

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 09/12/2019.



*Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Odontologia de Araraquara*



*Paula Delello Macedo*

*Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT),  
com Hipericina-glucamina ativada por LED, na  
progressão e tratamento da doença periodontal induzida  
em ratos*

Araraquara

2017



Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Paula Delello Macedo

*Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT),  
com Hipericina-glucamina ativada por LED, na  
progressão e tratamento da doença periodontal induzida  
em ratos*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
- Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara,  
da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de  
**Doutora** em Periodontia.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

Araraquara

2017

Macedo, Paula Delello

Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT), com Hipericina-glucamina ativada por LED, na progressão e tratamento da doença periodontal induzida em ratos / Paula Delello Macedo.-- Araraquara: [s.n.], 2017

110 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

1. Fotoquimioterapia 2. Periodontite 3. Hypericum I. Título

PAULA DELELLO MACEDO

Efeito da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), com Hipericina-glucamina ativada por LED, na progressão e tratamento da doença periodontal induzida em ratos

Comissão julgadora

Tese para a obtenção do grau de Doutora em Odontologia

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

2º examinador – Profa. Dra. Chaine Pavone

3º examinador – Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin

4º examinador – Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

5º examinador – Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara, 08 de dezembro de 2017.

# DADOS CURRICULARES

## *Paula Delello Macedo*

- NASCIMENTO:** 28/09/1987 (São Carlos, SP)
- FILIAÇÃO:** Paulo Eduardo Macedo  
Maria Isabel Delello Macedo
- 2006-2010:** **Curso de Graduação em Odontologia**  
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP,  
São Paulo, Brasil
- 2011 - 2014:** **Pós-Graduação em Periodontia – Nível Mestrado**  
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP,  
São Paulo, Brasil
- 2013 - 2014:** **Especialização em Periodontia**  
Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em  
Odontologia – FAEPO  
São Paulo, Brasil
- 2014 - atual:** **Pós Graduação em Periodontia – Nível Doutorado**  
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP,  
São Paulo, Brasil

**À Deus,**

Entreguei minha vida à sua vontade e o Senhor me deu família e amigos, anjos colocados em meu caminho sem os quais eu nada teria conseguido!

***“O Senhor fez por mim maravilhas, Santo é o seu nome!”***

Magnificat

# *Agradecimentos especiais*

Aos meus pais **Paulo Eduardo** e **Maria Isabel**,

O amor de vocês me trouxe até aqui. Meus esforços são e serão sempre para lhes dar orgulho, pois vocês dedicaram sua vida à mim. Obrigada pelo exemplo, graças a vocês eu sei o que é viver em família e tenho valores. Amo vocês!

Ao meu marido **Douglas**,

De todas as bênçãos que eu poderia receber, Deus fez em você a maior! Não há palavras que expressem minha gratidão. Obrigada por tomar meus problemas como seus, pelo apoio, pela compreensão e sobretudo pelo companheirismo... Amo você!

Ao meu irmão **Thiago**,

Meu grande companheiro na estrada da vida! Obrigada pelas conversas, pelas brincadeiras, pelos ensinamentos nos pequenos gestos. Nossas conversas me fazem ter fé em um futuro digno e feliz! Amo você!

À **minha família**, tios, tias, primos e primas, avós e avôs,

Vocês são minha base, obrigada pelas conversas, pelas orações, pelo “estar presente”, mesmo estando distâtes. Sou muito abençoada por ter cada um de vocês em minha vida!



À minha orientadora **Adriana Marcantonio**,

Obrigada por me guiar durante esses anos, com a dose certa de carinho e seriedade que são suas características principais! Por me transmitir seus conhecimentos e me impulsionar a ser melhor. Saiba que sou eternamente grata!

# *Agradecimentos*

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de sua Diretora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Maria Sgavioli Massucato e Vice-Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos, pela oportunidade e infra-estrutura oferecidas para realização deste projeto.

Ào Coordenador do Curso de Pós-Graduação – Área de Periodontia, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Àos docentes da disciplina de Periodontia desta Faculdade: Prof. Dr. **Carlos** Rossa Júnior, Prof. Dr. **José Eduardo** Cezar Sampaio, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Silvana** Regina Perez Orrico, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Daniela** Leal Zandim-Barcellos, Prof. **Elcio** Marcantonio Junior e ao Prof. Dr. **Joni** Augusto Cirelli. Saibam que são modelos para mim, e que me orgulho da formação que recebi.

Àos **meus amigos da pós-graduação**, por dividirem seus conhecimentos comigo, e suavizar as dificuldades do caminho com seus sorrisos!

À **Ana Claudia Miranda**, nossa *Claudinha*, que ao longo desses anos, se fez uma figura materna nos laboratórios do segundo andar da FOAr. Pelas infinitas ajudas, pela dedicação e profissionalismo impecável! Obrigada de coração!

