e RAR na DP induzida em ratos. Os resultados terapêuticos foram similares entre os dois tratamentos, sugerindo que a TFD tem um alto potencial de aplicação clínica.

No presente estudo, os resultados mostraram que os tratamentos de RAR, TFD e RAR+TFD originaram em ganhos semelhantes de volume ósseo sem diferença estatisticamente significativa entre o grupos. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que tem demonstrado a efetividade da TFD no tratamento periodontal em animais ²¹ e humanos ⁶.

Em 2013, Garcia et al. ³⁴ avaliaram a aTFD repetidas vezes como terapia adjunta no tratamento periodontal em ratos. Os autores concluíram que aplicações repetidas de aTFD não interfere na redução da perda óssea alveolar, comparando diferentes protocolos de tratamento da aTFD.

Estudos in vitro ⁷ e in vivo ^{20, 21, 49, 75, 84}, mostraram resultados favoráveis usando os princípios de aTFD. Recentes estudos em animais ^{20, 21, 49, 75, 84} e humanos ⁴ mostraram que TFD foi efetiva no tratamento da DP. Foi concluído que essa terapia pode ser uma alternativa complementar, especialmente em áreas de difícil acesso com instrumentos manuais: regiões de furca, concavidades e bolsas profundas ^{21, 98}. Essa terapia também pode ser um método alternativo para reduzir o uso de antibióticos,

evitando o desenvolvimento de organismos resistentes^{57, 94}.

Embora neste estudo não tenha sido avaliado diretamente a ação da TFD sobre os microrganismos, estudos têm demonstrado que quando há uma redução na quantidade destes (bactérias) presentes na periodontite ou peri-implantite, ocorre uma reparação do tecido ou re-osseointegração^{37, 71, 100}.

Como citado, existem várias condições tal como o modelo experimental animal, a concentração do corante, período de retenção do corante no tecido, tempo para a resposta biológica, tempo de irradiação, energia e comprimento de onda da luz, pH do local (tecido/dente/interface), presença de exsudato, sangue e fluido gengival, frequência e o modo de aplicação do corante que podem influenciar a resposta biológica da TFD^{19, 103, 104}. Assim, mais estudos avaliando estes fatores são necessários para a melhor compreensão da ação da fotoinativação de microrganismos.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo e dos parâmetros utilizados, podemos concluir que a aTFD com o FTS ftalocianina-glucamina foi efetiva tanto quanto a RAR no tratamento da DP induzida em ratos. Assim, a ftalocianina-glucamina pode ser considerada um promissor fotossensibilizador. No entanto, mais estudo *in vitro* e *in vivo* são necessários para elucidar a ação da aTFD e o efeito deste FTS como terapia adjunta no tratamento da DP.

8 REFERÊNCIAS*

1. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001; 74(5): 656-69.
2. Al-Watban FA, Andres BL. Polychromatic LED in oval full-thickness wound healing in non-diabetic and diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(1): 10-6.
3. Al-Watban FA, Andres BL. Polychromatic LED therapy in burn healing of non-diabetic and diabetic rats. *J Clin Laser Med Surg.* 2003; 21(5): 249-58.
4. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent.* 2007; 18(2): 34-8.
5. Anholt H, Moan J. Fractionated treatment of CaD2 tumors in mice sensitized with aluminium phthalocyanine tetrasulfonate. *Cancer Lett.* 1992; 61(3): 263-7.
6. Benstead K, Moore JV. Quantitative histological changes in murine tail skin following photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 1989; 59(4): 503-9.
7. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol.* 1997; 65(6): 1026-31.
8. Bidault P, Chandad F, Grenier D. Systemic antibiotic therapy in the treatment of periodontitis. *J Can Dent Assoc.* 2007; 73(6): 515-20.
9. 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.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

10. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2004; 5(8): 497-508.
11. Brugnera Junior A, Santos AEC, Bologn ED, Ladalardo TCCG. *Laserterapia aplicada a clínica odontológica.* São Paulo: Santos; 2003. p. 99-102.
12. Campos GN, Pimentel SP, Ribeiro FV, Casarin RC, Cirano FR, Saraceni CH, et al. The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(1): 317-24.
13. Caton JG, Greenstein G. Factors related to periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 1993; 1: 9-15.
14. 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. *J Periodontal Res.* 2006; 41(2): 118-23.
15. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2003; 18(1): 51-5.
16. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rossler R, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2008; 79(9): 1638-44.
17. Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25(2): 102-6.