À **Isabela** e **Suleima**. Com a ajuda e carinho e amizade de vocês, tudo ficou mais fácil!

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **José Alexandre** e **Cristiano**, obrigada pela competência e carinho com que realizaram seus trabalhos.

À Prof<sup>a</sup>. Janice Rodrigues Perussi, obrigada por compartilhar seus conhecimentos durante as etapas deste projeto. A sua ajuda foi essencial para a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Anderson Ribeiro de Oliveira, pela síntese dos fotossensibilizadores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudos concedida.

*“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”*

1 Coríntios 13:2

Macedo PD. Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT), com Hipericina-glucamina ativada por LED, na progressão e tratamento da doença periodontal induzida em ratos [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2017.

### **Resumo**

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aPDT (antimicrobial photodynamic therapy), com o fotossensibilizador Hipericina-glucamina (Hy-g), ativado por LED âmbar ( $34,10 \text{ J/cm}^2$ ), no tratamento e progressão da doença periodontal (DP) induzida experimentalmente em ratos. Dois estudos distintos foram conduzidos. No Estudo 1, foi avaliada a efetividade da aPDT como tratamento adjuvante à raspagem e alisamento radicular. Em um período de 15 dias, 60 ratos permaneceram com ligadura ao redor do segundo molar superior para indução da DP. No dia seguinte a sua remoção, os animais foram distribuídos entre 4 grupos experimentais (n=5): IDP (Indução da Doença Periodontal); RAR (Raspagem e Alisamento Radicular); aPDT e RAR+aPDT. Em 7, 15 ou 30 dias após a aplicação dos tratamentos os animais foram eutanasiados. Análises: histológica, histométrica, microtomográfica e estereométrica. No Estudo 2, após 7 dias de indução da DP, 30 ratos foram divididos em 3 grupos experimentais (n=5): Hy-g; LED e aPDT. Os animais foram eutanasiados em 7 ou 15 dias após a aplicação dos tratamentos. Análises: microtomográfica, histométrica, e imuno-histoquímica para Fosfatase Ácida Tartarato Resistente. Os dados foram submetidos a análise estatística ( $\alpha=0,05$ ). Como resultados, observamos que no Estudo 1 o grupo IDP apresentou alterações morfológicas mais severas do que os demais grupos devido ao processo inflamatório propagado pela DP. No período de 7 dias após os tratamentos, a análise estereométrica mostrou uma proporção significativamente maior de fibroblastos nos animais dos grupos RAR e RAR+aPDT, com relação aos animais do grupo

IDP. Entretanto, as demais análises não demonstraram diferenças significativas entre os grupos experimentais. No Estudo 2, a microtomografia computadorizada mostrou que em 7 dias o grupo aPDT apresentou porcentagem de tecido ósseo significativamente maior do que os demais grupos, assim como na avaliação histométrica em área de furca. No período de 15 dias, o grupo tratado com LED apresentou as maiores porcentagens de volume ósseo, sendo significativamente superior aos grupos tratados com Hy-g e aPDT. Na análise histométrica, os grupos controle (hemimaxila contra-lateral), mostraram perda significativamente maior de nível ósseo nas regiões proximais com relação aos grupos tratados. Em 7 e 15 dias, o tratamento com aPDT resultou em menor atividade osteoclática. Concluimos que a aPDT tem efeitos positivos no tratamento da DP, promovendo condições favoráveis ao reparo do periodonto.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia, Periodontite, Hypericum

Macedo PD. Effect of Photodynamic Therapy using Hypericin-Glucamine activate by LED, in the progression and treatment of periodontal disease induced in rats [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2017.

### **Abstract**

This research aims at evaluating the effect of aPDT (antimicrobial photodynamic therapy) using the Hypericin-glucamine (Hy-g) as photosensitizer, activated by LED amber (34.10 J/cm<sup>2</sup>), on the treatment of experimental induced periodontal disease (PD) in rats. Two different studies were conducted. In the Study 1, we assessed the effectiveness of aPDT as an adjunctive treatment to root scaling and straightening. The PD was induced in the second upper molar of 60 rats using ligature for 15 days. In the day after removing the ligature, the animals were divided randomly in 4 experimental groups (n=5): IPD (Induced Periodontal Disease); RAR (Root Scaling and Smoothing); aPDT; and RAR+aPDT. At 7, 15 or 30 days after applying the treatments, the animals were euthanized. Analyses: histological, histometric, microtomographic and stereometric. In the Study 2, after 7 days of inducing the PD, 30 rats were distributed into 3 experimental groups (n=5): Hy-g; LED e aPDT. The animals were euthanized after 7 or 15 days from the treatments. Analyses: microtomographic, histometric, and immunohistochemical for Resistant Tartarate Acid Phosphatase. All data was submitted to statistical analysis ( $\alpha=0,05$ ). The results from Study 1 indicated that the IPD group had more severe morphological changes than the other groups due to the inflammatory process disseminated by the PD. The stereometric analysis showed a significantly higher proportion of fibroblasts in the animals from the 7-days-after-treatment groups RAR and RAR+aPDT than the group IPD. However, the other analyses did not demonstrate significantly differences among the experimental groups. In the Study 2, the computerized