18. Dastoor SF, Travan S, Neiva RF, Rayburn LA, Giannobile WV, Wang HL. Effect of adjunctive systemic azithromycin with periodontal surgery in the treatment of chronic periodontitis in smokers: a pilot study. *J Periodontol.* 2007; 78(10): 1887-96.
19. de Almeida JM, Garcia VG, Theodoro LH. Terapia fotodinâmica: uma opção na terapia periodontal. *Arq Cent Estud Curso Odontol Univ Fed Minas Gerais.* 2006; 42(3): 199-210.
20. 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.
21. 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.
22. de Melo WC. Fotoativação seletiva dos microrganismos: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* [tese de doutorado]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo; 2014.
23. de Melo WC, Avci P, de Oliveira MN, Gupta A, Vecchio D, Sadasivam M, et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013; 11(7): 669-93.
24. 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.

25. Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem.* 2004; 47(16): 3897-915.
26. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol.* 1992; 37(11): 883-7.
27. Drisko CH. The use of locally delivered doxycycline in the treatment of periodontitis. Clinical results. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(11 Pt 2): 947-52; discussion 78-9.
28. Fellman M. Pharmacology and periodontal disease: implications and future options. *CDHA J.* 2010; 25(2): 9-11.
29. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Martins TM, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(3): 219-28.
30. Fickweiler S, Abels C, Karrer S, Baumler W, Landthaler M, Hofstadter F, et al. Photosensitization of human skin cell lines by ATMPn (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene) in vitro: mechanism of action. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 48(1): 27-35.
31. 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.
32. Galvao MP, Chapper A, Rosing CK, Ferreira MB, de Souza MA. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesqui Odontol Bras.* 2003; 17(1): 56-62.

33. Garcia VG, Fernandes LA, Macarini VC, de Almeida JM, Martins TM, Bosco AF, et al. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. *J Clin Periodontol.* 2011; 38(12): 1106-14.
34. 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.
35. Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Osredkar J, Skaleric U. Influence of subcutaneous administration of recombinant TNF-alpha on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2003; 38(2): 198-203.
36. 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. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(2): 89-105.
37. Haas R, Baron M, Dortbudak O, Watzek G. Lethal photosensitization, autogenous bone, and e-PTFE membrane for the treatment of peri-implantitis: preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000; 15(3): 374-82.
38. Harris F, Chatfield LK, Phoenix DA. Phenothiazinium based photosensitisers--photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. *Curr Drug Targets.* 2005; 6(5): 615-27.
39. 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.

40. Huang PJ, Huang YC, Su MF, Yang TY, Huang JR, Jiang CP. In vitro observations on the influence of copper peptide aids for the LED photoirradiation of fibroblast collagen synthesis. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25(3): 183-90.
41. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA, Mizutani K, Sasaki KM, Izumi Y. Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? *Periodontol* 2000. 2009; 50: 90-126.
42. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti 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.
43. Kaestner L, Cesson M, Kassab K, Christensen T, Edminson PD, Cook MJ, et al. Zinc octa-n-alkyl phthalocyanines in photodynamic therapy: photophysical properties, accumulation and apoptosis in cell cultures, studies in erythrocytes and topical application to Balb/c mice skin. *Photochem Photobiol Sci.* 2003; 2(6): 660-7.
44. Karimbux NY, Ramamurthy NS, Golub LM, Nishimura I. The expression of collagen I and XII mRNAs in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in rats: the effect of doxycycline and chemically modified tetracycline. *J Periodontol.* 1998; 69(1): 34-40.
45. Karmakova T, Feofanov A, Pankratov A, Kazachkina N, Nazarova A, Yakubovskaya R, et al. Tissue distribution and in vivo photosensitizing activity of 13,15-[N-(3-hydroxypropyl)]cycloimide chlorin p6 and 13,15-(N-methoxy)cycloimide chlorin p6 methyl ester. *J Photochem Photobiol B.* 2006; 82(1): 28-36.