microtomography for the 7-days-after-treatment group aPDT had percentage of bone tissue significantly higher than the other groups, as well as observed in the histometric evaluation in the furcation areas. For the 15 days after treatment, the group treated with LED had the highest percentages of bone volume, which were significantly higher than the groups treated with Hy-g e aPDT. The histometric analysis exhibit that the control groups had a significantly higher loss of bone levels in the proximal regions when compared to the treated groups. In the 7 and 15 days, the treatment with aPDT resulted with less activity of osteoclastic. We concluded that the aPDT has positive effects on the treatment of PD by promoting favorable repairs in the periodontium.

Keywords: Photochemotherapy, Periodontitis, Hypericum



## LISTA DE ABREVIATURAS

**aPDT**- *Antimicrobial photodynamic therapy* ou Terapia fotodinâmica antimicrobiana

**LED**- *Light emitting diode* ou luz emissora de diodo

**FS**- Fotossensibilizador

**HE**- Hematoxilina e Eosina

**MicroCT ( $\mu$ CT)** – Microtomografia, Microtomografia computadorizada ou Microtomografia por raios X

**RAR**- Raspagem e alisamento radicular

**DP**- Doença periodontal

**IDP**- Indução de doença periodontal

**ROS**- Reactive oxygen species ou Espécies reativas de oxigênio

**nm**- Nanômetro

**J/cm<sup>2</sup>**- Joule por centímetro quadrado

**DMSO**- Dimetilsulfóxido

**$\mu$ l** - Microlitro

**Kv** - Kilovolt

**mJ** – Mili joule

**W** – Watts

**s** – Segundos

**%** - Porcento (porcentagem)

**ml** – Mililitro

**g** – Grama

**μm**- Micrometros

**μs** – Microsegundos

**mm** – Milímetro

**EDTA** – Etileno-diamino tetra-acetato

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** - Oxigênio singleto

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>3 PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Publicação 1 .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Publicação 2 .....</b>	<b>50</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>5 REFERÊNCIAS* .....</b>	<b>79</b>
<b>6 APÊNDICE A .....</b>	<b>85</b>
<b>Material e Método Publicação 1.....</b>	<b>85</b>
<b>7 APÊNDICE B.....</b>	<b>95</b>
<b>Material e Método Publicação 2.....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A periodontite é a doença inflamatória crônica mais prevalente em humanos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em média, de 15% a 20% da população mundial de adultos de meia idade (35-44 anos) sofrem de doença periodontal severa, sendo essa a causa de 5% a 15% das perdas dentais na maioria das populações<sup>1,2</sup>

A Periodontite se caracteriza por um conjunto de reações inflamatórias e imunológicas, que o indivíduo desenvolve em resposta a agressão causada pelo biofilme bacteriano e seus subprodutos. Sua progressão e desenvolvimento dependem da ocorrência simultânea de fatores como a susceptibilidade local e sistêmica do hospedeiro, e da presença e manutenção de um ambiente adequado para o crescimento polimicrobiano<sup>3,4</sup>.

Smiley et al.<sup>5</sup>, desenvolveram um guia para a prática clínica do tratamento não cirúrgico da periodontite crônica. Por meio de revisão sistemática da literatura, analisaram os benefícios e potenciais efeitos adversos das terapias aplicadas pelos autores e sugerem que a raspagem e alisamento radicular (RAR), deve ser a escolha para tratamento inicial nos casos de periodontite crônica.

Na maioria dos casos clínicos, a terapêutica de raspagem e alisamento radicular consegue bons resultados, pois consiste na remoção mecânica dos elementos contaminantes da superfície radicular<sup>1,3,6</sup>. O sucesso da terapia por RAR é baseado no controle quantitativo e qualitativo da microbiota do biofilme subgingival, que resulta clinicamente na regressão dos sinais inflamatórios<sup>3</sup>.

No entanto, em exames de reavaliação, clinicamente se observa que muitos sítios parecem não ser capazes de recuperar e manter a saúde periodontal<sup>3,6</sup>. Estes sítios, em sua maioria, são

profundos ou envolvem regiões de furca, invaginações ou concavidades, o que dificulta o acesso para a realização de uma instrumentação adequada<sup>7</sup>. Deste modo, é grande o número de profissionais que optam por métodos auxiliares à RAR.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é parte da fotomedicina, divisão da medicina que utiliza a luz como tratamento. Os primeiros relatos de experimentos baseados na terapia fotodinâmica datam de 1900, quando Raab e Von Tappeiner avaliaram o efeito da acridina vermelha em cultura de paramécios, o causador da malária, e suspeitaram que a luminosidade do ambiente estaria alterando os resultados do experimento. Postularam, portanto, que haveria transferência de energia da luz para a substância química, assim como ocorre nos processos de fotossíntese. Deste modo, Von Tappeiner chamou o processo de “Ação Fotodinâmica”, e os estudos prosseguiram com novos corantes, agora denominados fotossensibilizadores (FS), e lâmpadas convencionais. Observou-se que, no entanto, a luz branca provocava aquecimento e conseqüentemente danos teciduais<sup>14</sup>. Hoje, sabe-se que a TFD deve ser realizada com fonte de luz capaz de ser absorvida pelo fotossensibilizador, obtendo-se melhores resultados com lasers e LEDs<sup>8</sup>.

Wilson<sup>9</sup>, 1993, em um artigo de revisão sobre fotólise em bactérias orais, expôs que algumas bactérias possuem compostos endógenos, e podem absorver luz de comprimento de onda visível, o que levaria a excitação das moléculas destes pigmentos, que poderiam interagir com o oxigênio molecular formando oxigênio singleto reativo e conseqüentemente ocasionar a morte celular.

Quando a TFD é indicada para o tratamento de lesões infectadas, é chamada de terapia fotodinâmica antimicrobiana ou “aPDT” (do inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy*), sendo direcionada para o controle microbiano pela indução da morte celular bacteriana<sup>10-17</sup>.

Na aPDT, o fármaco denominado fotossensibilizador (FS), é aplicado sobre a lesão e após um período de incubação no escuro, é aplicada uma fonte de luz com comprimento de onda capaz de ativar o FS utilizado. Ao ser estimulado, o FS transfere energia às moléculas circundantes, geralmente ao oxigênio molecular, produzindo radicais livres e moléculas altamente reativas e citotóxicas, como o oxigênio singleto<sup>18-20</sup>. Estes subprodutos podem modificar as estruturas das membranas plasmáticas<sup>39</sup> e causar morte celular através de diversos mecanismos, incluindo: peroxidação lipídica, inibição do sistema enzimático e aglutinação proteica<sup>21,22</sup>.

A eficácia do tratamento com terapia fotodinâmica também está relacionada à fonte de luz utilizada, laser ou díodos emissores de luz (LEDs), e a variação de seus padrões de aplicação, como: comprimento de onda, intensidade e tempo de exposição<sup>18,22-25</sup>.

A literatura comprova a eficácia do laser para acelerar a reparação tecidual em áreas normais ou infectadas, com ou sem o uso de fotossensibilizantes<sup>8</sup>. De um modo geral, os lasers terapêuticos apresentam uma série de indicações, podendo ser usados isoladamente ou como coadjuvante de outros tratamentos, sempre que se necessite de efeito biológico local, uma vez que, modulam as células do sistema imune, estimulam a microcirculação, ativam a liberação de endorfinas e estimulam também a proliferação e a migração celular, desempenhando ação analgésica, anti-inflamatória e bioestimulante ou cicatrizante<sup>26,27</sup>. Estes efeitos estão provavelmente relacionados com a capacidade do laser em promover angiogênese, proliferação celular e aceleração da síntese de colágeno<sup>26,28-30</sup>.

O sucesso no tratamento com aPDT depende também do tipo, da concentração e do modo de ação do fotossensibilizador, que por sua vez é influenciado pelo sítio de ação. O sítio de ação depende das características físico-químicas da interação microrganismo-fotossensibilizador, o que

significa, que deve-se considerar: a coloração do tecido, presença de sangramento ou fluidos, a condutividade térmica, pH, entre outros fatores locais<sup>15,21,24</sup>.

Braun et al.<sup>32</sup>, 2008, após estudo clínico randomizado, concluíram que a aplicação de um único episódio de aPDT (fotossensibilizador cloreto de fenotiazina, ativado por laser diodo com 660nm e 100Mw), à raspagem e alisamento radicular, resulta em maior redução dos escores de sangramento, quando comparado aos sítios tratados apenas com RAR. E, utilizando o mesmo protocolo para aPDT, Chondros et al.<sup>6</sup>, 2009, observaram que 3 meses após a terapia, houve redução de *Fusobacterium nucleatum* e *Eubacterium nodatum* no grupo tratado com raspagem e alisamento radicular associada a aPDT.

Fontana et al.<sup>31</sup>, 2009, avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre espécies subgingivais em biofilmes e em fase planctônica. As amostras foram obtidas de pacientes com periodontite crônica. Para a aPDT, foi empregado o corante azul de metileno (25µg/ml), incubação durante 5 min e exposição a luz vermelha. Os autores concluíram que bactérias em fase planctônica são mais afetadas pela aPDT do que em biofilmes. No entanto, a efetividade do tratamento com aPDT em biofilmes não é tão prejudicada quanto o tratamento com antibióticos para condições semelhantes.