46. Kassab K, Fabris C, Defilippis MP, Dei D, Fantetti L, Roncucci G, et al. Skin-photosensitizing properties of Zn(II)-2(3), 9(10), 16(17), 23(24)-tetrakis-(4-oxy-N-methylpiperidiny) phthalocyanine topically administered to mice. *J Photochem Photobiol B*. 2000; 55(2-3): 128-37.
47. Komerik N, Curnow A, MacRobert AJ, Hopper C, Speight PM, Wilson M. Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue o on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci*. 2002; 17(2): 86-92.
48. 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.
49. Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(3): 932-40.
50. Komerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol*. 2000; 72(5): 676-80.
51. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007; 86(8): 694-707.
52. Lopes BM, Theodoro LH, Melo RF, Thompson GM, Marcantonio RA. Clinical and microbiologic follow-up evaluations after non-surgical periodontal treatment with erbium:YAG laser and scaling and root planing. *J Periodontol*. 2010; 81(5): 682-91.

53. Lu LH, Lee K, Imoto S, Kyomen S, Tanne K. Histological and histochemical quantification of root resorption incident to the application of intrusive force to rat molars. *Eur J Orthod.* 1999; 21(1): 57-63.
54. Luchesi VH, Pimentel SP, Kolbe MF, Ribeiro FV, Casarin RC, Nociti FH, Jr., et al. Photodynamic therapy in the treatment of class II furcation: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2013; 40(8): 781-8.
55. Lulic M, Leiggener Gorog I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(8): 661-6.
56. Macedo PD, Tsurumaki JN, Rossa-Junior C, Marcantonio RAC. Quantificação de volume ósseo em microtomografia computadorizada: comparação entre diferentes áreas de interesse (ROI). *Braz Oral Res.* 2013; 27(1): 294.
57. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci.* 2007; 22(2): 83-91.
58. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lepine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodontal Res.* 2003; 38(4): 428-35.
59. Mckeown NB. Phthalocyanines materials: synthesis, structure and function. Cambridge: Cambridge University Press; 1998.
60. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B.* 2005; 79(2): 159-70.
61. Merchat M, Spikes JD, Bertoloni G, Jori G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J Photochem Photobiol B.* 1996; 35(3): 149-57.

62. Nociti FH, Jr., Foster BL, Barros SP, Darveau RP, Somerman MJ. Cementoblast gene expression is regulated by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide partially via toll-like receptor-4/MD-2. *J Dent Res.* 2004; 83(8): 602-7.
63. Nociti FH, Jr., Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP, Sallum EA, et al. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. *J Periodontal Res.* 2001; 36(6): 361-6.
64. Noro Filho GA, Casarin RC, Casati MZ, Giovani EM. PDT in non-surgical treatment of periodontitis in HIV patients: a split-mouth, randomized clinical trial. *Lasers Surg Med.* 2012; 44(4): 296-302.
65. 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.
66. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B.* 1997; 39(1): 1-18.
67. Oliveira DM, Lacava ZG, Lima EC, Morais PC, Tedesco AC. Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006; 6(8): 2432-7.
68. Packer S, Bhatti M, Burns T, Wilson M. Inactivation of proteolytic enzymes from *porphyromonas gingivalis* using light-activated agents. *Lasers Med Sci.* 2000; 15(1): 24-30.
69. Pahkla ER, Koppel T, Naaber P, Saag M, Loivukene K. The efficacy of non-surgical and systemic antibiotic treatment on smoking and non-smoking periodontitis patients. *Stomatologija.* 2006; 8(4): 116-21.

70. 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. *J Periodontol.* 2007; 78(2): 273-81.
71. Persson LG, Berglundh T, Lindhe J, Sennerby L. Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12(6): 595-603.
72. Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Quim Nova.* 2007; 30: 988-94.
73. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol.* 2004; 75(10): 1343-9.
74. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(7): 575-80.
75. 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.
76. Redmond RW, Kochevar IE. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 2006; 82(5): 1178-86.
77. Ribeiro MS, Groth EB, Yamada AM, Garcez AS, Suzuki LC, Prates RA, et al. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Aplicações na odontologia. São Paulo: NetOdonto; 2005. p. 1-49.
78. Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol.* 1991; 53(6): 859-70.

79. Sallum AW, Sallum EA, Nociti Junior FH, Nogueira Filho GDR. Perfil bio-emocional do paciente periodontal. In: Tunes, Urbino da Rocha, Rapp, Gisela Estela. Atualização em periodontia e implantologia. São Paulo: Artes Médicas; 1999. p. 63-74.
80. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 1993; 28(3): 204-10.
81. Seeger K. *Semiconductor physics – an introduction.* 6 ed. Austria: Springer; 1997.
82. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today.* 1999; 4(11): 507-17.
83. Sibata MN, Tedesco AC, Marchetti JM. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. *Eur J Pharm Sci.* 2004; 23(2): 131-8.
84. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol.* 2005; 76(7): 1100-5.
85. Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova.* 2002; 25: 801-7.
86. Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg.* 2001; 19(1): 29-33.
87. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011; 55(1): 143-66.