Os estudos do grupo de pesquisa de Garcia et al.<sup>33</sup> e Theodoro et al.<sup>34</sup> que avaliaram a utilização da terapia fotodinâmica em associação a raspagem e alisamento radicular, em modelo experimental animal, concluíram que a aplicação de aPDT como tratamento adjunto à RAR reduziu significativamente os níveis de *A. actinomycetemcomitans*<sup>33</sup>, além de observarem menor perda óssea em área de furca quando realizada apenas uma aplicação da aPDT, não havendo melhoria no caso de aplicações sucessivas de aPDT<sup>34</sup>.

A Hipericina é um fotossensibilizador natural, presente em plantas herbáceas conhecidas como erva de São João (gênero *Hypericum perforatum*)<sup>35</sup>. Possui propriedades anti-inflamatórias,

antissépticas, anti-infecciosas, antivirais, estimula a circulação sanguínea e elimina hematomas<sup>18,35-38</sup>.

Na TFD, estudos têm mostrado o grande poder fototóxico da hipericina no tratamento da psoríase e outras doenças de pele<sup>39</sup>, potente atividade anticâncer induzindo tanto apoptose quanto a necrose de células tumorais<sup>40</sup> e na aPDT, capacidade de promover a inativação de microrganismos<sup>41</sup>, sendo considerada como um dos mais potentes fotossensibilizadores encontrados na natureza<sup>16,42</sup>

O princípio de ação da terapia fotodinâmica está na formação das “ROS” do inglês *Reactive Oxygen Species*, ou espécies reativas de oxigênio. A hipericina é uma quinona policíclica, que quando ativada reage com moléculas vizinhas por transferência de energia ao oxigênio induzindo a produção do oxigênio singleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Sendo assim, apresenta um alto rendimento quântico no estado triplete e formação de oxigênio singleto, mesmo em baixas concentrações (<0.1 µg/mL), sendo considerada mais potente, e fotoestável que a maioria dos fotossensibilizadores<sup>35,36,43,44</sup>.

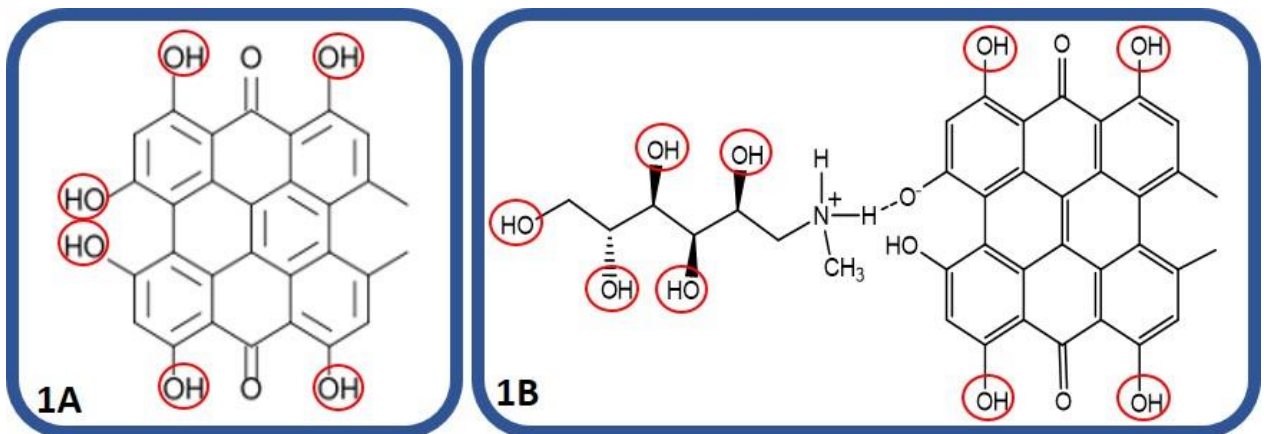
A literatura mostra que as bactérias Gram-positivas podem ser eliminadas por vários fotossensibilizadores e doses mais baixas de irradiação do que bactérias Gram-negativas<sup>10,19</sup>. Os parâmetros importantes do fotossensibilizador para esta interação incluem: solubilidade relativa em água e lipídios, constante de ionização, fatores específicos como as características de absorção de luz, e a eficiência da formação do estado excitado triplete ou da produção de oxigênio singleto<sup>19,21,45</sup>. Portanto, para uma maior eficiência da inativação dos microrganismos essas diferenças devem ser superadas modificando o FS quanto a sua hidrofobicidade e carga, de acordo com a característica celular de cada microrganismo<sup>45</sup>.

O fotossensibilizador hipericina possui característica hidrofóbica e perde a sua ação fotossensibilizadora quando em meio biológico, devido a auto agregação em meio aquoso e em



muitos casos a uma subsequente precipitação que reduz drasticamente a capacidade de gerar oxigênio singlete, diminuindo sua efetividade na aPDT<sup>38</sup>. Uma estratégia proposta por estudiosos em química é a indução da formação de espécies supramoleculares hidrofílicas. Supramolécula é uma espécie química constituída por duas ou mais moléculas, unidas por interações moleculares, visando a obtenção de uma determinada propriedade ou funcionalidade<sup>46</sup>. No caso da hipericina, como representado na Figura 1A, para a formação de uma supramolécula hidrofílica, é induzida uma reação a partir do grupo fenólico, que cede o próton  $H^+$ , formando a hipericina-glucamina (Figura 1B). A presença de vários grupos hidroxila na supramolécula hipericina-glucamina, fornece os sítios onde as ligações de hidrogênio serão estabelecidas, aumentando sua hidrofiliabilidade.

**Figura 1** – Estrutura química do fotossensibilizador Hipericina (1A) e sua espécie supramolecular Hipericina-glucamina (1B).



Fonte: Autoria própria.

Em estudos prévios *in vitro*, foram avaliadas diferentes concentrações do fotossensibilizador hipericina. Os resultados mostraram que a concentração de 10mcg/mL foi capaz de eliminar bactérias G- positivas e G-negativas<sup>41</sup>.

Em suma, observa-se que a aPDT demonstrou efeito bactericida contra periodontopatogenos como *P. gingivalis*, *Agregactibacter actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus sanguis*<sup>13,47</sup>. Além de ser capaz de reduzir fatores-chave de virulência como lipopolisacarídeos e proteases<sup>13,30,48,49</sup>, e inativar citocinas inflamatórias do hospedeiro, tais como interleucina 1 $\beta$  e TNF $\alpha$ <sup>48</sup>.

Observando que estudos clínicos demonstram que a RAR apresenta resultados melhorados quando associada a aPDT e sabendo das propriedades hidrofílicas e anti-inflamatórias do fotossensibilizador hipericina-glucamina, objetivamos avaliar in vivo a influência da aPDT, utilizando o fotossensibilizador hipericina-glucamina, no tratamento e progressão da doença periodontal induzida em ratos.

## 5 CONCLUSÃO

De acordo com as metodologias utilizadas podemos concluir que na aPDT com o fotossensibilizador hipericina-gluamina:

1. O fotossensibilizador não causa danos aos tecidos periodontais, e demonstrou que sua característica anti-inflamatória agrega benefícios ao tratamento da doença periodontal;
2. O LED âmbar, na dosagem de (34,10 J/cm<sup>2</sup>), possui atividade biomoduladora e influência positivamente no desenvolvimento da doença periodontal;
3. A aPDT interfere na progressão e desenvolvimento da doença periodontal, diminuindo a proporção da perda óssea, quando comparada a sítios não tratados;
4. A aPDT apresentou resultados semelhantes aos obtidos com a terapia de raspagem e alisamento radicular, no entanto, para a manutenção dos resultados é necessário que haja a remoção mecânica dos fatores etiológicos locais;

## 5 REFERÊNCIAS\*

1. Babu A, Santosh R, Ogle OE, Williams D, Woodbine EF. Epidemiology of Oral and Maxillofacial Infections. 2017;61:217–33.
2. Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research: Group C Consensus report of the 5th European workshop in periodontology. In: Journal of Clinical Periodontology. 2005. p. 210–3.
3. Echeverría JJ SM. Controle mecânico da placa supragengival. In: Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 435–45.
4. Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. Eur J Oral Sci [Internet]. 1996;104(4 ( Pt 1)):327–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8930578>
5. Dds CJS, Tracy SL, Abt E, Ms DDS, Dds BSM, John MT, et al. Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. 2015;146(July).
6. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: A randomized controlled clinical trial. Lasers Med Sci [Internet]. 2009 Sep [cited 2013 Jan 8];24(5):681–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18465191>
7. Drisko CL, Killoy WJ. Scaling and root planing: removal of calculus and subgingival organisms. Curr Opin Dent. 1991;1(1):74–80.
8. Brundish DE, Love WG. Photodynamic therapy comes of age. IDrugs [Internet]. 2000;3(12):1487–508. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037859>
9. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. Vol. 75, Journal of Applied Bacteriology. 1993. p. 299–306.
10. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. Vol. 6, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2009. p. 170–88.
11. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy : a new antimicrobial approach to infectious disease ? 2004;
12. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. Int J Immunopathol Pharmacol [Internet]. 2011;17(3):245–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190896>
13. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. Lasers