88. 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.* 2003; 33(3): 161-8.
89. Spikes JD. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol.* 1986; 43(6): 691-9.
90. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol 2000.* 2009; 51: 109-40.
91. Tuner J, Hode L. *Laser therapy – handbook.* Sweden: Prisma; 2004. 589p.
92. Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000.* 2004; 36: 98-120.
93. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001; 29(2): 165-73.
94. van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000.* 1996; 10: 45-78.
95. Vergani SA, Silva EB, Vinholis AH, Marcantonio RA. Systemic use of metronidazole in the treatment of chronic periodontitis: a pilot study using clinical, microbiological, and enzymatic evaluation. *Braz Oral Res.* 2004; 18(2): 121-7.
96. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(2): 167-71.

97. Waerhaug J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: as observed on extracted teeth. *J Periodontol.* 1978; 49(3): 119-34.
98. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42(1): 13-28.
99. Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli GM, et al. Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol Surg.* 2005; 31(9 Pt 2): 1199-205.
100. Wetzel AC, Vlassis J, Caffesse RG, Hammerle CH, Lang NP. Attempts to obtain re-osseointegration following experimental peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 1999; 10(2): 111-9.
101. Whelan HT, Connelly JF, Hodgson BD, Barbeau L, Post AC, Bullard G, et al. NASA light-emitting diodes for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patients. *J Clin Laser Med Surg.* 2002; 20(6): 319-24.
102. Wiedmann MW, Caca K. General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. *Curr Pharm Biotechnol.* 2004; 5(4): 397-408.
103. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J.* 1994; 44(2): 181-9.
104. 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.
105. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol.* 1993; 75(4): 299-306.
106. Wilson M, Dobson J. Lethal photosensitization of oral anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis.* 1993; 16 Suppl 4: S414-5.

107. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol.* 1992; 25(2): 77-81.
108. Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8(3): 182-7.
109. Wilson M, Pratten J. Lethal photosensitisation of *Staphylococcus aureus* in vitro: effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time. *Lasers Surg Med.* 1995; 16(3): 272-6.
110. Yeager RL, Franzosa JA, Millsap DS, Lim J, Heise SS, Wakhungu P, et al. Survivorship and mortality implications of developmental 670-nm phototherapy: dioxin co-exposure. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(1): 29-32.
111. Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med.* 1989; 9(5): 497-505.

9 ANEXO

9.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CEUA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 07/2012

Araraquara, 09 de Maio de 2012

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade reunida em 09/05/2012, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica com ftalocianina e hipericina-glucamina no tratamento da doença periodontal. Estudo em ratos" (Proc. CEUA nº 07/2012) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para MARÇO/2015.

Atenciosamente.

Profª Drª DÉBORA SIMÕES DE ALMEIDA COLOMBARI
Vice-Coordenadora no exercício da Coordenadoria da CEUA

À

Profª Drª ROSEMARY ADRIANA CHIÉRICI MARCANTONIO
DD. Pesquisadora Responsável
a/c Paula Delello Macedo
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

9.2 DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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

**DECLARAÇÃO**

DECLARO, para os devidos fins, que a CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade de Odontologia, recebeu o projeto "**AValiação dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica com Ftalocianina e Hipericina-Glucamina no Tratamento da Doença Periodontal. Estudo em Ratos**" (Processo CEUA nº 7/2012), apresentado pela Pesquisadora Profa. Dra. ROSEMARY ADRIANA CHIÉRICI MARCANTONIO. O referido projeto deu entrada nesta Comissão em 04/04/2012, não apresenta pendências até o momento, e seu relatório final deverá ser entregue em MARÇO/2015.

Araraquara, 07 de fevereiro de 2014.


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

NÃO AUTORIZO A REPRODUÇÃO DESTE TRABALHO ATÉ MARÇO/2017

(DIREITOS DE PUBLICAÇÃO RESERVADOS AO AUTOR)

ARARAQUARA, 24 DE MARÇO DE 2014

SÂMARA CRUZ TFAILE CORBI