---

\*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

- Surg Med. 2006;38(5):468–81.
14. Moor AC. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2000;57(1):1–13.
  15. de Melo W de CMA, Perussi JR. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl*. 2012;33(3):331–40.
  16. Pervaiz S, Olivo M. Art and science of photodynamic therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2006;33(5–6):551–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16700893>
  17. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin Endosc*. 2013;46(1):24–9.
  18. Vatansever F, de Melo WCMA, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. Vol. 37, *FEMS Microbiology Reviews*. 2013. p. 955–89.
  19. 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* [Internet]. 2013;11(7):669–93. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14787210.2013.811861>
  20. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* [Internet]. 1992 Jan;55(1):145–57. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1603846>
  21. Cassidy CM, Tunney MM, McCarron PA, Donnelly RF. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: From benchtop to clinical practice. Vol. 95, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009. p. 71–80.
  22. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. Vol. 78, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2005. p. 1–6.
  23. Parker JG, Stanbro WD. Optical determination of the collisional lifetime of singlet molecular oxygen [O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g)] in acetone and deuterated acetone. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1982 Apr;104(7):2067–9. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00371a066></sub>
  24. Huang T-H, Liu S-L, Chen C-L, Shie M-Y, Kao C-T. Low-level laser effects on simulated orthodontic tension side periodontal ligament cells. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2013 Feb [cited 2013 Feb 20];31(2):72–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23327633>
  25. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. Vol. 24, *Lasers in Medical Science*. 2009. p. 259–68.
  26. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation accelerates wound

- healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen.* 2001;9(3):248–55.
27. Al-Watban FA, Zhang XY. Comparison of wound healing process using Argon and Krypton lasers. *J Clin Laser Med Surg.* 1997;15(5):209–15.
  28. D’Andrea Fonseca P, De Lima FM, Higashi DT, Koyama DFV, De Oliveira Togninho Filho D, Dias IFL, et al. Effects of light emitting diode (LED) therapy at 940 nm on inflammatory root resorption in rats. *Lasers Med Sci.* 2013;28(1):49–55.
  29. Oliveira Sampaio SCP, Juliana JS, Cangussú MCT, Pires Santos GM, Dos Santos MAV, Dos Santos JN, et al. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):799–806.
  30. 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.
  31. Fontana CR, Abernethy a D, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res* [Internet]. 2009 Dec [cited 2013 Jan 14];44(6):751–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2784141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  32. 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* [Internet]. 2008 Oct [cited 2012 Nov 21];35(10):877–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18713259>
  33. Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casatti CA, et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol* [Internet]. 2013;84(4):556–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22680299>
  34. Theodoro LH, Pires JR, Fernandes LA. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontally infected tooth sockets in rats. 2015;677–83.
  35. Zanolli P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John’s Wort. *CNS Drug Rev.* 2004;10(3):203–18.
  36. Vuong TTK, Vever-Bizet C, Bonneau S, Bourg-Heckly G. Hypericin incorporation and localization in fixed HeLa cells for various conditions of fixation and incubation. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2011;10(4):561–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21243156>
  37. Yow CMN, Tang HM, Chu ESM, Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2012 [cited 2013 Jan 14];88(3):626–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22233203>
  38. Malkin J, Mazur Y. HYPERICIN DERIVED TRIPLET STATES and TRANSIENTS IN ALCOHOLS and WATER. *Photochem Photobiol.* 1993;57:929–33.

39. Kamuhabwa AR, Roelandts R, De Witte PA. Skin photosensitization with topical hypericin in hairless mice. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1999;53(1–3):110–4.
40. Fox FE, Niu Z, Tobia A, Rook AH. Photoactivated hypericin is an anti-proliferative agent that induces a high rate of apoptotic death of normal, transformed, and malignant T lymphocytes: Implications for the treatment of cutaneous lymphoproliferative and inflammatory disorders. *J Invest Dermatol.* 1998;111(2):327–32.
41. de Melo W. Fotoinativação seletiva dos microrganismos: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. USP; 2014.
42. Perussi JR, Química I De, Carlos DS, Paulo UDS, Sp SC. *Divulgação.* 2007;30(4):988–94.
43. Bernal C, Rodrigues J a. O, Guimarães a. PP, Ribeiro a. O, Oliveira KT, Imasato H, et al. Selective photoinactivation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* with hypericin. *Laser Phys [Internet].* 2010 Dec 4 [cited 2013 Jan 14];21(1):245–9. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1134/S1054660X1101004X>
44. Bernal C, Tominaga TT, Ribeiro AO, Imasato H, Perussi JR. Comparative studies of photophysical and biological properties of hypericin and hypericin-glucamine. *Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet].* 2017 Nov 11;8(2):190. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.03.226>
45. Kussovski V, Mantareva V, Angelov I, Orozova P, Wöhrle D, Schnurpfeil G, et al. Photodynamic inactivation of *aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;294(2):133–40.
46. Cassimiro DL, Kobelnik M, Ribeiro CA, Crespi MS, Boralle N. Structural aspects, thermal behavior, and stability of a self-assembled supramolecular polymer derived from flunixin-meglumine supramolecular adducts. *Thermochim Acta.* 2012;529:59–67.
47. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol.* 2004;75(10):1343–9.
48. Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial Photodynamic Therapy May Promote Periodontal Healing Through Multiple Mechanisms. *J Periodontol [Internet].* 2009;80(11):1790–8. Available from: <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2009.090214>
49. Kömerik N, Wilson M, Poole S. The Effect of Photodynamic Action on Two Virulence Factors of. *Photochem Photobiol.* 2000;72(5):676–80.
50. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol.* 1991;62:59–73.
51. Zohaib A, Aziz ASA, Umer D, Yahya AF, H SA, Ayedh AM, et al. Bactericidal Efficacy of Photodynamic Therapy Against Periodontal Pathogens in Periodontal Disease : 2016;34(4):1–13.
52. Trindade AC. Analysis of Antimicrobial Photodynamic Therapy for the Treatment of Teeth with Apical Periodontitis : A Study in Rats ' Molars. 2017;XX(Xx):1–8.
53. Moraes M De, Carvalho R, Paulo J, Longo F, Alexandre L, Bentes R, et al. *Journal of*

- Photochemistry & Photobiology , B: Biology Photodynamic therapy using chloroaluminum phthalocyanine decreases in inflammatory response in an experimental rat periodontal disease model. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2017;167:208–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.031>
54. Belinello-souza EL, Alvarenga LH, Lima-leal C, Almeida P, Guimarães C, Lima TR, et al. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Antimicrobial photodynamic therapy combined to periodontal treatment : Experimental model. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2017;18:275–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.03.008>
  55. Oliveira RR De, Schwartz-filho HO, Bele A. Antimicrobial Photodynamic Therapy in. 2009;80(1).
  56. Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, et al. Photodynamic therapy using intra-articular photofrin for murine MRSA arthritis: Biphasic light dose response for neutrophil-mediated antibacterial effect. *Lasers Surg Med*. 2011;43(3):221–9.
  57. Shishkova N, Kuznetsova O, Berezov T. Photodynamic therapy in gastroenterology. Vol. 44, *Journal of Gastrointestinal Cancer*. 2013. p. 251–9.
  58. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2004;1(4):279–93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4108220&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  59. Ge L, Shu R, Li Y, Li C, Luo L, Song Z, et al. Adjunctive Effect of Photodynamic Therapy to Scaling and Root Planing in the Treatment of Chronic Periodontitis. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2011;29(1):33–7. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2009.2727>
  60. Periodontal S, Clinical C, Kolbe MF, Ribeiro F V, Luchesi VH, Casarin RC, et al. Maria F. Kolbe,\* Fernanda V. Ribeiro,\* Vanessa H. Luchesi,\* Renato C. Casarin,\* Lucia M.B. Ambrosano, ‡ Enilson A. Sallum, † Francisco H. Nociti Jr., † Gla Fabiano R. Cirano,\* Suzana P. Pimentel,\* and Marcio Z. Casati\*. 2014;(August):277–86.
  61. Prates RA, Suzuki LC, Franc CM, Cai S, Ribeiro AC, Ribeiro MS. Histomorphometric and Microbiological Assessment of Photodynamic Therapy as an Adjuvant Treatment for Periodontitis: A Short-Term Evaluation of Inflammatory Periodontal Conditions. 2011;29(12):835–44.
  62. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol*. 2008;79(11):2156–65.
  63. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2012 Nov 7];81(1):4–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20059412>
  64. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence



- of Photodynamic Therapy on the Development of Ligature-Induced Periodontitis in Rats. *J Periodontol* [Internet]. 2007;78(3):566–75. Available from: <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2007.060214>
65. Kolbe MF, Ribeiro F V., Luchesi VH, Casarin RC, Sallum EA, Nociti FH, et al. Photodynamic Therapy During Supportive Periodontal Care: Clinical, Microbiologic, Immunoinflammatory, and Patient-Centered Performance in a Split-Mouth Randomized Clinical Trial. *J Periodontol* [Internet]. 2014;85(8):e277–86. Available from: <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2014.130559>
  66. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Mu R. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro – Computed Tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468–86.
  67. Bruker-Mikro-CT C. Bone mineral density ( BMD ) and tissue mineral density ( TMD ) calibration and measurement by micro-CT using Bruker-MicroCT. *Bruker Method Note*. 2010;(September):1–30.
  68. Cirelli JA, Marcantonio E, Marcantonio RAC, Lia RCC, Goissis G, Rossa C. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: An histometric analysis in dogs. *Biomaterials*. 1997;18(18):1227–34.
  69. Pavone C, Vilas A, Nogueira B, Cerri PS, Jr EM, Adriana R, et al. Treatment of periodontal disease with an Er , Cr : YSGG laser in rats exposed to cigarette smoke inhalation. 2015;2095–103.
  70. César-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH. 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.
  71. Odze RD, Marcial MA, Antonioli D. Gastric fundic gland polyps: A morphological study including mucin histochemistry, stereometry, and MIB-1 immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 1996;27(9):896–903.